

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

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

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

**Dit project heeft tot doel om de werkzaamheid van antivirale interventiestrategieën (antivirale middelen, vaccins) tegen huidige en mogelijk nieuwe coronavirusinfecties te bepalen in beschikbare diermodellen.**

De uit dit project verkregen resultaten dragen bij aan de ontwikkeling en registratie van antivirale interventiestrategieën, die kunnen worden ingezet tegen actuele en toekomstige uitbraken van coronavirussen.

De commissie schat het belang van het project in als een substantieel belang.

**De oorspronkelijke aanvraag voorzag reeds in de mogelijkheid dat er zich gedurende de looptijd van de vergunning een uitbraak van een nieuw coronavirus zou voordoen (enkele regels hierboven is een passage uit het oorspronkelijke advies geaccentueerd). De aanvraag had mede tot doel om in het geval van een nieuwe uitbraak snel te kunnen inspelen op de ontstane**

**situatie en de expertise van de aanvrager op het gebied van challenge modellen te kunnen aanbieden aan partijen die vaccins en antivirale middelen willen laten testen op hun werkzaamheid (bescherming tegen infectie en tegen symptomen van de aandoening die wordt veroorzaakt door het nieuwe coronavirus). De wens om onder deze vergunning experimenten te doen met 2019-nCoV (COVID 2019) past volledig binnen de oorspronkelijke doelstelling. Ook in het belang is niets gewijzigd. De uitbreiding met dit nieuwe virus past geheel binnen de oorspronkelijke aanvraag/vergunning, maar de uitbreiding van het aantal dieren (meer experimenten en bijstelling van de proefopzet) en de hogere ongeriefinschattingen voor een deel van de dieren, vereisen wel een hernieuwde afweging.**

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De instelling heeft een uitgebreide ervaring met het uitvoeren van dit soort testen (in opdracht van derden) en beschikt over gespecialiseerde kennis m.b.t. de gebruikte diermodellen en met de respiratoire infecties die in deze diermodellen kunnen optreden. **De ontwikkeling en het gebruik van een model voor immuun-gecompromiteerd konijn voor klinische uitkomsten voor MERS-CoV profylaxe en therapie wordt gezien als een extra subdoelstelling. Het belang daarvan is dat dit een model zou kunnen zijn voor de mensen die het meeste risico lopen op MERS-CoV infectie (ouderen, diabeten en anderen met een zwakker immuunsysteem).**

**Er zijn geen veranderingen in de gekozen strategie en in de experimentele aanpak. Er worden in deze wijziging alleen meer dieren aangevraagd voor efficacy/challenge experimenten ten behoeve van het testen van door externe partijen aangeleverde vaccinkandidaten en andere antivirale middelen (appendix 6). Voor de ook noodzakelijke inleidende- en pilotexperimenten zijn er in de andere appendices voor de resterende looptijd van dit project nog voldoende dieren beschikbaar.**

5. Er is in wettelijk opzicht geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuzes met betrekking tot deze zaken zijn voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Voor onderzoek aan (antivirale interventiestrategieën tegen) SARS en MERS coronavirus is een aantal diermodellen beschikbaar. Voor SARS betreft dit (transgene) muis, hamster, fret en kat en voor MERS betreft

dit konijn en muis. Afhankelijk van de vooraf beschikbare informatie over het specifieke coronavirus en de uit te testen antivirale interventiestrategieën zal per geval (gebaseerd op een 'informed decision') een keuze voor het te gebruiken diermodel worden gemaakt. Omdat het niet mogelijk is nieuwe uitbraken te voorspellen zijn de in dit projectvoorstel beschreven dierproeven mede gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet, vergelijkbaar met de SARS uitbraak in 2003 en de MERS uitbraak in 2012. Dit kan dan gaan om nieuwe varianten van MERS en SARS, maar ook om een nieuwe coronavirusvariant. Verwacht wordt dat de op MERS gerichte diermodellen (muis en konijn) in dit project het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Fretten en muizen kunnen door de infectie met bekende coronavirussen ademhalingsproblemen krijgen. In de overige diersoorten verloopt de infectie met bekende coronavirussen asymptomatisch. De dieren kunnen ongerief ondervinden als gevolg van de toedienings- en afnameprocedures. De meest ingrijpende handelingen zullen uitgevoerd worden onder verdoving. De klinische symptomen en het daaraan verbonden ongerief in het geval van een infectie met een nieuwe coronavirus is op voorhand nog niet precies in te schatten.

**Er is nog geen model voor een 2019-nCoV infectie. De aanvrager gaat met betrekking tot de ongeriefinschattingen daarom uit van een "worst-case scenario". De aanvrager kiest ervoor, indien mocht blijken dat het ongerief lager uitvalt in het uiteindelijk gekozen diermodel, dit in de vorm van een melding kenbaar te maken. De commissie acht de kans reëel dat achteraf blijkt dat de ethische afweging over deze wijziging gebaseerd is op een te hoge inschatting van het ongerief. De commissie begrijpt echter de keuze die de aanvrager hierin maakt, mede vanwege de grote belangen die op het spel staan en de daarmee samenhangende wens om snel te kunnen inspelen op ontwikkelingen in dit onderzoeksveld. Dieren die het humane eindpunt bereiken worden zo spoedig mogelijk geëuthanaseerd.**

**De cumulatieve aantasting van het welzijn voor de verschillende diermodellen wordt als volgt ingeschat: voor 52% van de muizen als licht, 25% matig en 23% maximaal ernstig; voor 29% van de fretten als licht,**

**35% matig en 35% ernstig; voor 82% van de katten als licht en 18% matig; voor 82% van de hamsters als licht en 18% matig; voor 41% van de konijnen als licht en 54% matig en 5% ernstig. Kortdurend ernstig ongerief is niet geheel uit te sluiten in modellen met klinische symptomen, maar zal tot een minimum beperkt worden door een hoge observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht en het strikt toepassen van de humane eindpunten.**

Het ongerief bij het immuun-gecompromitteerd konijn voor klinische uitkomsten voor MERS-CoV infectie zal matig zijn door de herhaalde toedieningen van prednisolon (per injectie vanwege de groepshuisvesting van de dieren) en de klinische verschijnselen na de challenge met MERS-CoV. Het ongerief wordt niet ernstig door de toepassing van humane eindpunten. Voor welk model uiteindelijk gekozen zal worden voor de vervollexperimenten (het niet- of het wel immuun-gecompromitteerde konijn) is afhankelijk de uitkomsten van de pilot. Dit betekent dat de aantallen dieren en de ongeriefconsequenties in het geval gekozen zou worden voor het immuun-gecompromitteerde konijn op dit moment nog niet te overzien zijn. (zie voorwaarde bij E).

