

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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

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

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

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

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

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

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

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

De dieren worden na de infectie tweemaal daags bekeken voor klinische symptomen. De observatiefrequentie zal verhoogd worden indien nodig, mochten observaties daartoe aanleiding geven. Hierop zal bij ieder individueel experiment toegezien worden – het verloop van (pilot) dose finding studies in module 1 en de time-course studies in deze module zal in het geval van onbekende coronavirus preparaten (nieuwe varianten, batches, combinaties) veel gerichte data/informatie opleveren om de observatiefrequentie indien nodig te kunnen specificeren voor de studies in de overige modules. Er zijn 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), afhankelijk van de infectiedosis. Ook in het geval dat aan de muis geadapteerde virusstammen afkomstig uit Module 2 gebruikt worden is het gezien eerdere publicaties van soortgelijke experimenten met SARS-CoV aannemelijk dat afhankelijk van de dosering >20% gewichtsverlies binnen 3-5 dagen kan optreden. Om de eindpunten van infectie te kunnen bepalen zal voor deze modellen een infectiedosis gekozen worden op basis van de resultaten in Module 1 die garandeert dat de eindpunten bepaald kunnen worden.

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

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

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

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

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

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

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](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
	4	Module 4: Farmacokinetiek van antivirale middelen

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

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### B. De dieren

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

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

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

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

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

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

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

Soort en levensstadia: afhankelijk van het gekozen coronavirus zal het meest relevante 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 [redacted]), katten ( $\geq 8$  wk: 10.2.e [redacted]), hamsters ( $\geq 5$  wk, Roberts, 2005, JVI), konijnen ( $\geq 6$  mnd: 10.2.e [redacted])

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Muis: 10.1.g [redacted]

Muis (transgeen): 10.1.g [redacted]

Fret: 10.1.g [redacted]

Kat: 10.1.g [redacted]

Hamster: 10.1.g [redacted]

Konijn: 10.1.g [redacted]

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

n.v.t.

### **Huisvesting en verzorging**

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

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



Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### Ongeriefinschatting/humane eindpunten

#### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tweemaal daags intramusculaire toediening van prednisolon voor IC konijnen.

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

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

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

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

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

### K. Classificatie van ongerief

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

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

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](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                                  |
|------------|---|
| 5          | Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten |

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

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

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

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

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

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

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

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

---

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

---

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

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

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

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

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

---

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

---

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

Bij het indienen van de werkprotocollen bij de IvD zullen indien voorhanden specifieke power analyses aangeleverd worden voor individuele studies. Het *maximum* aantal dieren per groep wordt op voorhand ingeschat op 100 voor de muismodellen en 50 voor de overige diersoorten, op basis van eerdere studies met vaccinformuleringen.

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

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

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

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

## B. De dieren

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

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

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

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

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

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

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

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

Muizen ( $\geq 5$  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 – 10.2.e
- Fret, man/vrouw – 10.2.e
- Kat, vrouw – 10.2.g

De keuze van het geslacht zal meegenomen in de aanvraag van de verschillende dierproeven die uitgevoerd zullen worden binnen dit project en deze keuze zal ook voorgelegd en beoordeeld worden door de IvD.

Hierin zullen de onderstaande overwegingen meegenomen worden, niet gerangschikt op basis van prioriteit in de overweging:

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

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

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

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

Muis (wildtype): 10.1.g

Muis (transgeen): 10.1.g

Fret: 10.1.g

Kat: 10.1.g

Hamster: 10.1.g

Konijn: 10.1.g

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

n.v.t.

### **Huisvesting en verzorging**

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

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

Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tweemaal daags intramusculaire toediening van prednisolon voor IC konijnen.

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

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

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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



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

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

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

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

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

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

### **Einde experiment**

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

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

Nee

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

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- |  |                         |  |
|--|-------------------------|--|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 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   |
|  | 6                       | Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën |

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

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Bepalen van de werkzaamheid van een therapeutisch preparaat:

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

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

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

Bepaling van de werkzaamheid van een profylactisch preparaat of vaccin:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Module 6	Diersoort	Groeps-grootte	Geschat aantal groepen/studie	Geschat aantal studies in 5 jaar	Totaal aantal dieren in 5 jaar	licht	matig	ernstig
EFF	Muis	10.1.c	10	10	10.1.c			
	Muis transgeen		10	10				
	Fret		5	20				
	Kat		4	2				
	Hamster		4	2				
	IC Konijn		5	5				
	Konijn		5	17*				

\* in het aantal studies dat hier voorgesteld wordt, zijn de twee studies die in de looptijd van dit project al uitgevoerd zijn reeds meegenomen. Dit betroffen twee studies met elk 6 groepen van **10** dieren, wat het totaal uitbrengt op **10.1.c** dieren voor het konijnenmodel.

