

Van: Info-zbo
Aan: 10.2.g
Onderwerp: AVD 10.2.g Dierproef_2
Datum: vrijdag 21 februari 2020 13:51:58
Bijlagen: Dierproef_2.pdf

Geachte leden van DEC 10.2.g

Gezien de grootte zijn wij genoodzaakt de bestanden handmatig te versturen, excuses voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections" en aanvraagnummer: AVD 10.2.g.

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 21-02-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 21-02-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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

Van: Info-zbo
Aan: "dec 10.2.g"
Onderwerp: AVD 10.2.g Dierproef_4
Datum: vrijdag 21 februari 2020 13:53:30
Bijlagen: Dierproef_4.pdf

Geachte leden van DEC 10.2.g

Gezien de grootte zijn wij genoodzaakt de bestanden handmatig te versturen, excuses voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections" en aanvraagnummer: AVD 10.2.g.

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 21-02-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 21-02-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

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

Van: Info-zbo
Aan: "dec10.2.g"
Onderwerp: AVD10.2.g Nts
Datum: vrijdag 21 februari 2020 13:54:23
Bijlagen: [Nts.pdf](#)

Geachte leden van DEC 10.2.g

Gezien de grootte zijn wij genoodzaakt de bestanden handmatig te versturen, excuses voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections" en aanvraagnummer: AVD10.2.g.

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 21-02-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 21-02-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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

Van: Info-zbo
Aan: "dec10.2.g"
Onderwerp: AVD10.2.g Project_Voorstel
Datum: vrijdag 21 februari 2020 13:55:50
Bijlagen: Project_Voorstel.pdf

Geachte leden van DEC 10.2.g

Gezien de grootte zijn wij genoodzaakt de bestanden handmatig te versturen, excuses voor het ongemak.

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections" en aanvraagnummer: AVD10.2.g

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 21-02-2020, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 21-02-2020 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

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

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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

9404

24 FEB 2020



Centrale Commissie Dierproeven

20

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	10.2.g	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	10.2.g	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	10.2.e	
		KvK-nummer	10.2.g	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	10.2.g	
		Postbus		
		Postcode en plaats		
		IBAN		
		Tenaamstelling van het rekeningnummer		
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	10.2.e	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.g	
		Afdeling		
		Telefoonnummer		
		E-mailadres		
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	10.2.g	
		Afdeling		
		Telefoonnummer		
		E-mailadres		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 4 - 2020 |
| Einddatum | 31 - 3 - 2025 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de werkzaamheid van vaccins en antivirale middelen tegen nieuwe coronavirussen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | DEC-10.2.g |
| Postadres | 10.2.g |
| E-mailadres | dec@10.2.g |

24 FEB 2020

Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 2094 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Naam 10.2.e

Functie _____

Plaats _____

Datum _____

Handtekening _____

Van: 10.2.e
Aan: 10.2.e ; dec@10.2.
Cc: Info-zbo; Braunstahl, drs. F. (Ferry)
Onderwerp: Re: Aanvraag graag met spoed behandelen
Datum: vrijdag 28 februari 2020 13:38:39

Geachte 10.2.e,
 De aanvraag is door de 10.2.g in vergadering besproken. Er zijn een aantal vragen en opmerkingen die vandaag naar de onderzoeker zijn gestuurd.

Vriendelijke groeten,

10.2.e

Van: "10.2.e"

Datum: vrijdag 21 februari 2020 om 11:31

Aan: 10.2.e , DEC

CC: "info@zbo-ccd.nl" , "Braunstahl, drs. F. (Ferry)"

Onderwerp: Aanvraag graag met spoed behandelen

Geachte 10.2.e , geachte DEC,

Ik probeerde u zojuist te bellen, maar kreeg helaas geen gehoor.

Wij hebben vandaag een aanvraag ontvangen m.b.t. coronavirus. Gezien de grote belangen die aan dit onderwerp hangen, willen wij deze graag met spoed behandelen, en zouden deze dan ook in de CCD vergadering van 13 maart willen bespreken.

Vooruitlopend op het officiële verzoek van de CCD om deze aanvraag van een advies te voorzien, stuur ik u bij deze alvast de documenten van deze aanvraag. Het officiële verzoek om advies, met het CCD-aanvraagnummer volgt later vandaag of uiterlijk maandag.

Zou het u lukken om uiterlijk 4 maart een advies over deze aanvraag te kunnen sturen aan de CCD? Indien u dit niet redt, kunt u aangeven wat dan wel mogelijk zou zijn? We willen graag met u meedenken over de mogelijkheden, zodat wij gezamenlijk tot een snel maar weloverwogen besluit kunnen komen.

Wij horen graag van u.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Medewerker behandelen en ontwikkelen

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen.

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

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

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

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the

risks inherent in the electronic transmission of messages.

10.2.g



Van: Info-zbo
Aan: 10.2.e
Cc:
Onderwerp: AVD 10.2.g
Datum: vrijdag 28 februari 2020 08:38:10

Geachte 10.2.e,
Zoals vorige week telefonisch besproken met 10.2.e hebben wij er, vanwege de impact van het coronavirus, op ingezet om uw aanvraag met een zekere spoed te behandelen. De DEC heeft aangegeven uiterlijk 4 maart haar advies uit te brengen. Dat zou betekenen dat wij uw aanvraag 13 maart in de CCD vergadering zouden kunnen behandelen.

Voor een snelle afhandeling zouden we u dan wel willen vragen om eventuele vragen (gesteld door DEC of CCD) snel te beantwoorden, zodat we gezamenlijk kunnen zorgen voor een snel maar weloverwogen besluit.