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

**Deze wijzigingsaanvraag voorziet in een aanzienlijke uitbreiding van het aantal dieren in bijlage 6: 1904 extra muizen, 552 extra fretten en 420 extra konijnen. In bijlage 5 wordt het aantal dieren in lichte mate naar beneden bijgesteld, maar dit heeft geen relatie met de aanleiding voor de huidige**

**wijziging (het betreft een rekenfout in de eerdere aanvraag). Aangezien de oorspronkelijke aanvraag al voorzag in de mogelijkheid dat er zich gedurende de looptijd van het project een uitbraak van een nieuw coronavirus zou voordoen en hiermee ook bij de gevraagde aantallen dieren al rekening was gehouden en gezien het feit dat de looptijd van de vergunning over ruim een jaar verstrijkt, heeft de commissie de aanvrager verzocht toe te lichten waarom het aantal experimenten, het aantal groepen dieren per experiment en het aantal dieren per groep nu zoveel hoger wordt ingeschat. De aanvrager heeft aangegeven contact te hebben met een groot aantal bedrijven en instellingen die op korte termijn vaccins en antivirale middelen willen laten testen. De instelling is een van weinige laboratoria die ingericht zijn op het uitvoeren van dit soort efficacy challenge experimenten. Gezien de korte duur van de experimenten wordt de uitvoering van dit aantal experimenten in deze tijdspanne ook realistisch geacht. De huidige situatie is daarnaast ook uitzonderlijk, omdat het nieuwe coronavirus zich veel sneller verspreidt dan SARS en MERS. Ook is het met de huidige technieken mogelijk om veel sneller en eenvoudiger dan in 2016 grote hoeveelheden verschillende vaccinkandidaten en andere antivirale preparaten te ontwikkelen. Er zal naar verwachting in de relatief korte periode tot het einde van de looptijd van de vergunning een grote vraag naar de testen van de aanvrager zijn. De aanvrager heeft dat ook aannemelijk gemaakt. Het grotere aantal groepen per experiment is vooral terug te voeren op de wens om met name in voorbereidende muizenstudies, dus voordat er studies in andere diersoorten worden gedaan, in één experiment meerdere variabelen (meerdere formuleringen, verschillende doseringen) direct tegelijk te kunnen testen. Het aantal dieren per groep is voor de muizenstudies gelijk getrokken met de aantallen in bijlage 5 en de ervaringen in de afgelopen periode. Verder is van belang dat in de muizenstudies het aantal uitleesmomenten relatief klein is en er daarom vaak meer dieren per groep nodig zijn voor significante resultaten. Naar het oordeel van de DEC heeft de aanvrager de aanzienlijke toename van het aantal dieren zorgvuldig onderbouwd.**

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

## D. Ethische afweging

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

Uitbraken van de zgn. SARS en MERS coronavirussen betekenen door de ernstige ziekteverschijnselen en de hoge mortaliteit een serieuze bedreiging voor de volksgezondheid en leveren bovendien aanzienlijke economische schade op, tot nu toe met name in de Aziatische landen. Op dit moment is de SARS-uitbraak onder controle, maar voor de MERS-epidemie is dit nog niet het geval. Bovendien is het reëel te verwachten dat zich binnen de komende 5 jaar een nieuwe uitbraak zal voordoen van een variant van het SARS of MERS virus dan wel van een nieuw coronavirus. Op dit moment zijn er nog geen specifieke antivirale interventiemiddelen tegen SARS of MERS geregistreerd voor gebruik. Er is derhalve grote behoefte aan vaccins en antilichaampreparaten of antivirale middelen die, al dan niet gecombineerd, voor preventie en behandeling kunnen worden ingezet. Wereldwijd wordt er naar gestreefd toekomstige vergelijkbare coronavirusuitbraken in een vroeg stadium te detecteren zodat de ontwikkeling van bestrijdingsmethoden zo snel mogelijk kan worden opgestart. Het is in dat kader van belang om snel over een diermodel te kunnen beschikken dat ingezet kan worden om de ontwikkeling van antivirale interventiestrategieën te ondersteunen. **De wijzigingsaanvraag(3) past geheel binnen de hoofddoelstelling van het project.**

De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. Naar het oordeel van de DEC dient dit project een substantieel belang. **De omstandigheden die aanleiding geven tot deze wijziging onderstrepen dit belang nog eens.**

Tegenover dit belang staat het feit dat alle dieren in de experimenten een zekere mate van welzijnsaantasting zullen ondervinden. De mate hiervan is afhankelijk van het te kiezen diermodel en het desbetreffende coronavirus. Voor **ongeveer de helft** van de dieren is een geringe aantasting van het welzijn te verwachten, **terwijl voor de overige dieren rekening gehouden wordt met** een matige dan wel ernstige aantasting van het welzijn.

De commissie is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling is gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende

ongerief is naar het oordeel van de commissie onvermijdelijk, wil men de doelstellingen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hierboven geschetste substantiële belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan. **De gevraagde wijziging(3) verandert de uitkomst van de oorspronkelijke afweging niet.**

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

**X De DEC adviseert de vergunning aan te passen overeenkomstig de voorgestelde wijziging(3).**

~~X De DEC adviseert om in de gewijzigde vergunning de volgende voorwaarde op te nemen:~~

~~Vanwege de onzekerheid rond de uitkomst van de pilot experimenten en de keuze voor het model voor de vervolgexperimenten is de commissie tot de conclusie gekomen dat zij op dit moment geen verantwoorde afweging kan maken over de vervolgexperimenten. Deze onzekerheid heeft zowel betrekking op de aantallen dieren als op het te verwachten ongerief. De vergunninghouder dient na evaluatie van de pilot kenbaar te maken van welk konijnenmodel in het project verder gebruik zal worden gemaakt en op welke overwegingen deze keuze is gebaseerd. In het geval gekozen wordt voor het immuun-gecompromitteerde model dienen op basis van de resultaten van de pilot de consequenties in termen van aantallen dieren en aantasting van welzijn helder te worden gemaakt. Voordat hierover aanvullend door de DEC aan de CCD is geadviseerd kunnen de vervolgexperimenten niet worden gestart.~~

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

**Het uitgebrachte advies voor wijziging(3) is gebaseerd op consensus.**



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Antivirale interventiestrategieën tegen coronavirussen
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Coronavirus, antiviraal, vaccins, infectie, bestrijding

## 2 Categorie van het project

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

## 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Uitbraken met nieuwe coronavirussen hebben in de afgelopen 15 jaar uitbraken tot gevolg gehad met hoge sterftecijfers: 10% tot 35% van de geïnfecteerde mensen overleed. Het ging in deze gevallen om uitbraken met de zogenaamde SARS en MERS coronavirussen die vanuit dieren overgedragen werden op mensen, waarna mens-op-mens overdracht de uitbraak verergerde. Maar ook voor de huidige uitbraak van 2019-nCoV zijn op dit moment (10 februari 2020) meer dan 40000 bevestigde gevallen bekend in op dit moment 26 verschillende landen met meer dan 900 doden (ongeveer 2%). Voor de ontwikkeling van middelen en methoden om deze coronavirusinfecties te kunnen bestrijden is het van belang om deze uit te testen in diermodellen voordat deze in de mens kunnen worden toegepast. Naast de nu bekende coronavirussen wordt in dit project ook rekening gehouden met de mogelijkheid dat een uitbraak met een nieuw coronavirus zich gedurende de looptijd zou kunnen voordoen, zoals bijvoorbeeld de
---	--



huidige uitbraak van 2019-nCoV en waarvoor op dit moment geen interventie strategie beschikbaar is om in te zetten tegen deze wereldwijde uitbraak. Dit project heeft als doel om de werkzaamheid van antivirale interventiestrategieën (antivirale middelen, vaccins) tegen huidige én nieuwe coronavirusinfecties te bepalen in beschikbare modellen.

De huidige wijziging van de project aanvraag omhelst een verhoging van het aantal dieren om interventiestrategieën uit te testen, waarbij het aantal dieren voor modelontwikkeling en voorstudies gelijk blijft en voldoende is. De verhoging houdt rekening met 20 dierstudies per hierna genoemde diersoort in de resterende looptijd van het project voor muizen, fretten en konijnen, diermodellen die gekozen zijn in vergelijking met eerdere coronavirus uitbraken. Deze grote verhoging is onder andere door de snelheid waarmee het virus zich verspreid en dus een behandeling noodzakelijk is, maar ook vanwege de nieuwe manieren die beschikbaar zijn om snel deze interventiestrategieën te ontwikkelen.