## 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: M10.2.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:

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

- Bepaalde keuze van geslacht vanuit wetenschappelijk of regelgevend oogpunt.

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

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

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

Muis (wildtype): 10.1.c

Muis (transgeen): 10.1.c

Fret: 10.1.c

Kat: 10.1.c

Hamster: 10.1.c

Konijn: 10.1.c

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

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

Vermindering: Het ingeschatte aantal dieren is gekozen aan de hand van op virologische studies beschreven statistische analyses van werkzaamheidsstudies, waarin een groepsgrootte van [ ] adequaat wordt geacht om 1 log<sub>10</sub> verschillen in virale load significant te kunnen bepalen in grotere diersystemen zoals bijvoorbeeld fretten of konijnen (Overbaugh, 2005, JVI). Indien uit studies uit te voeren in het huidige project blijkt dat, bv. door beperkte spreiding in de uitkomsten, met minder dieren evengoed robuuste resultaten te behalen zijn zal dit voortschrijdende inzicht gebruikt worden voor het opstellen van werkprotocollen waarin deze vermindering concreet gemaakt wordt. Tevens zijn in Modules 4 en 5, die gebruikt worden om de toedieningsschema's van de antivirale preparaten op te zetten, go/no-go momenten ingebouwd die gebruikt worden om te bepalen of de uit te testen preparaat/preklinisch model combinatie geschikt is om werkzaamheidsstudies uit te voeren. Indien studies uitgevoerd zullen worden in muizen is in deze wijziging gekozen voor een grotere groepsgrootte, namelijk [ ] dieren per groep, aangezien de hoeveelheid uitleesparameters in muizen beperkter is en bijvoorbeeld sequentiële bemonstering uit hetzelfde dier niet of in heel beperkte mate mogelijk is. Uiteraard is deze schatting gekozen op basis van aannames uit overige studies en zal, indien mogelijk, op basis van power calculatie de groepsgrootte heroverwogen worden. Bovendien is het vaak zo dat voorstudies met een groot panel van mogelijke kandidaten uitgevoerd zullen worden in bijvoorbeeld muizen alvorens over te stappen naar een meer klinische relevant diersysteem zoals

fretten. Dit kan verklaren dat per studie in het kader van het gebruik van muizen meer groepen zijn dan bij gebruik van een meer klinisch relevant diermodel zoals fretten voor het bestuderen van werkzaamheid van de meest veelbelovende kandidaten.

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

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

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

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

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

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

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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

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

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Er zijn vooralsnog geen andere symptomen te verwachten.

---

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

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

---

## K. Classificatie van ongerief

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

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

De beschreven HEP's voor modellen met klinische verschijnselen verminderen het optreden van ernstig ongerief, maar 100% garantie op het voorkomen ervan is niet af te geven. Kortdurend ernstig ongerief in modellen met klinische symptomen (fretten, IC konijnen, ACE2 Tg muizen, Balb/c muizen in enkele modellen) is dan ook niet uit te sluiten maar dit zal tot een minimum beperkt worden door verhoogde observatiefrequentie wanneer dit noodzakelijk wordt geacht. Voor deze modellen kan voor een deel van de dieren (zie ook J) het maximale cumulatieve ongerief dan ook als ernstig worden ingeschaald. De beschreven HEP's zijn van toepassing op infecties met virussen die impact hebben op het respiratoire systeem van de verschillende diermodellen, zoals voor de bekende SARS/MERS modellen, maar ook voor bv. infectiemodellen voor hoogpathogene influenzavirussen. Met al deze modellen heeft de aanvrager veel ervaring, waardoor nauwkeurige ongeriefinschatting en bepaling van het bereiken van HEPs in de experimenten gewaarborgd is. Door het potentieel beschermend effect van de antivirale behandeling worden echter minder dieren met ernstig ongerief verwacht in vergelijking met modules 1 en 3. Voornamelijk de dieren in de controle groep hebben een verhoogd kans op ernstig ongerief.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

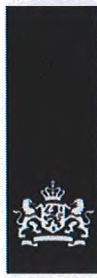
Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

Datum 18 februari 2020

Betreft Adviesnota bij wijzigingsaanvraag AVD2015283-3

Voor aanvraag AVD2015283 is een wijzigingsaanvraag ingediend. Deze is geregistreerd als AVD2015283-3. Het project is getiteld: "Antivirale interventie strategieën tegen coronavirussen".