Met vriendelijke groet,

10.2.e

Namens:

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Aan: 10.2.e; Info-zbo
Onderwerp: RE: advies aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g
Datum: woensdag 4 maart 2020 16:20:42

32

Beste 10.2.e

Het advies en de stukken zijn in goede orde ontvangen. Hartelijk dank hiervoor.

Groeten 10.2.e

Van: 10.2.e

Verzonden: woensdag 4 maart 2020 13:35

Aan: Info-zbo

Onderwerp: advies aanvraag projectvergunning dierproeven AVD 10.2.g

Geachte leden van de CCD,

Hierbij zend ik u het advies van de 10.2.g betreffende aanvraag projectvergunning AVD 10.2.g. Tevens zijn bijgesloten die onderdelen van de aanvraag die naar aanleiding van de vragen van de DEC gewijzigd zijn en waar dit advies dus betrekking op heeft.

Vriendelijke groeten,

10.2.e
Secretaris DEC- 10.2.g

24

10.2.g

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

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

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

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

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD **10.2.g**
2. Titel van het project: Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de werkzaamheid van vaccins en antivirale middelen tegen nieuwe coronavirussen
4. Type aanvraag:
 - X nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC- **10.2.g**
 - telefoonnummer contactpersoon: **10.2.e**
 - mailadres contactpersoon: dec@**10.2.g**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 21-02-2020
 - aanvraag compleet: 21-02-2020
 - in vergadering besproken: 25-02-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 28-02-2020/ tot 02-03-2020
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 02-03-2020
 - advies aan CCD: 04-03-2020
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD en het met instemming van de IvD ingediend

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.

- Datum
- Plaats
- Aantal aanwezige DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager
- Gestelde vraag / vragen
- Verstrekt(e) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 28-02-2020
- Gestelde vraag/vragen: De noodzaak om common marmosets nu in deze aanvraag op te nemen, gezien de goede mogelijkheden om een infectiemodel in makaken te verkrijgen. De te volgen strategie voor het opzetten van het infectiemodel in makaken en de go/no go beslissingen hierin. De te volgen strategie voor evaluatie van antivirale middelen en de go/no go beslissingen hierin. Aanvullende informatie betreffende de statistische onderbouwing voor het benodigd aantal dieren, de toepassing van X-ray en PET-CT en enkele tekstuele aanpassingen.
- Datum antwoord: 02-03-2020
- Verstrekt(e) antwoord(en): De onderzoeker heeft het gebruik van common marmosets uit de aanvraag verwijderd, met de opmerking dat bij onbekende infectieziektes, zoals het SARS-CoV-2, maar ook toekomstige "disease X", de common marmoset nog steeds van groot belang kan zijn. Dit met name in de fase wanneer antivirale middelen of monoklonale antistoffen

aanvankelijk in beperkte hoeveelheden beschikbaar zijn en dan mogelijk al wel in marmosets getest kunnen worden vanwege het lage lichaamsgewicht t.o.v. de makaak. De onderzoeker heeft aangegeven dat op dit moment nog geen beslissing kan worden genomen over welke van de twee makaken soorten bij voorkeur gebruikt zal worden, aangezien nog te weinig bekend is over SARS-CoV-2. In bijlage 4 is strategie voor het testen van antivirale middelen aangepast en zal alleen therapeutische evaluatie plaats vinden. Het aantal benodigde dieren in bijlage 3 is aangepast.

- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). N.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: De commissie heeft voldoende expertise, inbegrepen immunologie, onderzoek met niet-humane primaten (NHP), en toepassing van alternatieven op deze gebieden. Ook is er voldoende expertise op het gebied van ontwerp van proeven inclusief de onderbouwing van de steekproefgrootte, de proefdiergeneeskundige praktijk, het houden en verzorgen van dieren, de ethiek en van proefdieren en hun bescherming. De DEC heeft ervaring met het beoordelen van experimentele virusinfecties en vaccin testen in niet-humane primaten.
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. Er waren geen conflicterende belangen bij de beoordeling van dit voorstel.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Dit project is erop gericht om in apen vaccins tegen nieuwe Coronavirussen te testen op immunogeniciteit en effectiviteit met als einddoel het beschikbaar komen van effectieve anti-Corona vaccins voor mensen. Daarnaast wil men in hetzelfde model antivirale middelen testen op effectiviteit en bijwerkingen.

Hiervoor wordt een experimenteel infectiemodel opgezet met Coronavirus in makaken. Aangezien nog te weinig bekend is over SARS-CoV-2 kan momenteel nog niet voorspeld worden welke makaken soort, resus of Java apen, het meest geschikt is om een goed infectie model te verkrijgen en wordt toestemming gevraagd om beide diersoorten te gebruiken. De onderzoeker geeft duidelijke criteria aan waaraan het ziektemodel moet voldoen teneinde de vervolgstudies naar vaccins en antivirale middelen te kunnen aanvangen.