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

De resultaten verkregen in de studies van dit project dragen bij aan de ontwikkeling en registratie van antivirale interventiestrategieën tegen coronavirusinfecties: het bepalen van de werkzaamheid ervan in diermodellen is een essentiële schakel in het ontwikkelingstraject van een in de mens toepasbaar medicijn. De zo verkregen antivirale interventiestrategieën kunnen vervolgens ingezet worden tegen actuele en mogelijk ook toekomstige uitbraken van coronavirussen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

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 gebruik van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. In verband met de huidige uitbraak van 2019-nCoV zijn de aantallen voor de in dit geval meest relevante diermodellen verhoogd (muis, fret en konijn)

Muis: 3637  
Fret: 1020  
Kat: 468  
Hamster: 468  
Konijn: 1500

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

In fretten, konijnen met een verzwakt immuunsysteem en enkele muizenmodellen kunnen zich door de infectie met de bekende coronavirussen (ernstige) ademhalingsproblemen en benauwdheid voordoen. In de overige diersoorten verloopt de infectie met bekende coronavirussen asymptomatisch, d.w.z. dat dieren geen ziekteverschijnselen vertonen. In eerste instantie is de symptoom-omschrijving en ongeriefinschatting voor het nieuwe coronavirus overgenomen van de reeds beschreven coronavirussen (SARS en MERS) en eerste studies met het nieuwe virus moeten uitwijzen of dit nieuwe virus zich hetzelfde gedraagt qua symptomen en ongerief.

Daarnaast kunnen de dieren ongerief ondervinden als gevolg van toedienings- en afnameprocedures. Dit ongerief wordt licht tot matig geschat.

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

Muis: 52% licht, 25% matig en 23% ernstig  
Fret: 29% licht, 35% matig en 35% ernstig  
Kat: 82% licht en 18% matig  
Hamster: 82% licht en 18% matig  
Konijn: 41% licht, 54% matig en 5% ernstig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren zullen aan het einde van de proef gedood worden om in weefsels te kunnen kijken of de infectie met coronavirussen aan te tonen is en of deze infectie daar schade heeft veroorzaakt.

## 4 Drie V's

### 4.1 Vervanging

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

Voordat de effectiviteit van antivirale middelen, antistoffen en vaccins tegen coronavirusinfecties in een relevant diermodel wordt getest zijn eigenschappen die van belang zijn voor de werkzaamheid van het middel getest in laboratoriumproeven zonder gebruik van proefdieren. Indien de resultaten van deze experimenten beschikbaar zijn zullen deze genoemd worden in het betreffende werkprotocol.

Voor de in dit project gebruikte diermodellen kan de effectiviteit van de antivirale middelen, antistoffen dan wel vaccins enkel getest worden in het intacte dier met een al dan niet functionerend afweersysteem.

### 4.2 Vermindering

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

Inschatting van het aantal benodigde dieren is mede bepaald door soortgelijke studies uitgevoerd voor vergelijkbare (corona)virusinfecties. Omdat de te gebruiken virussen betrekkelijk nieuw zijn wordt nog veel nieuwe informatie gegenereerd tijdens de beschreven studies. Indien hieruit blijkt dat de studies met minder dieren dan oorspronkelijk ingeschat kunnen worden uitgevoerd zal dit worden toegepast. Er zijn keuzemomenten ingebouwd om studies al dan niet door te zetten.

In verband met het nieuwe coronavirus, zal ook contact gehouden worden met het internationale netwerk van deskudigen en verschillende internationale samenwerkingsprojecten, zodat vroegtijdig informatie gedeeld kan worden over de werkzaamheden bij verschillende onderzoeksgroepen.

### 4.3 Verfijning

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

Voor deze antivirale interventiestrategieën zijn testen op mensen niet mogelijk, waardoor werkzaamheid tegen coronavirusinfecties alleen in proefdieren aangetoond kan worden. Voor de beschreven modellen zijn het verloop van de coronavirusinfecties en het eventuele ziektebeeld onderzocht.

In het kader van het nieuwe coronavirus zal een gedetailleerde beoordeling gedaan worden na infectie om te bepalen wat de ernst na infectie is. Op basis hiervan kan bijvoorbeeld de ernst aangepast worden in toekomstige experimenten.

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

De dieren worden standaard gehuisvest in groepen met kooiverrijking en minimaal eenmaal per dag gecontroleerd. De meest ingrijpende handelingen zullen uitgevoerd worden onder verdoving. Bij het bereiken van humane eindpunten die vooraf zijn vastgelegd, zullen de dieren worden geëuthanaseerd.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

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

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

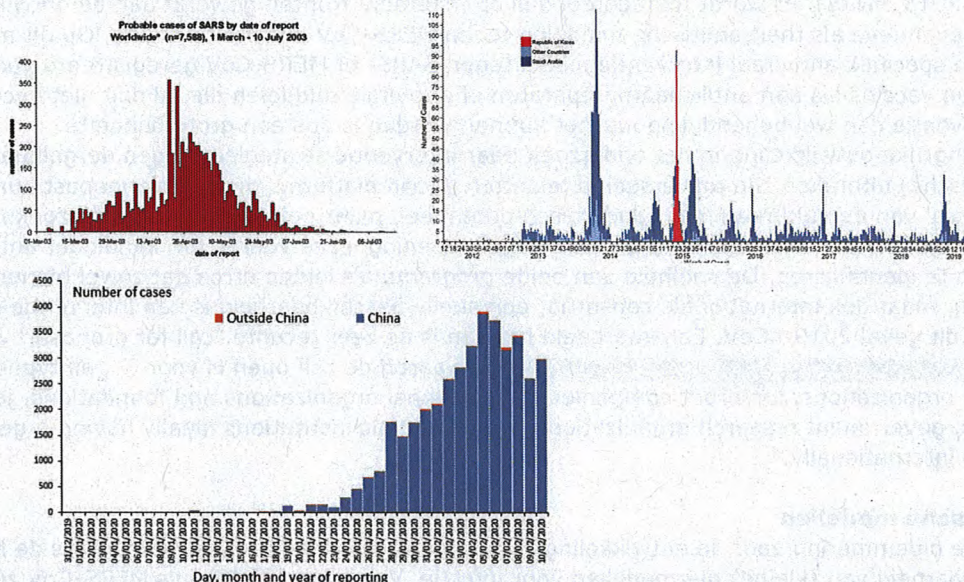
### **Coronavirussen, achtergrond en uitbraken.**

Leden van de virusfamilie *Coronaviridae* infecteren een breed scala aan diersoorten waarbij voor de meeste virussen geldt dat infectie, replicatie en verspreiding voorbehouden zijn aan een specifieke gastheersoort (Masters, 2013, Field's Virology). Humane coronavirussen veroorzaken in de mens doorgaans zelflimiterende infecties van de luchtwegen. Desalniettemin hebben zich in de afgelopen 18 jaar drie coronavirus (CoV)-uitbraken voorgedaan met grote gevolgen voor maatschappij, economie en volksgezondheid van de getroffen gebieden: SARS-CoV in China in 2002-2003, MERS-CoV in het Midden-Oosten (voornamelijk Saoedi Arabië) vanaf 2012 en 2019-nCoV in China vanaf begin 2020. In alle uitbraken was er sprake van dierlijke virussen die de soortbarrière overstaken (zoönotische transmissie). In het eerste geval werd vóór de identificatie van de veroorzaker de ziekte door de WHO gedefinieerd als Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). Geïnfecteerde patiënten vertoonden ernstige respiratoire symptomen die in een significant deel van hen leidde tot de dood. Door een sterk internationaal klinisch wetenschappelijk samenwerkingsoffensief werd in korte tijd de identificatie van het etiologische agens uitgevoerd, die de naam SARS-CoV kreeg (10.2.e). Epidemiologisch onderzoek toonde aan dat in het geval van SARS-CoV nauw verwante virussen aangetroffen werden in wilde dieren die op markten verhandeld werden. Deze herhaalde blootstelling van de mens heeft aan de zoönotische transmissie van het virus bijgedragen, waarbij de verhandelde dieren waarschijnlijk eerder doorgeefluik van het virus vormden dan de bron van het virus. De meest waarschijnlijke bron voor SARS-CoV is de vleermuis, waarvoor recent een virus geïdentificeerd is waarvan het genetisch materiaal voor 95% overeenkomt met de humane isolaten en dat gebruik maakt van dezelfde receptor (Ge, 2013, Nature). Voor de verspreiding van het SARS-CoV bleken zogenaamde "super spreading" events kenmerkend te zijn: geïnfecteerde individuen die het virus in korte tijd overdroegen naar tientallen mensen, veelal familieleden en ziekenhuispersoneel. Mens-op-mens transmissie bleek een feit. Reizende geïnfecteerde individuen vormden vervolgens de bron voor uitbraken op meerdere continenten binnen een tijdsbestek van een paar maanden. SARS-CoV verspreidde zich aldus via vliegtuigroutes waarbij uiteindelijk 8000 mensen geïnfecteerd werden in 25 landen (WHO). Met 800 doden bedroeg de mortaliteit 10%. In afwezigheid van specifieke reagentia tegen dit nieuwe virus was de belangrijkste wijze waarop de globale epidemie uiteindelijk kon worden ingedamd dan ook door strikte toepassing van maatregelen die erop gericht waren verspreiding te stoppen: strikte toepassing van hygiënemaatregelen, quarantaine van patiënten, uitgebreide tracering van personen waarmee geïnfecteerde in contact waren geweest, etc. Hierdoor kon de WHO in juli 2003 mededelen dat mens-op-mens overdracht van het virus en daarmee de verspreiding tot een halt was gebracht.