#### **Proces**

Deze wijzigingsaanvraag betreft een spoedaanvraag. Reden is de huidige uitbraak van het nieuwe coronavirus 2019-nCov en de noodzaak vaccins te ontwikkelen tegen dit virus. Het Secretariaat is op 31 januari 2020 telefonisch benaderd door de aanvrager. De aanvrager gaf aan dat ontwikkeling van vaccins tegen dit virus onder een nog lopende projectvergunning zou kunnen vallen. Alleen zijn hiervoor op korte termijn meer dieren nodig dan vergund. Op zondag 2 februari 2020 heeft de aanvrager de CCD, op verzoek van het Secretariaat, een e-mail gestuurd met daarin vermeld het benodigd aantal dieren. Na overleg met de voorzitter van de CCD, en na afstemming met de NVWA, is besloten de aanvrager toestemming te geven om alvast te starten met de proeven vooruitlopend op een formele wijzigingsaanvraag. Er is in dit uitzonderlijke geval niet voor gekozen om een formele beoordeling af te wachten, omdat de proeven onder een lopende vergunning kunnen vallen en er geen nieuwe aanvraag hoeft te worden ingediend. In dit geval is de strategie al beschreven, zijn de handelingen die de dieren ondergaan bekend en is duidelijk wat de aanvrager doet om het ongerief van de dieren te beperken. De wijziging betreft alleen een toename van het aantal dieren in bijlage 3.4.4.6. De aanvrager heeft geen toestemming gekregen andere handelingen dan beschreven in deze bijlage uit te voeren. Het Secretariaat heeft de DEC op vrijdag 31 januari 2020 van de situatie per e-mail op de hoogte gebracht. Op maandag 3 januari 2020 heeft het Secretariaat telefonisch met de DEC overlegd over de mogelijkheden van de DEC om de wijzigingsaanvraag snel te behandelen. Op maandag 3 februari 2020 heeft het Secretariaat namens de CCD de aanvrager per e-mail formeel toestemming verleend te starten met de proeven (AVD2015283-3g\_toestemming start proeven). De aanvrager heeft de officiële wijzigingsaanvraag op maandag 3 februari 2020 naar de DEC gestuurd. De aanvraag is, vanwege de benodigde (natte) handtekening, op 4 februari 2020 naar de CCD gestuurd. Deze volgorde van indienen is vooraf afgestemd. De DEC heeft op 17 februari 2020 haar advies uitgebracht over deze wijziging.

Op deze vergunning is eerder 1 melding en 1 wijziging doorgevoerd.

De eerste keer betrof een melding vanwege het overzetten van de vergunning naar een andere vergunninghouder. De tweede keer betrof een toename in ongerief bij konijnen in alle bijlagen dierproeven.

#### **Inhoud wijziging**

De wijziging betreft het toevoegen van 1904 muizen, 552 fretten en 420 konijnen aan bijlage 3.4.4.6. (Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën). Het ongerief van de muizen en fretten blijft gelijk ten opzichte van de vorige versie van deze aanvraag. Het ongerief van de konijnen wordt iets lager ingeschat dan in de vorige versie van deze aanvraag (zie tabel onderaan advies).

In de wijzigingsaanvraag geeft de aanvrager aan dat in bijlage 3.4.4.5. eerder een rekenfout is gemaakt en dat er meer dieren vergund zijn dan noodzakelijk. In deze wijzigingsaanvraag wordt de rekenfout

rechtgezet. Dit leidt tot een vermindering in het aantal fretten (-120), katten (-120), hamsters (-120) en konijnen (-240).

### **Reden wijziging**

De aanvraag wordt gewijzigd met het oog op de mogelijkheid om interventie strategieën te testen tegen het nieuwe coronavirus zoals al aangevraagd door meerdere reeds bekende, maar ook nieuwe opdrachtgevers.

Over het virus zegt de aanvrager het volgende:

CITAAT. 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 vooralsnog zijn 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.

Over het benodigd aantal dieren zegt de aanvrager het volgende:

CITAAT. 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.

### **DEC-advies**

De DEC heeft de aanvrager in 2 rondes vragen gesteld over het benodigde aantal dieren, de keuze van de diermodellen, het te verwachten ongerief en het voorkomen van duplicatie. De vragen hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

De DEC heeft het oorspronkelijk advies aangevuld. Dit advies was uitgebracht op de vorige versie van het format DEC advies.

C3 Belang (CITAAT). 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 (...). 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.