Voor de vaccinontwikkeling zal gekeken worden naar inductie van immuunresponsen en effectiviteit in het beschermen tegen infectie met het virus in het diermodel. Daarnaast zullen antivirale middelen worden onderzocht op hun werkzaamheid om infectie te beteugelen. Bij nieuwe antivirale middelen worden eerst PK-studies uitgevoerd om de dosering te bepalen. Nieuwe antivirale middelen dienen op veiligheid en werkzaamheid te worden onderzocht, omdat er behoefte bestaat aan specifieke middelen tegen Coronavirussen en om het werkingsmechanisme van geneesmiddelen te achterhalen. Het in bijlage 1 beschreven opzetten van een infectiemodel, en de toepassing daarvan voor de evaluatie van effectiviteit van vaccins (bijlage 2) en antivirale middelen (bijlage 4) tegen Coronavirussen, alsmede het indien nodig bepalen van de te gebruiken dosis van de antivirale middelen (bijlage 3) vormen een logisch geheel en zijn noodzakelijk voor het behalen van de doelstelling van het project. Het is duidelijk welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. De uitkomsten uit dit experiment zijn helder en meetbaar. Het aantal dieren dat gebruikt zal worden is realistisch ingeschat en voor zover mogelijk statistisch onderbouwd. De humane eindpunten zijn duidelijk gedefinieerd.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming). Er is, zover de DEC kan overzien, geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën)

aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. De aangegeven doelcategorie, te weten 'translationeel of toegepast onderzoek' sluit aan bij het projectvoorstel. Het doel is de evaluatie van vaccins en antivirale middelen op effectiviteit tegen Coronavirussen, met de focus op SARS-CoV-2 en daarmee direct toepasbaar in de mens.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. Het hoofddoel van dit project is de ontwikkeling van vaccins en antivirale middelen tegen nieuwe Corona virussen, zoals het recentelijk ontdekte SARS-CoV-2 virus dat in mensen de ziekte COVID-19 veroorzaakt. Het directe doel is opzetten van een infectiemodellen voor Corona virussen in NHP en het testen van vaccins en antivirale middelen in een infectie model in apen. Het directe doel is helder beschreven en de experimenten zijn duidelijk uiteengezet.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*). De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn 1) de samenleving, 2) de proefdieren en 3) het onderzoeksveld.
Het belang voor de samenleving is dat op korte termijn een vaccin/antiviraal middel beschikbaar komt tegen Coronavirussen. Het nieuwe corona virus SARS-CoV-2 heeft binnen de korte periode dat het in omloop is al vele doden veroorzaakt en aanzienlijke maatschappelijke ontwrichting wereldwijd. De urgentie om een vaccin tegen dit (en vergelijkbare) virus(sen) te maken en te testen is hoog. Voor het in mensen getest kan worden is het zaak om een zo relevant mogelijk diermodel te gebruiken om te onderzoeken of het vaccin/antiviraal middel effectief en veilig is.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de operatie waarbij een telemetrisch apparaat wordt geplaatst in de buikholte en daarna inductie van ziekte en bloedafnames (bijlage 1) of vaccinatie, bloedafnames en infectie met het virus (bijlage 2), of door infectie met het virus gevolgd door toediening van medicijnen, en bloedafnames (bijlage 4). De integriteit van de dieren voor PK/PD studie (bijlage 3) wordt aangetast door toediening van medicijnen gevolgd door

frequente sedaties en bloedafnames. De dieren zullen stress ondervinden en wellicht geringe mate van pijn (deze wordt na chirurgie adequaat behandeld).

Het onderzoeksveld krijgt nieuwe informatie die wordt gedeeld binnen de internationale research consortia en d.m.v. publicatie(s).

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? Er zijn geen substantiële milieueffecten te verwachten binnen de kaders of ten gevolge van dit project.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. De onderzoeksgroep heeft een ruime ervaring met virus infectiemodellen en vaccinaties in niet-humane primaten en het instituut heeft veel ervaring met het werken met niet-humane primaten.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. De eerste stap in het ontwikkelen van een nieuw vaccin is het opzetten van een infectiemodel voor de target van het vaccin. Daarbij wordt rekening gehouden met hetgeen er bekend is en wordt over de virus/gastheercombinaties. Voor het opzetten van een infectiemodel in makaken worden groepjes van vier dieren geïnoculeerd met het Corona virus en wordt het ziekteverloop gemonitord via 1) afname van neus en keel swabs, 2) het meten van de lichaamstemperatuur 24 uur per dag, 3) bepaling van het aantal virusdeeltjes in bloed en eventueel 4) CT opnames (of Röntgen foto's). Indien nodig wordt een tweede infectie-experiment uitgevoerd met een andere dosis of toedieningsroute. Criteria voor 'geschiktheid' staan duidelijk beschreven in de aanvraag. Als geen van beide makaken soorten, resus of Java apen, bruikbaar is stopt het experiment. In het geschikte dier model worden de vervolg experimenten uitgevoerd, bestaande uit 1) vaccinatie, meten van de immuunrespons in het dier en een (afhankelijk van de immuunrespons) challenge of 2) infectie gevolgd door behandeling met antivirale middelen,. De dosering en toedieningswijze van het antivirale middel wordt bepaald met PK-studies. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

De keuze voor deze diersoort is gebaseerd op zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens tezamen met de bewezen gevoeligheid van deze diersoort voor (andere) coronavirussen. Daarom is te verwachten dat makaken een geschikt diermodel zullen zijn en dat resultaten uit dit onderzoek goed voorspellend zijn voor therapeutische effecten bij de mens. Dergelijke kandidaat vaccins en geneesmiddelen zijn vooraf onderzocht op werkzaamheid en veiligheid in andere modellen (in vitro/ in andere diersoorten) maar deze kunnen onvoldoende modelleren voor de mens (met name de agens/gastheerinteractie en de immuunresponsen).