Tien jaar later werd opnieuw een zeer pathogeen coronavirus bij de mens geïdentificeerd (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV), dat sterk lijkt op het SARS-coronavirus. Het virus werd voor het eerst in mensen geïdentificeerd in 2012 in patiënten met een acute longontsteking. Vervolgens werd het virus aangetoond in dromedarissen, van waaruit zoönotische transmissie de infectie bij de mens kan veroorzaken. In dromedarissen verloopt de infectie grotendeels asymptomatisch. Net als bij SARS greep de epidemie om zich heen als gevolg van mens-op-mens transmissie, met name in ziekenhuizen, en liet vanaf 2014 een duidelijke toename zien (Zaki, 2012; WHO MERS-CoV Research Group 2013; 10.2.e). Het scenario dat zich bij de SARS epidemie van een decennium eerder had voorgedaan, leek zich ook voor MERS te gaan ontrollen. Het virus veroorzaakt een ernstige lagere luchtweginfectie. Er zijn op dit moment 2494 globale gevallen geregistreerd bij de WHO (status september 2015), met een mortaliteit van >35% (912 doden). SARS manifesteerde zich indertijd als een infectieziekte in verder gezonde individuen. Bij MERS is in de meeste gevallen sprake van comorbiditeit

en doet de aandoening zich vooral voor bij ouderen of mensen met een verzwakt immuunsysteem. In tegenstelling tot de SARS uitbraak in 2003 is de MERS epidemie nog altijd niet onder controle.

Begin 2020 diende zich een derde uitbraak van een coronavirus aan welke begon in de provincie Hubei, China. Net als bij SARS-CoV en MERS-CoV vind het nieuwe coronavirus zijn oorsprong in een dierlijk reservoir en voorspeld wordt dat net als bij SARS-CoV vleermuizen, maar met het grote verschil op de snelheid waarmee de infectie zich verspreid binnen de bevolking. Ter informatie zijn hieronder de epidemiologische curves weergegeven van SARS-CoV (linksboven), MERS-CoV (rechtsboven) en 2019-nCoV (onder) waarin gezien kan worden dat de infectie zich inderdaad veel sneller verspreid dan de eerdere coronavirus uitbraken met SARS-CoV en MERS-CoV.



Tot op heden (10 februari 2020) zijn er ruim 40000 gediagnosticeerde gevallen van 2019-nCoV met een mortaliteit van meer dan 2% (>900 doden). Vanwege de snelle verspreiding van dit virus binnen China, maar ook in de rest van de wereld (tot op heden in 24 andere landen), heeft de wereldgezondheidsorganisatie de uitbraak van 2019-nCoV bestempeld als de zesde PHEIC (Public Health Emergence of International Concern) na bijvoorbeeld mexicaanse griep in 2009 en Zika virus in 2015-16.

### Bestrijding en ontwikkeling van antivirale middelen en vaccins

In afwezigheid van effectieve antivirale middelen bestond de bestrijding van de SARS uitbraak vooral uit het gebruik van breed spectrum antibiotica om secundaire bacteriële infecties te voorkomen. Ze vormden hiermee een aanvulling op de ondersteunende behandelingsprotocollen (Cheng, 2013, Antiviral Res). Omdat de uitbraak door strikt klinisch management binnen een aantal maanden succesvol onder controle gebracht werd verdween de noodzaak om de ontwikkeling van specifieke antivirale middelen en behandelmethoden te onderzoeken en uit te voeren zowel bij wetenschappers als de beleidsmakers. Dit is vervolgens in het licht van de MERS-CoV uitbraak dan ook gezien als een gemiste kans (Hilgenfeld & Peiris en Cheng, 2013, Antiviral Res). Er werden aldus beperkt initiatieven ontplooid om onderzoek naar therapeutische en profylactische middelen door te zetten. Het gevolg hiervan was dat er op het moment van de MERS-uitbraak geen specifieke middelen voorhanden waren. Men moest terugvallen op de behandelmethoden die indertijd ook als eerste defensiemiddel werden ingezet en waarvan de daadwerkelijke effectiviteit in onderzoeken achteraf discutabel bleek. In recent onderzoek is aangetoond dat Type I interferon en ribavirine (een breed spectrum antiviraal middel) ziekteverschijnselen in MERS-CoV geïnfecteerde makaken kunnen reduceren (Falzarano, 2013). Van een aantal zogenaamde small compounds is in vitro aangetoond dat ze MERS-CoV replicatie kunnen remmen (o.a. Adedeji, 2014; █)

**10.2.e** Dit zijn de eerste aanknopingspunten om gerichte ontwikkeling van coronavirus specifieke antivirale middelen weer op te pakken en door te zetten. Voor zowel SARS-CoV als MERS-CoV wordt een tweetal virale proteases als belangrijkste targets voor de ontwikkeling van antivirale middelen gezien.

Echter, tot dusver is nog geen enkel van deze op basis van in vitro modellen ontwikkelde compounds door een preklinisch ontwikkelingsprogramma gekomen (Hilgenfeld, 2014, FEBS J). Vaccinontwikkeling tegen MERS-CoV is gestart waarbij de meest gekozen benadering is om antilichamen op te wekken tegen het spike (S) eiwit. Dit eiwit zorgt door middel van interactie met receptormolecuul DPP4 voor infectie (Du & Jiang, 2015, Expert Opin Biol Ther). Aangetoond is dat virus-neutraliserende antistoffen betrokken zijn bij de reductie van longpathologie en bescherming tegen MERS-CoV infectie (Zhang, 2015, Cell Mol Immunol; Zhao, 2015, JVI; Pascal, 2015, PNAS). Deze recente resultaten laten zien dat de ontwikkeling van een effectief MERS-CoV vaccin haalbaar lijkt. Virus neutraliserende monoklonale antistoffen zouden ontwikkeld kunnen worden voor toekomstig gebruik als een profylactisch middel om bijvoorbeeld ziekenhuispersoneel of familieleden van patiënten preventief te behandelen (Pascal, 2015, PNAS). Er wordt momenteel dus op meerdere fronten gewerkt aan de ontwikkeling van zowel preventieve als therapeutische middelen tegen MERS-CoV infectie en ziekte. Op dit moment is er nog geen specifiek antiviraal interventiemiddel tegen SARS- of MERS-CoV geregistreerd voor gebruik. Zowel aan vaccins als aan antilichaampreparaten of antivirale middelen die, al dan niet gecombineerd, voor preventie dan wel behandeling ingezet kunnen worden is dus een grote behoefte. Een belangrijke ontwikkeling in het onderzoek naar interventie strategieën tegen dergelijke (mogelijk pandemische) uitbraken zijn universeel in te zetten vaccin platforms die snel aangepast kunnen worden in het geval van een uitbraak met pandemisch potentieel, maar ook binnen het onderzoek naar antivirale middelen zijn er ontwikkelingen om grootschalige screening uit te voeren om kandidaat antivirale middelen te identificeren. De snelheid van beide programma's leiden ertoe dat zowel binnen commerciële bedrijven, maar ook internationale consortia, een snelle beschikbaarheid is van interventie strategieën tegen in dit geval 2019-nCoV. Een voorbeeld hiervan is de zeer recente "call for proposal" van [10.2g](#) waarbij de call open is voor "... all types of non-profit research organizations, for-profit companies, international organizations and foundations, joint R&D ventures, government research organizations, and academic institutions ideally having a geographical footprint internationally."