C4. Haalbaarheid (CITAAT) 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.

C6. Ongerief (CITAAT). 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.

C8 Aantal dieren (CITAAT). 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 tijdsperiode 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.

#### **Ethische afweging van de DEC**

De DEC heeft de ethische afweging als volgt aangevuld (aanvullingen in italic):

CITAAT. ....*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.*

De DEC adviseert de wijzigingsaanvraag te vergunnen.

### Kwaliteit DEC-advies

11.1

### Samenvatting

De oorspronkelijke aanvraag is gericht op de ontwikkeling van vaccins tegen coronavirussen zoals SARS en MERS, maar ook nieuw opkomende virussen. De aangevraagde wijziging voor ontwikkeling van vaccins tegen 2019-nCov past binnen de doelstelling van de oorspronkelijke aanvraag.

Het secretariaat adviseert 11.1

11.1

DE NTS is niet geheel duidelijk. In de oorspronkelijke NTS wordt gesproken over 5 jaar. De vergunning loopt nu nog 1 jaar, maar het leest alsof de aanvrager nog 5 jaar onder deze vergunning aan het nieuwe virus gaat werken. Onderdeel 3.1 van de NTS is moeilijk beschreven met de wijziging er deels tussen. Het Secretariaat heeft de aanvrager gevraagd de NTS op deze punten aan te passen.

Daarnaast kloppen de percentages ongerief in de NTS niet met de percentages berekend op basis van de aanvraag. Het Secretariaat heeft de aanvrager gevraagd dit na te rekenen en de NTS aan te passen.

De beoordeling achteraf opgelegd in de oorspronkelijke vergunning blijft van kracht.

Als de aanvraag wordt vergund, wijzigt de vergunning als volgt (aanpassingen in groen, nieuw in italic)

Naam Dierproef	Diersoort	Aantal	Ongerief
3.4.4.1 Module 1: Dose finding coronavirusinfecties	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen	10.1.c	Licht 41,7%, Matig 33,3%, Ernstig 25% Matig 50%, Ernstig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 25%, Matig 50%, Ernstig 25%
3.4.4.2 Module 2: Gastheeradaptatie coronovirussen	Muizen		Ernstig 100%

3.4.4.3 Module 3: Time-course coronavirusinfecties	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen	10.1.0	Licht 41,7%, Matig 33,3%, Ernstig 25% Matig 50%, Ernstig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 25%, Matig 50%, Ernstig 25%
3.4.4.4. Farmacokinetiek van antivirale middelen	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 50%, Matig 50%
3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 50%, Matig 50%
3.4.4.6. Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 37,5%, Matig 37,5%, Ernstig 25% Matig 50%, Ernstig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 50%, Matig 50% <del>Licht 25%, Matig 70%, Ernstig 5%</del> <i>Licht 38,6, Matig 59,1%, Ernstig 2,3%</i>

**Advies**

11.1

**Van:** [Info-zbo](mailto:Info-zbo)  
**Aan:** "TvD@viroclinics.com"  
**Cc:** 10.2.e  
**Bcc:** 10.2.e  
**Onderwerp:** Beslissing wijziging projectvergunning dierproeven AVD277002015283-3  
**Datum:** woensdag 26 februari 2020 14:16:24  
**Bijlagen:** [Beschikking\\_15283-3.pdf](#)  
[AVD277002015283-3 advies wijziging.pdf](#)

---

Geachte 10.2.e

In de bijlage treft u het besluit op uw digitaal ontvangen aanvraag voor een projectvergunning. Gedurende de behandeling van uw aanvraag hebben wij hierover met u per e-mail gecorrespondeerd. Op uw verzoek hebben wij de verantwoordelijk onderzoeker uit uw organisatie in de CC gezet.

Met vriendelijke groet,

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

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

.....  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)**





> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

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

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl  
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
Info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD277002015283-3

Datum 26 februari 2020  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 4 februari 2020 hebben wij uw aanvraag voor wijziging van een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Antivirale interentiestrategieën tegen coronavirussen" met aanvraagnummer AVD277002015283, waarvoor op 22 maart 2016 een vergunning is afgegeven (onder aanvraagnummer AVD905002015283). Uw wijzigingsaanvraag is bij ons geregistreerd onder aanvraagnummer AVD277002015283-3. Met de aangevraagde wijziging van de eerder verleende vergunning beoogt u nieuwe dierproeven toe te voegen aan de vergunning. Wij hebben uw wijzigingsaanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij wijzen uw wijzigingsaanvraag toe. Dit betekent dat het op grond van artikel 10a, lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) is toegestaan de in de wijzigingsaanvraag beschreven dierproeven onder de vergunning voor het project "Antivirale interentiestrategieën tegen coronavirussen" uit te voeren. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen wij tot deze beslissing zijn gekomen.

**Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie 10.2.e en 10.2.g (hierna: de DEC). Dit advies is opgesteld op 17 februari 2020. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC. Wij nemen dit advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

*Nadere vragen aanvrager*

Op 18 februari 2020 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op het aantal dieren en de NTS. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Overwegingen**

Op grond van de bovenstaande stukken zijn wij van mening dat de toe voegen dierproeven toelaatbare wijzigingen betreffen van het project, waarvoor op 22 maart 2016 een vergunning is verleend.

**Datum**  
26-02-2020

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD277002015283-3

Uw vergunning wijzigt als volgt (wijzigingen cursief gedrukt):

Naam Dierproef	Diersoort	Aantal	Ernst
3.4.4.1 Module 1: Dose finding coronavirusecties	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen	10.1.c	Licht 41,7%, Matig 33,3%, Ernstig 25% Matig 50%, Ernstig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 25%, Matig 50%, Ernstig 25%
3.4.4.2 Module 2: Gastheeradaptatie coronovirussen	Muizen		Ernstig 100%
3.4.4.3 Module 3: Time- course coronavirusecties	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 41,7%, Matig 33,3%, Ernstig 25% Matig 50%, Ernstig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 25%, Matig 50%, Ernstig 25%
3.4.4.4. Farmacokinetiek van antivirale middelen	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 50%, Matig 50%
3.4.4.5 Module 5: Immunogeniciteit van vaccinpreparaten	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 100% Licht 50%, Matig 50%
3.4.4.6. Module 6: Werkzaamheid antivirale interventiestrategieën	Muizen Fretten Katten Hamster Konijnen		Licht 37,5%, Matig 37,5%, Ernstig 25% Matig 50%, Ernstig 50% Licht 50%, Matig 50% Licht 50%, Matig 50% <del>Licht 25%, Matig 70%, Ernstig 5%</del> <i>Licht 38,6, Matig 59,1%, Ernstig 2,3%</i>

Voor het overige blijft de vergunning ongewijzigd.  
U dient deze brief toe te voegen bij uw oorspronkelijke vergunning.

**Bezwaar**

**Datum**

26-02-2020

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD277002015283-3

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 93118, 2509 AC, Den Haag.

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

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

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven

namens deze: 10.2.e en 10.2.g

10.2.e en 10.2.g

**Bijlagen**

- DEC-advies

44

**Van:** 10.2.e  
**Aan:** "Info-zbo"; IVD  
**Onderwerp:** RE: Telefonisch overleg vandaag  
**Datum:** dinsdag 7 april 2020 13:57:43  
**Bijlagen:** image001.jpg

---

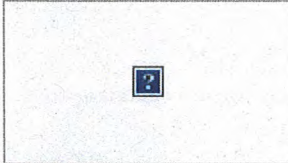
Beste 10.2.e

Ik kan wel contact met jou opnemen, ik heb jouw mobiele nummer, kan ik je daarop bellen?

Groeten, 10.2.e

10.2.e

Study Director



10.2.g

The Netherlands

P: 0031 88 668 4771

M: 10.2.e en 10.2.g

E: 10.2.e

---

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

**Sent:** dinsdag 7 april 2020 13:50

**To:** IVD ; 'Info-zbo'

**Cc:** 10.2.e

**Subject:** RE: Telefonisch overleg vandaag

Beste 10.2.e

Ik heb n.a.v. onze conference call even intern overlegd. Ik zou graag even telefonisch toelichten hoe wij dit gaan oplossen.

Ik hoor graag wie ik het best even kan bellen en ook wanneer. Ik ben zelf tot 14:30 bereikbaar en anders is morgenochtend ook prima.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

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

Prinses Beatrixlaan 2 (kamer 10.14) | 2595 AL | Den Haag

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

---

M: 10.2.e en 10.2.g

E: 10.2.e en 10.2.g

---

**Van:** IVD <IVD@viroclinics.com>

**Verzonden:** dinsdag 7 april 2020 11:25

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

**CC:** IVD <IVD@viroclinics.com>

**Onderwerp:** RE: Telefonisch overleg vandaag

Beste 10.2.e

Fijn dat het mogelijk is! Aangezien we van 3 verschillende locaties bellen is er een conference call opgezet met de volgende inbelnummers:

10.2.g

Vriendelijke groet,

43

42