Hergebruik zal plaats vinden binnen de wettelijke kaders beschreven in de Wet op de Dierproeven.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. De huisvesting en verzorging voldoet ten volle aan de vereisten in bijlage III.
11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe. Het ongerief voor de

dieren is correct als matig ingeschat. Het ongerief voor de dieren uit bijlage 1, 2 en 4 zal vooral veroorzaakt worden door plaatsen van een meetinstrument in de buikholte en ziektesymptomen van de besmetting met Coronavirus. Dieren zullen na infectie met het virus minstens twee keer per dag nauwlettend gemonitord worden, zullen klinische kenmerken gescoord worden, en daarnaast beschikken de onderzoekers over de continue metingen van de lichaamstemperatuur. Dit alles maakt het mogelijk om dieren vroegtijdig uit de studie te halen zodra de symptomen verergeren en/of het humane eindpunt is bereikt. Het ongerief voor dieren uit bijlage 3 wordt voornamelijk veroorzaakt door frequente sedaties en bloedafnames.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. De integriteit van de dieren uit bijlages 1, 2 en 4 wordt aangetast door de dieren te opereren en van transponders te voorzien en vervolgens te besmetten met het Coronavirus virus en eventuele vaccinaties of behandelingen met geneesmiddelen. Dieren zullen zorgvuldig geobserveerd worden en lijden zal zo veel mogelijk worden voorkomen door dieren in een vroegtijdig stadium van ziekte te euthanaseren. De integriteit van dieren van bijlage 3 wordt aangetast door toedienen van medicijnen, frequente sedaties en bloedafnames en het geven van sondevoeding.
13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe. Het bereiken van een humaan eindpunt is goed gedefinieerd. Dieren zullen niet onnodig lijden. Dieren die geïnfecteerd zijn met het Coronavirus zullen allemaal ge-euthanaseerd worden om de weefsels en organen te verkrijgen voor nader onderzoek. Tevens wordt hiermee verspreiding van het virus tegen gegaan (de dieren kunnen om die reden niet meer naar open huisvesting).
14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. *In vitro* technieken geven inzicht in allerlei relevante eigenschappen van een vaccin, zoals zuiverheid en stabiliteit. Viruskweken worden ook gebruikt om een eerste inzicht te krijgen in de antivirale werking van geneesmiddelen. Met *in vitro* technieken kan echter niet aangetoond worden of er een immuunrespons optreedt, of dat een vaccin beschermt tegen infectie met het virus. Ook de interactie tussen virus en gastheer kan alleen bestudeerd worden *in vivo*. Met onderzoek in andere diersoorten kan de mate van immuunrespons van kandidaat vaccins worden gescreend, hetgeen van belang is bij het ontwikkelen van vaccin-formuleringen. Voor het onderzoek naar nieuwe vaccins/antivirale

middelen tegen Coronavirus is het gebruik van NHP nodig. Niet-humane primaten vertonen op immunologisch en fysiologisch gebied de grootste overeenkomst met de mens en de verwachting is dat de Coronavirus infectie in deze dieren sterk vergelijkbaar verloopt met die in de mens. Hierdoor zal het testen van vaccins/antivirale middelen tegen Coronavirus in niet-humane primaten een grotere voorspellende waarde voor effectiviteit en veiligheid bij de mens hebben dan in andere diermodellen.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Voor de eerste test om het infectiemodel op te zetten zijn minimaal 4 dieren nodig. Er worden meer dieren aangevraagd omdat andere doseringen van het virus, of andere toedieningswegen, dan wel andere virale stocks getest zouden kunnen worden bij het opzetten van het model. Het verloop van de ziekte en de hoeveelheid virus in het lichaam wordt nauwlettend gevolgd gedurende de infectiefase die maximaal 6 weken duurt. Afhankelijk van de uitkomst worden dieren van een andere NHP soort besmet, wordt een infectie gedaan met een andere dosis, of indien het model betrouwbaar en stabiel is, kan er een vaccin- en/of antivirale middelen studie worden ingezet. Maximaal worden 60 dieren gebruikt voor optimalisatie van het infectiemodel, waarschijnlijk blijft het echte aantal dieren dat gebruikt wordt hier ver onder. Als de infectie meetbaar, reproduceerbaar en niet te variabel is en als het virus detecteerbaar is in de trachea, is er een GO om door te gaan naar het tweede onderdeel van de studie. Als dit niet het geval is zal het experiment stoppen. In het tweede deel van de studie worden vaccins en/of antivirale middelen getest op effectiviteit en bijwerkingen. Voor de vaccintesten wordt ingeschat dat controlegroepen kleiner kunnen zijn dan behandelgroepen welke zullen bestaan uit max 10 dieren per groep. Aantallen zullen statistisch onderbouwd worden en getoetst worden door de IvD. De experimenten zijn logisch omschreven en opgebouwd. De grootte van controle en experimentele groepen is realistisch ingeschat. Het gevraagde aantal van maximaal 150 dieren voor verschillende vaccinatie en antivirale middelen studies is daarmee realistisch ingeschat. Om dosis en toedieningswijze van antivirale middelen te bepalen wordt een PK-studie gedaan als deze middelen nog niet eerder in apen zijn gebruikt. Voor de PK-studie worden groepen met maximaal 3 dieren gebruikt en er is sprake van een "within subjects design": elk dier is zijn eigen controle omdat bij hetzelfde dier meerdere doseringen getest kunnen worden. Maximaal zullen 8 verschillende antivirale middelen getest worden over een periode van vijf jaar. Het gevraagde aantal van maximaal 48 dieren is realistisch ingeschat. Voor de experimenten waarin de effectiviteit van antivirale middelen wordt getest, zullen groepen van maximaal 10 dieren gebruikt worden, waarbij indien mogelijk controlegroepen zullen worden gedeeld en indien mogelijk de