### **Preklinische modellen**

Een grote belemmering voor de ontwikkeling van de gewenste interventiestrategieën is de beperkte beschikbaarheid van (kleine) diermodellen voor infectie. Voor zowel SARS- als MERS-CoV zijn modellen ontwikkeld in non-humane primaten (NHP). Deze modellen zijn op ethische en praktische gronden voor de studies in dit projectvoorstel niet geschikt. Voor SARS-CoV infectie is een aantal diermodellen beschikbaar. Fretten, katten [10.2e](#) hamsters (Roberts, 2005, JVI) en muizen (Roberts, 2005, JVI) zijn te infecteren met SARS-CoV isolaten en bruikbaar voor het uitvoeren van de studies in dit projectvoorstel. Klinische verschijnselen als gevolg van de SARS-CoV infectie zijn in deze diermodellen in verschillende mate geobserveerd; in katten verloopt de infectie grotendeels asymptomatisch, evenals in jonge Balb/c muizen. In oudere Balb/c muizen, fretten en hamsters zijn klinische verschijnselen gerapporteerd. Daarnaast zijn er additionele modellen in muizen gegenereerd op basis van transgene modellen (Tseng, 2007, JVI) dan wel aan de muis geadapteerde virusstammen (Day, 2009, Virology; Roberts, PLoS Path, 2007). Ook deze modellen zijn inzetbaar om de doelstellingen van dit projectvoorstel te halen.

Voor MERS-CoV infectie zijn dromedarissen om praktische redenen geen bruikbaar model. Onderzoek heeft aangetoond dat soort-specifieke variaties in de cellulaire receptor van MERS-CoV (DPP4) verantwoordelijk zijn voor het al dan niet kunnen binden van het virus en hiermee bepalen of een gastheer al dan niet geïnfecteerd kan worden. Hieruit is gebleken dat er geen binding plaatsvindt aan de het DPP4 molecuul van diersoorten als de fret, muis, rat, hamster, en cavia. Middels dit *in vitro* vooronderzoek werd het konijn als bruikbaar diermodel voor MERS-CoV infectie geïdentificeerd, op basis van een relatief geconserveerde receptor t.o.v. die in de mens. Dit is vervolgens in vivo onderzocht en bevestigd. Net als in dromedarissen en kamelen laten MERS-CoV geïnfecteerde konijnen een bovenste luchtweginfectie zien [10.2e](#) Daarnaast bleek er ook in de onderste luchtwegen van het konijn virus aanwezig te zijn. Opvallend is dat de konijnen geen klinische symptomen laten zien na infectie met MERS-CoV (net als in dromedarissen en kamelen). Dit is tevens een beperking voor het gebruik van conventionele konijnen omdat alleen de replicatie van het MERS-CoV in relevante weefsels kan worden bestudeerd terwijl er geen uitspraken over klinische verschijnselen kunnen worden gemaakt. Echter voor het uittesten van nieuwe vaccins en/of antivirale geneesmiddelen ter behandeling van MERS-

CoV is een diermodel, dat klinische verschijnselen vertoont, van groot belang. Voor het opzetten van een MERS-CoV model in konijnen, waarin klinische verschijnselen kunnen worden bestudeerd, zal gebruikt worden gemaakt van immuun gecompromitteerde konijnen. Er zijn aanwijzingen in de literatuur, dat de afwezigheid van een functioneel immuunsysteem vaker tot klinische verschijnselen leidt na een MERS-CoV infectie dan in mensen met een goed functionerend immuunsysteem.

Studies hebben aangetoond, dat het immuun systeem, voornamelijk het innate immuun systeem, van groot belang is voor de bescherming tegen MERS-CoV infectie (Faure 2014 PLOS one). Voornamelijk concentraties van interferon alpha, een pro-inflammatoir cytokine, zijn bekend om te correleren met verhoogde overleving van MERS-CoV patiënten (Faure 2014 PLOS one). Daarnaast hebben een groot aantal MERS-CoV patiënten chronische ziekten zoals diabetes, hypertensie of obesitas (Badawi 2016 international journal of infectious diseases). Deze aandoeningen hebben o.a. een remmend effect op het (innate) immuunsysteem (Odegaard 2012 Cold Spring Harbor Perspect Med). Daarom zou, net als bij de mens, een verzwakt immuunsysteem in konijnen kunnen leiden tot het optreden van klinische verschijnselen en ziekte na MERS-CoV infectie. Het hier beschreven immuunsuppressie model (IC konijn) zal kunnen worden gebruikt voor het uittesten van nieuwe interventie strategieën bij MERS-CoV. Door behandeling met prednisolon zal het innate immuunsysteem van de konijnen worden geremd (Bautista et al. , 1996, JPGN; Davis, 1971 ann. Rheum. Dis.). In een pilot experiment zal bestudeerd worden of immuunsuppressie leidt tot het optreden van klinische verschijnselen na een MERS-CoV infectie. Alleen als door de behandeling met prednisolon een MERS-CoV model kan worden opgezet dat beter de klinische fenotype in de mens nabootst in tegstelling tot gezonde konijnen zal met het immunogecompromitteerd konijnen model worden gewerkt. Bij een negatieve resultaat van het pilot experiment, namelijk de afwezigheid van klinische verschijnselen bij een verzwakt immuunsysteem, zal dit model binnen deze projectvoorstel niet meer verder worden gebruikt (bijvoorbeeld voor het uittesten van interventie strategieën) maar zal nog wel onderzoek worden gedaan met het niet immunogecomprimeerde konijn.

Naast het preklinische konijnenmodel voor MERS-CoV infectie is er ook een zogenaamd knock-in muizenmodel beschikbaar (Pascal, 2015, PNAS). Dit muizenmodel is gegenereerd door het gen dat codeert voor DPP4 te vervangen door het menselijke DPP4 gen (knock-in). Omdat het gen dat codeert voor menselijk DPP4 in dit muizenmodel onder controle staat van fysiologisch relevante transcriptiemechanismen wordt het gen enkel tot expressie gebracht in de respiratoire weefsels van de knock-in muis. Respiratoire challenge infectie met MERS-CoV leidt net als in dromedarissen (en eerdergenoemde konijnen) tot replicatie van het virus in luchtweg- en longweefsel. Ook in dit model werden geen klinische verschijnselen geobserveerd. Anders dan bij de konijnen is in dit muizenmodel wel sprake van histopathologische afwijkingen in de longen van geïnfecteerde dieren die overeenkomen met die in geïnfecteerde patiënten.

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

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

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

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van MERS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (Pascal, 2015, PNAS), (IC) konijn **10.2.e**

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken met nieuwe coronavirusvarianten (X-CoV) zal in potentie gebruikt gemaakt kunnen gaan worden van elk van de opgevoerde modellen. Middels (pilot) dose finding studies zal het meest geschikte model geselecteerd worden, op basis van aantoonbare virusreplicatie in het betreffende model na infectie met deze nieuwe coronavirusvarianten. 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. Of het huidige virus, 2019-nCoV, ook



daadwerkelijk kan repliceren en ziekteverschijnselen induceert in de voorgestelde diermodellen is nog niet duidelijk, maar indien beschikbaar zal dergelijke informatie gebruikt worden om bijvoorbeeld humane eindpunten verder te verfijnen of afname schema's aan te passen. De samenwerking met verschillende onderzoekers, bv. 10.2.e, maar ook internationale consortia, bv. 10.2.g, moeten ervoor zorgen dat beschikbare kennis gedeeld wordt onder andere in het kader van vermindering van proefdier gebruik.