controlegroepen kleiner zijn dan behandelgroepen. Aantallen zullen statistisch worden onderbouwd en worden getoetst door de IvD. Het gevraagde aantal van maximaal 100 dieren voor de antivirale middelen studie is hiermee realistisch ingeschat.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe. De uitvoering is verfijnd door gebruik te maken van sociaal gehuisveste dieren. Dieren zijn zo veel mogelijk getraind om mee te werken aan bepaalde biotechnische handelingen zoals het ondergaan van verdoving, waardoor stress zo veel mogelijk wordt beperkt. De temperatuursensor zal onder adequate anesthesie en analgesie in de buikholtte worden geplaatst. Na plaatsen van een temperatuursensor in de buikholtte krijgen de dieren pijnstilling gedurende minstens drie dagen. Het continue meten van de lichaamstemperatuur is een verfijning van de proef, alsmede het gebruik van gevalideerde klinische observatieschalen. Deze twee zorgen er ook voor, dat het ongerief beperkt blijft tot matig omdat er tijdig ingegrepen kan worden. Er is een uitgebreid verrijningsprogramma binnen het instituut en dieren worden goed gemonitord wat betreft gedrag gedurende het gehele experiment. Als er dagelijkse verdovingen plaatsvinden krijgen de dieren extra voeding via een maagsonde. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. N.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. In onderhavige projectaanvraag worden dieren van beide geslachten gebruikt.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd. De

dieren die geïnfecteerd zijn met Corona virus zullen worden gedood aan het einde van de studie om de weefsels en organen te onderzoeken. Dieren die gebruikt worden in de PK-studie worden niet gedood.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. Nvt, de dieren kunnen na infectie niet buiten containment gehouden worden.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd? Naar de mening van de DEC beschrijft de niet-technische samenvatting het project inhoudelijk correct en in begrijpelijke taal.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag. Rechtvaardigt het opzetten van een infectiemodel voor Coronavirussen en het testen van nieuwe vaccins en geneesmiddelen hiertegen het ongerief dat niet-humane primaten wordt aangedaan, en de aantasting van hun integriteit? Is het gebruik van niet-humane primaten in dit geval gerechtvaardigd of kan de gewenste informatie ook verkregen worden door het inzetten van andersoortige proefdieren, andere onderzoeksmodellen, of patiënten?
2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende.

De waarde voor de maatschappij van nieuwe, effectieve vaccins en/of antivirale middelen is enorm, mede gelet op de huidige ontwikkelingen aangaande het SARS-CoV-2 virus epidemie (pandemie) en de sociale en economische gevolgen.

Voor de proefdieren zijn integriteit, welzijn en autonomie in het geding, door de dieren

handelingen met een wetenschappelijk doel te laten ondergaan. Een deel van de dieren wordt geopereerd om een telemetrisch apparaat in te brengen in de buikholte. Daarna worden dieren gevaccineerd en/of geïnfecteerd met Coronavirus en worden ze eventueel behandeld met antivirale middelen. De welzijnsaantasting kan resulteren in pijn na de operatie, ongerief door bloedafnames en bijbehorende sedatie, en ziekteverschijnselen veroorzaakt door de infectie met Coronavirus (verwacht wordt dat die zullen lijken op die bij de mens). Dieren die aan Coronavirus worden blootgesteld zullen aan het eind van de studie worden geëuthanaseerd. Een ander deel van de dieren wordt gebruikt om de optimale dosering en toedieningsroute voor de antivirale middelen te bepalen. Het toedienen van geneesmiddel tast de autonomie aan, evenals sedaties en bloedafnames. De welzijnsaantasting kan ook bestaan uit mogelijke bijwerkingen van het middel. Ongerief en lijden zullen zo veel mogelijk worden beperkt. Daarmee resulteert dit in maximaal matig ongerief voor de dieren.

De waarde voor het onderzoeksveld is het verkrijgen van meer inzicht in het verloop van Corona-infecties, mogelijke identificatie van virus reservoirs en identificatie van immunologische parameters die belangrijk zijn bij het ontwikkelen van nieuwe vaccins tegen Corona virussen. Ook de werkzaamheid van potentiële antivirale middelen wordt in dit project onderzocht. Voor het onderzoeksveld is van belang dat niet-humane primaten goed modelleren voor het infectieverloop en het immuunsysteem bij de mens en dat dit onderzoek bijdraagt aan extrapolatie naar de mens. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit werk leiden tot het verkrijgen van nieuwe vaccins en/of antivirale middelen tegen Coronavirus. Het verwachte ongerief voor de dieren valt daardoor moreel te verantwoorden.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*).

De DEC concludeert dat de belangen van de samenleving die worden geadresseerd in dit project zwaarder wegen dan de aantasting van de belangen/waarden van de betrokken proefdieren binnen dit project.

Het belang van de doelstelling wordt door de DEC onderschreven in het licht van de ernst van de aandoening, en de urgentie van de ontwikkeling van een nieuw vaccin en nieuwe geneesmiddelen tegen deze potentieel dodelijke infectieziekte. De doelstelling van dit project kan alleen met inzet van niet-humane primaten worden behaald.

De kennis en kunde van de aanvragers wordt onderbouwd door eerder onderzoek naar vaccins tegen vergelijkbare virussen in Java- en resusapen in dit instituut, en de vereiste expertise en voorzieningen voor dergelijk onderzoek met niet-humane primaten. De verwachting is dat het infectiemodel met Coronavirus in makaken representatief zal zijn voor de humane infectie. De zeer grote fysiologische en immunologische overeenkomsten met de mens spelen in het testen van potentiële nieuwe vaccins tegen Coronavirus een belangrijke rol. De dieren zijn specifiek gefokt voor gebruik in onderzoek.

De haalbaarheid van de doelstellingen van dit project wordt als hoog ingeschat.

De 3V-principes worden gehonoreerd door het minimale aantal dieren te gebruiken dat tot relevante uitkomsten van het experiment leidt. De resultaten met onderzoek naar deze agentia worden nauwkeurig bijgehouden en toegepast bij de opzet van deze modellen en proeven. Er is gekeken naar vervanging door andere diersoorten of *in vitro* experimenten; deze worden voorafgaand aan deze studies gebruikt voor de ontwikkeling van vaccins/geneesmiddelen maar onderzoek in NHP is nodig voordat klinische onderzoeken kunnen worden opgezet. Dit betekent ook dat alleen kandidaat geneesmiddelen en vaccins zullen worden getest die vooraf zijn geselecteerd en kansrijk zijn om daarna bij de mens te worden onderzocht. Verfijning wordt toegepast door dieren sociaal te huisvesten, gebruik te maken van temperatuursensors, pijnbestrijding toe te passen wanneer nodig en de dieren niet onnodig te laten lijden. Dieren van beide geslachten zullen worden gebruikt. Het ongerief is maximaal matig en wordt voornamelijk veroorzaakt door chirurgisch inbrengen van de telemetrische temperatuursensor en frequente sedaties. Humane eindpunten zijn goed gedefinieerd.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van deze proefdieren rechtvaardigt. Het aantal dieren dat nodig is valt te rechtvaardigen.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project. Er zijn bij de beoordeling van dit project geen knelpunten ondervonden; de inherente ethische dilemma's zijn hierboven uitgebreid uiteengezet.



Centrale Commissie Dierproeven

Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project
- 1.2 Looptijd van het project
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5)

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
-

Alle drie de virussen zijn afkomstig van dieren (zgn. zoonose), en kunnen bij de mens zeer ernstige luchtweginfecties veroorzaken. De SARS uitbraak resulteerde in 8096 ziekenhuisopnames, waarvan 774 patiënten overleden (9.5%), terwijl van MERS 2499 ziektegevallen bekend zijn, met 861 doden als gevolg (34.5%). De huidige uitbraak van SARS-CoV-2 heeft al geleid tot 73.328 gevallen met 1.873 doden (2,5 %), en heeft zich al over 28 landen wereldwijd verspreid (dd. 18/2/2020). Vanwege de ernst van de uitbraak heeft de Wereldgezondheidsorganisatie deze coronavirus-uitbraak een volksgezondheidsprobleem van internationaal belang genoemd. Op dit ogenblik zijn er nog geen geregistreerde vaccins of antivirale middelen tegen coronavirussen. Momenteel worden enkele breed-spectrum antivirale middelen ontwikkeld voor andere virale infecties, toegepast bij patiënten, maar hiervan zijn nog geen resultaten beschreven. In dit project zullen wij de beschermende werking van nieuw-ontwikkelde coronavirus-vaccins en antivirale middelen onderzoeken in een model voor coronavirusinfecties in apen

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

~~Wij willen~~ vaccins en antivirale middelen ~~evalueren~~ die gericht zijn tegen het coronavirus dat in december 2019 in China een uitbraak onder mensen veroorzaakte, het SARS-CoV-2, zullen worden getest in dit project. Het grote doel is vaccins en antivirale middelen te ontwikkelen die bescherming kunnen bieden tegen verschillende bekende en nog onbekende coronavirussen. Afgaande op de recente coronavirus uitbraak, maar ook die van het SARS-coronavirus en het MERS-coronavirussen, kunnen dergelijke vaccins en antivirale middelen veel levens redden bij een toekomstige uitbraken van coronavirussen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Maximaal 300-350 rhesusapen, en/of cynomolgus makaken, Java apen, en/of penseelapen

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

De dieren ondervinden ongerief door biotechnische handelingen, en het plaatsen van een temperatuurtransponder in de buikholte. Daarnaast kunnen de dieren ziek worden door de virusinfectie

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

Door toepassing van een humaan eindpunt wordt de welzijnsaantasting beperkt tot matig.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren die tijdens de studies worden geïnficeerd met het SARS-CoV-2 virus worden aan het einde van het experiment geëuthanaseerd. Niet geïnficeerde dieren zullen na afloop van de studie kunnen deel blijven uitmaken van de experimentele kolonie op het instuut en worden hergebruikt voor ander onderzoek terugkeren naar de kolonie

- heeft opmaak toegepast: Markeren
- heeft opmaak toegepast: Lettertype: Vet, Markeren
- heeft opmaak toegepast: Tekstkleur: Tekst 1, Markeren
- heeft opmaak toegepast: Markeren
- heeft opmaak toegepast: Markeren

4 Drie V's

4.1 Vervanging

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

Het is nog niet mogelijk om de beschermende werking van vaccins en de werkzaamheid van antivirale middelen te bepalen zonder gebruik van proefdieren. Het afweersysteem is dermate ingewikkeld dat de beschermende werking van een vaccin tegen coronavirusinfectie nog niet in het laboratorium kan worden nagebootst. Vanwege hun grote immunologische overeenkomsten met de mens zijn apen het meest geschikt voor dit vaccinonderzoek. De grote gelijkheid in metabolisme, en fysiologie met dat van de mens maakt hen ook het meest geschikt voor het onderzoek naar de veiligheid en werkzaamheid van antivirale middelen voordat deze in klinische studies in de mens worden getest.