De aanvrager voert deze studies uit als een zgn. CRO voor derden. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. Echter, hier is geen rekening gehouden met het feit dat in de afgelopen jaren meerdere snel inzetbare interventie strategieën ontwikkeld zijn en kunnen worden wat inhoudt dat bij de huidige uitbraak deze kandidaat interventie strategieën snel ingezet kunnen worden. Een gunstige ontwikkeling aangezien het epidemisch verloop van de infectie vele malen sneller is dan eerdere uitbraken met SARS-CoV en MERS-CoV.

#### **Paraatheid**

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

Binnen onderzoeksprojecten als 10.2.g en globale surveillance initiatieven als 10.2.g wordt wereldwijd gekeken of er zich mogelijk nieuwe virusuitbraken zouden kunnen voordoen. Enerzijds betekent dit het karakteriseren van virussen bij dieren die mogelijk kunnen overspringen naar de mens en anderzijds het karakteriseren van nieuwe virussen bij de mens en het ontwikkelen van interventiestrategieën. In de context van dit soort initiatieven wordt getracht een staat van paraatheid te verkrijgen die tot doel heeft toekomstige coronavirusuitbraken vergelijkbaar met SARS- en MERS-CoV in een vroeg stadium te detecteren zodat ontwikkeling van bestrijdingsmethoden zo snel mogelijk kan worden opgestart. Voor deze nieuwe coronavirussen (X-CoV) is het dus wenselijk om snel een diermodel te kunnen selecteren dat ingezet kan worden om de ontwikkeling van antivirale interventiestrategieën te ondersteunen. Daarnaast zijn er verschillende internationale consortia (zoals 10.2.e) die zich richten op snelle vaccin ontwikkeling in het kader van een pandemische dreiging en derhalve snel ingezet kunnen worden om een specifiek vaccin op de markt te brengen door op voorhand het vaccin concept te licenseren, waarbij de specifieke component van het vaccin uitwisselbaar is. Bovendien zijn er daarnaast ook meerdere platforms die onderzoek doen naar (a)specifieke antivirale strategieën, waarbij voorwerk in vitro mogelijk is om snel een screening uit te voeren of een bepaald antiviraal middel werkzaam is tegen bijvoorbeeld 2019-nCoV. Zo ja, dan kunnen dergelijke antivirale middelen na preklinische testen snel ingezet worden als interventie strategie.

NB: in de huidige wijziging van de project vergunning is een aanzienlijke verhoging gevraagd voor het testen van interventie strategieën tegen het 2019-nCoV en ondanks het feit dat de resterende looptijd van dit project nog maar 1 van de vergunde 5 jaar is, is het de verwachting (mede ook op basis van

bovenstaande informatie over de snelheid van het virus, maar ook de snelheid waarmee nieuwe interventie strategieën ontwikkeld kunnen worden) dat in het komende jaar dit hoge aantal dieren nodig is om kandidaat interventie strategieën te onderzoeken op hun werkzaamheid. Deze berekening is onder andere gericht op het aantal bedrijven en internationale consortia (tot nu toe 12-13) die direct of indirect al aangegeven hebben dat bij het beschikbaar zijn van een model voor 2019-nCoV, ze daadwerkelijk ook interventie studies willen uitvoeren zoals omschreven in Appendix 6.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

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

De doelstelling wordt haalbaar geacht omdat de aanvrager ervaring heeft met diermodellen voor coronavirusinfecties zoals SARS-CoV in fretten en katten **10.2.e** en MERS-CoV in konijnen **10.2.e**. Daarnaast heeft de aanvrager uitgebreide ervaring op het gebied van respiratoire infecties in de beschreven diermodellen zoals infecties met influenza in muizen, fretten en katten, infectie met HRSV in muizen en fretten, infecties met HMPV in hamsters, maar ook het opzetten van immuunsuppressie modellen voor influenza en HRSV. Afhankelijk van het middel dat onderzocht gaat worden en de vraagstelling die de opdrachtgever(s) van de studies beantwoordt wenst (wensen), zal een keuze voor één van de modellen gemaakt worden. De overwegingen die hierin een rol spelen (te onderzoeken agens, toedieningsroutes en volumes, gewenste uitleesparameters) zullen bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD onderbouwd worden.

Ondanks dat voor de relatief korte resterende looptijd van het project een aanzienlijke verhoging aangevraagd wordt, is het haalbaar om deze experimenten uit te voeren. Over het algemeen is bij dergelijke studies het verhoogde inperkingsnivo (klasse 3) waaronder gewerkt dient te worden na infectie kort en behelst een periode van maximaal een week, terwijl in de aanloop fase (bijvoorbeeld een vaccinatie fase) voor een langere tijd de dieren gehuisvest zullen worden onder klasse 2 inperking (in een prime-boost regime een periode van bijvoorbeeld 7-8 weken). Vanwege de korte tijdsduur van de verhoogde inperking, kunnen dus meerdere studies in parallel ingezet worden en vervolgens kunnen de dieren geïnfecteerd worden voor het bestuderen van de werkzaamheid. Ook het gebruik van bijvoorbeeld transgene muizen hoeft geen belemmering te zijn aangezien hiervoor meerdere opties beschikbaar zijn, namelijk commercieel aanschaffen of transgeen maken via relevante vectoren.

### 3.3 Belang

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

Een zoönotische transmissie en een daarop volgende transmissie van mens-op-mens van een virus kan zeer grote gevolgen hebben, zoals de uitbraken met hoog pathogene coronavirussen in de afgelopen jaren hebben aangetoond. Naast desastreuze effecten voor de gezondheid van de mens (10% en 35% mortaliteit voor SARS- resp. MERS-CoV) had deze uitbraak een enorme impact op de economie (voornamelijk in de Aziatische landen).

Op dit moment is de spreiding van MERS-CoV nog niet onder controle. Het virus maakt nog altijd slachtoffers in de regio in het Midden-Oosten waarin het voor het eerst werd geïdentificeerd met inmiddels meer dan 2400 gerapporteerde gevallen, waarvan ruim 900 fataal. Daarnaast deed zich eerder dit jaar de situatie voor dat een geïnfecteerde reiziger de bron was van een snel om zich heen grijpende uitbraak in Zuid-Korea waarbij in korte tijd 186 individuen geïnfecteerd raakten. De directe maatschappelijke gevolgen hiervan waren groot omdat drastische maatregelen nodig waren om deze

uitbraak in te dammen: opsporen van hen die in contact waren geweest met geïnfecteerde individuen maar ook monitoring- en verstrekende quarantainemaatregelen. Een aanzienlijk deel, in het geval van Zuid-Korea het grootste deel, van de besmettingen wordt opgelopen in ziekenhuissituaties. Met de juiste hygiënemaatregelen is een goede inperking van de verspreiding mogelijk, maar het gebrek aan antivirale middelen maakt efficiënte en doelgerichte bestrijding van deze uitbraken moeilijk en belastend. Hoe de MERS-CoV epidemie zich verder zal ontwikkelen is onduidelijk maar zolang ze niet onder controle is, blijft het risico aanzienlijk dat uitbraken zoals in Zuid-Korea zich zouden kunnen voordoen op iedere plaats in de wereld.