4.2 Vermindering

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

Alleen vaccinkandidaten en antivirale middelen die eerst in andere proefdiersoorten veilig en veelbelovend zijn getest zullen in apen worden getest op hun werkzaamheid. Het aantal benodigde dieren wordt per experiment bepaald aan de hand van statistische analyses. Waar mogelijk zullen meerdere vaccins of middelen tegelijk getest worden, waardoor maar één controlegroep nodig is. Bij vaccins wordt gebruik gemaakt van een twee-fase benadering: als het vaccin geen immuunreactie opwekt, of als het nadelige invloed heeft op de gezondheid van de dieren, zal niet worden overgegaan op het infecteren met coronavirus. In de farmacokinetiek studies voor antivirale middelen zullen meerdere doseringen worden getest in hetzelfde dier, waardoor het totale aantal dieren in deze studies zo beperkt mogelijk zal zijn. In de effectiviteitsstudies wordt gebruik gemaakt van een twee-fase benadering. Na de eerste fase vindt statistische analyse plaats van de tot dan toe bereikte resultaten. Op basis van deze analyse wordt dan besloten om wel of niet door te gaan.

4.3 Verfijning

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

Onderzoek naar de werkzaamheid van coronavirusvaccins kan in diverse dieren worden uitgevoerd. Alleen in de laatste fase van de vaccinontwikkeling, voorafgaan aan testen in de mens, is uittesten in apen nodig omdat deze dieren wat betreft hun fysiologie en afweersysteem het meest op de mens lijken. Andere proefdieren, zoals knaagdieren zijn in deze fase van het onderzoek niet geschikt omdat deze virussen in muizen vaak niet een goede infectie geven en wat betreft hun afweersysteem op diverse punten afwijken van de mens. Daarom is in apen de kans het grootst dat eventuele onverwachte nadelige effecten alsnog opgespoord kunnen worden en een goede voorspelling gedaan kan worden wat betreft werkzaamheid bij de mens. Telemetrie zal worden gebruikt voor het deo-lopere-continu meten de lichaamstemperatuur. Deze informatie wordt gebruikt om de ziekteprogressie te volgen en om tijdig in te grijpen om ongerief te voorkomen. Daarbij wordt een klinische scorelijst gebruikt om te bepalen of een dier een humaan eindpunt heeft bereikt.

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

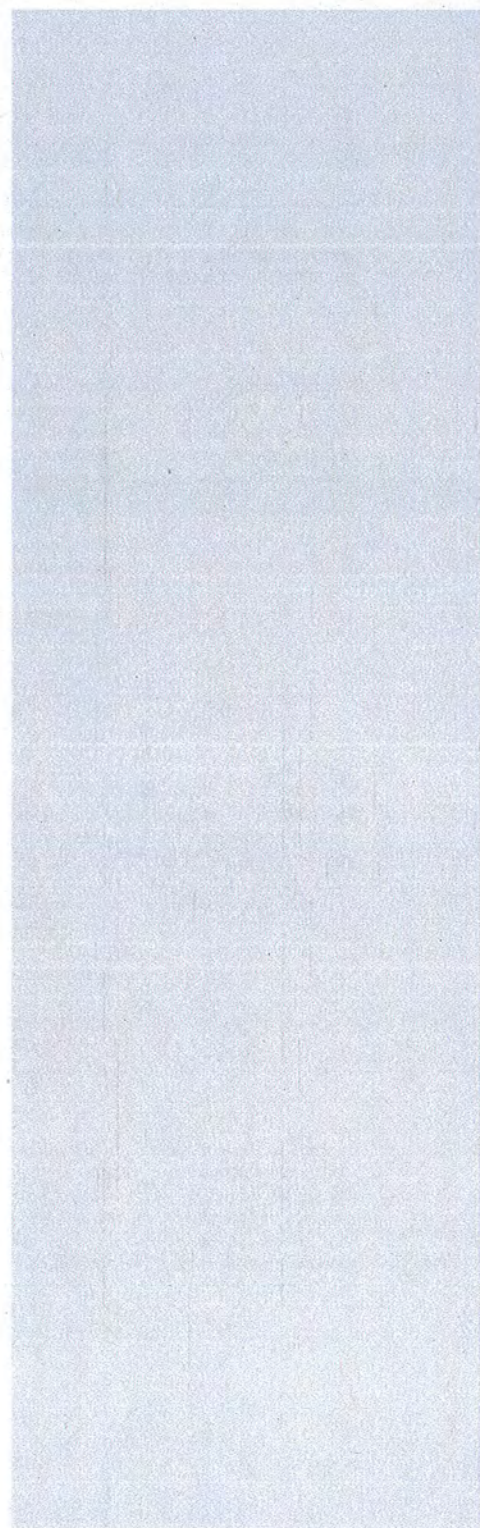
De verwachte ziekteverschijnselen zijn te vergelijken met een ernstige griep. De dieren worden intensief geobserveerd zodat wanneer ziekteverschijnselen optreden zeer snel actie kan worden ondernomen. Alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd onder verdoving. Waar nodig wordt pijnstilling gegeven. De dieren worden getraind om zoveel mogelijk vrijwillig mee te werken aan de toediening van de verdoving. Om de dieren zo veel mogelijk natuurlijk gedrag te laten vertonen is op het onderzoeksinstituut een uitgebreid programma voor diertraining en kooiverrijking opgezet.

5 In te vullen door de CCD

Publ catie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen





Centrale Commissie Dierproeven

Form Project proposal

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

1 General Information

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

10.2.g

Evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronavirus infections

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Coronaviruses (CoVs) are a group of enveloped viruses with non-segmented, single-stranded, and positive-sense RNA genomes. CoVs are important pathogens for human and other vertebrates. They infect a variety

of economically important vertebrates, such as pigs and chickens, but have also been described in birds, bats, mice, and various wild animals. However, CoVs can also infect the respiratory, gastrointestinal, hepatic and central nervous system of humans. Until the end of 2019, six human coronaviruses (HCoV) were described; HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, severe acute respiratory syndrome (SARS)-CoV, and the Middle East respiratory syndrome (MERS)-CoV (2,5,8).