Duidelijk is dus dat er een grote noodzaak is om interventiestrategieën tegen (toekomstige) uitbraken van hoog pathogene coronavirussen zoals SARS- en MERS-CoV te ontwikkelen. De recente MERS-CoV epidemie laat zien dat het wenselijk is om paraat te zijn om toekomstige uitbraken met al dan niet nieuwe coronavirussen adequaat te kunnen bestrijden. In het kader van globale paraatheid tegen toekomstige uitbraken met hoog pathogene coronavirussen is het van groot belang om de ontwikkeling van deze strategieën door te zetten en alle mogelijkheden daartoe in te zetten (Hilgenfeld & Peiris, 2013, Antiviral Res). In eerste instantie is er een duidelijke behoefte aan antivirale middelen (antilichaampreparaten, antivirale middelen) die ingezet zouden kunnen worden om een uitbraak in ontwikkeling in te kunnen dammen en onder controle te krijgen. Niet alleen patiënten, maar zeker ook het ziekenhuispersoneel vormen concrete doelgroepen voor deze middelen. Verder geldt dat er zowel behoefte is aan preventieve als therapeutische producten. De ontwikkeling van een vaccin zou een belangrijke bijdrage leveren aan de preventieve behandeling van vele doelgroepen: zij die werkzaam zijn in de bedrijfstakken waarin blootstelling aan coronavirussen het geval is, hun directe contacten, ziekenhuispersoneel maar ook patiënten die opgenomen worden in een ziekenhuis waarin patiënten geïnfecteerd met coronavirussen in behandeling zijn, reizigers, etc. Het is ook niet ondenkbaar dat, gelijk aan de post-exposure profylactische behandeling van blootstelling aan rabiësvirus, een combinatie van farmaca en vaccin een effectieve behandelingsstrategie tegen coronavirusinfecties zal blijken.

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

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

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

De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, (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 antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van SARS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat. In fretten en katten is aangetoond dat SARS-CoV in deze dieren kan repliceren – het virus is in beide

modellen aantoonbaar aanwezig in respiratoire monsters (10.2.e) en de pathologische verschijnselen zijn beschreven (10.2.e). Deze modellen zullen dan ook voornamelijk gebruikt kunnen worden in het geval van een nieuwe SARS-CoV uitbraak of in het geval van een uitbraak met een nieuw, nog onbekend CoV – waarbij in pilot (dose finding) experimenten getest kan worden of één van deze modellen geschikt zou zijn om antivirale interventiestrategieën tegen deze coronavirusvarianten op hun werkzaamheid te testen. Enkel als de pilot dose finding experimenten laten zien dat deze modellen geschikt zijn zal van deze modellen gebruik gemaakt worden van de overige modules in het project/de flowchart.

In het geval het antivirale interventiestrategieën tegen uitbraken van MERS-CoV zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis (Pascal, 2015, PNAS), konijn (10.2.e). In beide modellen zijn in de afwezigheid van klinische verschijnselen virologische en pathologische verschijnselen beschreven en antivirale interventie studies gerapporteerd (Pascal, 2015, PNAS; eigen ongepubliceerde studies in konijnen). Zoals eerder beschreven kunnen immunogecompromiteerde konijnen gebruikt worden om het behandelingseffect op ziekte te bestuderen. In dit geval zullen de dieren dagelijks met prednisolon worden behandeld om het (innate) immuunsysteem te verzwakken. Als dit model in een pilot experiment leidt tot (versterkte) klinische verschijnselen kan het model voor de onderstaand beschreven modules worden gebruikt. Alleen als door de behandeling met prednisolon een MERS-CoV model kan worden opgezet dat beter de klinische fenotype in de mens nabootst in tegstelling tot gezonde konijnen zal met het immunogecompromiteerd konijnen model worden gewerkt. Bij een negatieve resultaat van het pilot experiment, namelijk de afwezigheid van klinische verschijnselen bij een verzwakt immuunsysteem, zal dit model binnen deze projectvoorstel niet meer verder worden gebruikt (bijvoorbeeld voor het uittesten van interventie strategieën).

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

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

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

Module 1: Dose finding coronavirusinfecties

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

Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen

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

Module 3: Time-course coronavirusinfecties

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

Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen

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

Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten

Toedieningsprocedures van vaccinpreparaten. Afnameprocedures. Euthanasie.

Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën

Toedieningsprocedures van antivirale- en/of vaccinpreparaten. Afnameprocedures.

Infectieprocedures. Bemonstering van respiratoire weefsels middels swabs. Euthanasie.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Module 1: Dose finding coronavirusinfecties (DF)
2	Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen (GA)
3	Module 3: Time-course coronavirusinfecties (TC)
4	Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen (PK)
5	Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten (IMM)
6	Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën (EFF)
7	
8	
9	
10	



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef                              |
|------------|---|
| 1          | Module 1: Dose finding 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 optimale dosis coronavirus te bepalen voor de verschillende preklinische modellen in het geval van nieuwe virusisolaten, -stammen of -preparaten (bv. in het geval van een nieuwe batch van een reeds eerder gebruikt virus). Nieuwe klinische isolaten kunnen voortkomen uit monsters van patiënten in een nieuwe coronavirusuitbraak, zoals bv. recentelijk in Zuid-Korea (WHO 2015). Het is nog onbekend in hoeverre de verschillende coronavirussen evolueren, al zijn daarvoor inmiddels screeningsmethoden beschikbaar **10.2.e**, waardoor het in de toekomst noodzakelijk kan zijn om voor gemuteerde isolaten nieuwe dose-finding studies uit te voeren. De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, 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 (pilot) dose finding gaat van SARS-CoV isolaten/stammen zullen de volgende modellen ingezet/geselecteerd kunnen worden: (Tg) muis, hamster, fret, kat.

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

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

aantoonbare 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. Om de optimale infectiedosis te bepalen zullen de dieren intranasaal (i.n.) en/of intratracheaal (i.t.) geïnoculeerd worden met verschillende doseringen van het uit te testen viruspreparaat. De primaire uitleesparameters zijn virus load in respiratoire monsters (neus- en/of keelwabs, longmateriaal bij necropsie) en (histo)pathologie op respiratoire weefsels. In alle modellen is virale load meetbaar en, naast informatie uit (histo)pathologische analyses, bepalend voor de optimale infectiedosis. Deze virale load wordt zowel middels titratie van afgenomen monsters op cellijnen bepaald als middels moleculaire methoden (kwantitatieve RT-PCR).

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

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

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

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

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

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

Voor beide Fasen is de behandeling van de dieren, na acclimatisatie van minimaal een week, als volgt:  
Voor of op dag 0: markeren ter identificatie, bloedafname onder adequate sedatie indien nodig, bemonsteren van de luchtweg middels een neus- en/of keelwab (referentiemonsters)

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

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

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

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).

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

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

MERS-CoV is een betrekkelijk recent geïdentificeerd virus en de hoeveelheid beschikbare gegevens uit eigen studies en publicaties is daardoor beperkt. Gegevens verkregen met een soortgelijk virus (SARS-CoV) zijn



meegenomen in de overwegingen voor het bepalen van de benodigde aantallen dieren. Indien uit voortschrijdend inzicht blijkt dat deze studies met minder dieren uitgevoerd kunnen worden zullen de bij de IvD in te dienen werkprotocollen daarop aangepast worden.

**Fase 1. Pilot dose finding**

Per dosis zullen **10.1.b** dieren geïnfecteerd worden. Aangezien bij een dose-finding de verschillende groepen met elkaar vergeleken kunnen worden en het een pilot-experiment betreft, is onze ervaring dat het mogelijk is om de experimenten met een dergelijk laag aantal dieren per groep uit te voeren.

**Fase 2. Dose finding**

Om zeker te zijn van significante resultaten zal in deze fase een groepsgrootte van **10.1.b** dieren aangehouden worden voor de studies in muizen (Tseng, 2007, JVI; Zhao, 2014, PNAS). Van de overige diersoorten in dit projectvoorstel wordt voor deze fase een groepsgrootte van **10.1.b** dieren gehanteerd, gebaseerd op gepubliceerde gegevens over deze diersmodellen en eigen, niet gepubliceerde studies **10.2.e** **10.2.e**; Roberts, 2005, JVI; **10.2.e**

Voor pilot dose finding studies worden 3 groepen per studie gebruikt: in het geval van nieuwe coronavirusisolaten wordt gekozen voor een lage, medium en hoge dosering. Aan de hand van de resultaten hiervan wordt een verfijnde doseringsrange gekozen voor de dose finding studies, hiervoor worden voor muisstudies 5 groepen per studie gebruikt. Voor de grotere diersmodellen wordt een kleiner aantal (3) groepen gebruikt.

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

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

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

Module 1 Fase	Diersoort	Groeps- grootte	Geschat aantal groepen/ studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar
1	Muis	10.1.c	3	2	10.1.c
	Muis transgeen			4	
	Fret			3	
	Kat			3	
	Hamster			3	
	IC Konijn			3	
	Konijn			3	
2	Muis	10.1.c	5	2	10.1.c
	Muis transgeen			4	
	Fret			3	
	Kat		3	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, 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 ( $\geq 5$  wk: Roberts, 2005, JVI; Pascal, 2015, PNAS; Tseng, 2007, JVI), fretten ( $\geq 3$  mnd: 10.2.e

, katten ( $\geq 8$  wk: 10.2.e

, hamsters ( $\geq 5$  wk, Roberts, 2005, JVI), konijnen ( $\geq 6$  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:

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

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

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

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

Muis (wildtype): 10.13

Muis (transgeen): 10.13

Fret: 10.13

Kat: 10.13

Hamster: 10.13

Konijn: 10.13

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

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

Verfijning: De gekozen modellen zijn de enige tot dusver beschikbare modellen voor de beschreven coronavirusinfecties. Bij de keuze van het te gebruiken model voor een specifieke studie zal een

nauwkeurige afweging gemaakt worden op basis van het te testen preparaat en de bijbehorende achtergrondinformatie, het beoogde virale agens (SARS-, MERS- of een nog onbekend coronavirus: X-CoV) en de gewenste uitleesparameters. Deze overwegingen zullen overlegt worden aan de IvD bij het indienen van de werkprotocollen voor uitvoering van de studies in het kader van dit project.

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

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

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

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Intratracheale infectieprocedures worden uitgevoerd onder voor de diersoort adequate anesthesie.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

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

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

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

Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

---

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

Gepubliceerde coronavirusinfecties in katten, hamsters en konijnen verlopen zonder klinische verschijnselen. In fretten is bij SARS-CoV infecties in 50% van de dieren lethargie gerapporteerd (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 zal in dose-finding studies dan ook waarschijnlijk ~50% een humaan eindpunt zal bereiken.

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

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.

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

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

---

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

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

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

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

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	27700	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Viroclinics Biosciences	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	2	Module 2: Gastheeradaptatie coronavirussen

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

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

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

Op basis van beschikbare literatuurgegevens zijn tussen de 15 en 25 passages benodigd om het gewenste fenotype te realiseren (Day, 2009, Virology; Roberts, PLoS Path, 2007). Op deze wijze komt een klein diermodel beschikbaar dat het mogelijk maakt om werkzaamheidsstudies uit te voeren aan antivirale interventiestrategieën als brug tussen in vitro studies en preklinische studies in modellen waarin van wildtype virussen gebruik gemaakt wordt (selectiemoment). Deze muis-geadapteerde virusstammen kunnen vervolgens gebruikt worden in het preklinische muizenmodel om studies uit te voeren in Modules 1 en 3 om de virologische eindpunten te bepalen die gebruikt kunnen worden om werkzaamheidsstudies in dit model uit te kunnen voeren in Module 6.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

Gebaseerd op soortgelijke experimenten in muizen voor influenza A (Brown, 1990, JVI), B (McCullers, 2009, Virology) en ook SARS-CoV (Roberts, 2007, PLoS Path) adaptatie, zal kunnen worden voldaan met 10 muizen per passage. Voor de eerder gerapporteerde SARS-CoV adaptatie bleken 15 tot 25 passages benodigd.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend op 10.1c. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. De tabel hieronder geeft per fase het aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer en het verwachte ongerief.

Module 2	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar			
						licht	matig	ernstig
GA	Muis	10.1.c	25	3	10.1.c			10.1.c

## B. De dieren

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

Soort en levensstadia: Muizen, vrouw, wildtype zoals bv. Balb/c (>5 wk) (Day, 2009, Virology; Roberts, PLoS Path, 2007).

De keuze voor vrouwelijke muizen is gebaseerd op gepubliceerde informatie voor adaptatie van coronavirussen aan replicatie in muizen (Day, 2009, Virology; Roberts, 2007, PLoS Path)

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

inschaling BSL III (en dus isolator huisvesting) in verband met potentiële aerosol transmissie tussen groepen maar ook van dieren naar onderzoekers/biotechnici. Per isolator kan maar één sexe worden gehuisvest.

Herkomst: Geregistreerde fok/leverancier.

Geschatte aantallen, totaal, zie de tabel in 2A voor de berekening: 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: Gastheeradaptatie van een coronavirus kan enkel in respiratoire systemen van intacte dieren plaatsvinden. De virologische parameters en preparaten die hiervoor van belang zijn kunnen niet in proefdierlijke alternatieven gegenereerd worden.

Vermindering: Het ingeschatte aantal dieren is bepaald op gegevens beschikbaar uit vergelijkbare studies met andere respiratoire- en coronavirussen waardoor er met een klein aantal 10.1.c dieren per groep voldoende zekerheid is dat de doelstelling gehaald kan worden.

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

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

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

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

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### Ongeriefinschatting/humane eindpunten

#### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Infectie met een voor de muis pathogeen coronavirus.

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

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

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

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

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

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

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

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

Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

---

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

Gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV (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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

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

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

De opgevoerde modellen (muis, hamster, fret, konijn, 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 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.

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

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

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

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


Dag 0-x: dagelijks wegen

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

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

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. (hoog)pathogeen) influenzavirus) zijn meegenomen in de overwegingen voor het bepalen van de benodigde aantallen dieren. Indien uit voortschrijdend inzicht blijkt dat deze studies met minder dieren uitgevoerd kunnen worden zullen de bij de IvD in te dienen werkprotocollen daarop aangepast worden.

Voor time course studies worden 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 geëuthanaseerd teneinde de uitleesparameters op deze tijdstippen te bepalen.

Gebaseerd op het aantal studies dat verwacht wordt in de komende 5 jaar, is het maximum aantal dieren dat gebruikt zal worden over die periode uitgerekend. Het aantal dieren per groep, groepen per studie en het aantal te verwachten studies over de projectperiode levert de dieraantallen in de tabel op. Dit maximum is een schatting omdat aanvrager deze studies uitvoert als een zgn. CRO voor derden. Het exacte aantal benodigde dieren is afhankelijk van het aantal contracten dat in die periode zal worden afgesloten. Omdat het voorspellen van uitbraken onmogelijk is zijn de onderstaande getallen gebaseerd op een scenario dat zich in de komende 5 jaar een uitbraak met een coronavirus voordoet zoals die zich voor SARS in 2003 en MERS in 2012 voor heeft gedaan. Omdat de MERS epidemie nog niet onder controle is, is de verwachting dat de MERS-modellen (muis, konijn) het meest gebruikt zullen worden. Het gebruik van de overige modellen is gebaseerd op een uitbraak in de komende 5 jaar waarvoor één van deze modellen geschikt zou kunnen zijn. De tabel hieronder geeft per fase het aantal benodigde dieren voor dit deel van het projectvoorstel weer 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			
	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: 10.1.4  
 Muis (transgeen): 10.1.4  
 Fret: 10.1.4  
 Kat: 10.1.4  
 Hamster: 10.1.4  
 Konijn: 10.1.4

### 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 proefdiervrije 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 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