Until 2002, CoVs were only known to cause mild respiratory infections in humans. However, in November 2002, a viral respiratory disease first appeared in southern China and quickly spread to other countries, leading to over 8,000 confirmed cases at the end of the epidemic in June 2003, with a mortality rate of ~9.6% (10). The causative agent was identified as SARS-CoV, a zoonotic coronavirus. SARS-CoV originated in horseshoe bats, and had later adapted to infect the intermediate host, the palm civet, and ultimately infected humans (7). After an incubation period of 4–6 days, SARS patients developed flu-like symptoms and pneumonia, which in severe cases led to fatal respiratory failure, and acute respiratory distress syndrome (9). ~~SARS-CoV can infect multiple organs and causes systemic disease, but symptoms worsen as the virus is cleared, suggesting that aberrant immune response underlies the pathogenesis of SARS-CoV (10).~~ No cases of SARS have been reported since 2004, but a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses was discovered in a cave in Yunnan, China, highlighting the necessity to prepare for future re-emergence (6).

Eight years after the SARS epidemic, in June 2012, MERS-CoV emerged in Saudi Arabia as the causative agent of a SARS-like respiratory disease (4). Although human-to-human transmission is considered limited, MERS-CoV has caused two major outbreaks in Saudi Arabia (2012) and South Korea (2015), with the global confirmed cases exceeding 2,000 and a mortality rate of ~35% (1). Similar to SARS-CoV, MERS-CoV originated in bats, but it later adapted to dromedary camels as intermediate hosts (3). Currently, no vaccines or specific antiviral drugs are available for either SARS-CoV or MERS-CoV.

For their potential to cause global epidemics, and the abovementioned lack of vaccines and antivirals, SARS and MERS are prioritized by the WHO on their R&D blueprint (11). The WHO R&D Blueprint focuses on severe emerging diseases with potential to generate a public health emergency, and for which insufficient, or no preventive (vaccines) and curative solutions (antiviral compounds) exist. The 2018 WHO list of diseases to be prioritized is:

The 2018 annual review determined that given their potential to cause a public health emergency and the absence of efficacious drugs and/or vaccines, there is an urgent need for accelerated research and development for:¹⁰

- Crimean-Congo Hemorrhagic Fever
- Ebola Viral Disease and Marburg Viral Disease
- Lassa Fever
- MERS and SARS
- Nipah and henipaviral diseases
- Rift Valley Fever
- Zika disease
- Disease X

¹⁰ The order of diseases on this list does not denote any ranking of priority.

In December 2019, a cluster of 27 patients were hospitalized in Wuhan, China, with respiratory symptoms of unknown etiology. Cases showed symptoms such as fever, dry cough, dyspnea, and radiological findings of bilateral lung infiltrates. The causative agent was quickly identified as a coronavirus, initially called 2019-nCoV (2019 new coronavirus)(12), and on 10 January its genome sequence was made publicly

available (GenBank acc. no. MN908947). On 11 February, the virus was officially named SARS-CoV-2, and the disease caused by the virus, COVID-19 (Coronavirus disease 2019).

Since the first publications, the epidemic rapidly spread: on February 18, 2020, 8:00 CET, 73.328 lab-confirmed cases were known, with 1.873 deaths, including 2 outside China. World-wide 28 countries have reported cases of COVID-19, including nine European countries (source: ECDC). International public-health authorities consider the respiratory virus a significant threat beyond China and therefore, on 29 January, the World Health Organization declared the SARS-CoV-2 outbreak a public-health emergency of international concern.

The sporadic emergence and outbreaks of new types of CoVs in the last 2 decades remind us that new CoVs are a severe global health threat. It is highly likely that new CoV outbreaks are unavoidable in the future due to the increased interactions of human with animals. Thus, there is an urgent need to develop effective therapies and vaccines against CoVs.

heeft opmaak toegepast: Engels (Verenigde Staten)

3.2 Purpose

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

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

The aim of this research project is to test the immunogenicity, efficacy, and absence of pathogenicity (safety) of novel coronavirus vaccines, and the pharmacokinetics, safety and efficacy of anti-viral compounds that are developed for use in humans in nonhuman primates (NHP). The main focus will be on coronavirus vaccines and antivirals that are designed to protect against infection with the recently emerged SARS-CoV-2.

The institute has extensive and long-standing expertise in conducting vaccination studies using nonhuman primates. Since 2012, researchers at the institute have been working on other respiratory infections, like influenza virus infection in macaques and marmosets, and on the evaluation of vaccines against influenza, and are thus skilled in working with pathogenic, airborne viruses. The institute has the appropriate facilities and experience to work with airborne pathogenic viruses at DM-III and ML-III biosafety conditions. In addition, they have the appropriate virological and immunological assays for assessment of vaccine efficacy, and to determine absence of pathogenicity. The experience with respiratory viruses guarantees that these animal studies will be adequately performed.

3.3 Relevance

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

The ongoing outbreak of SARS-CoV-2, as well as the outbreaks of pathogenic SARS- and MERS-CoVs in the last two decades, have shown the urgency of developing vaccines and antiviral compounds against these emerging coronaviruses, but also points towards the need for preparedness for future outbreaks of yet unknown CoVs. Since beginning of January 2020, over 73.000 infections with SARS-CoV-2 have been reported, with a 2-2.5% case fatality rate (dd. 18-02-20). Human-to-human transmission of the virus, in combination with an asymptomatic period during which infected people can already spread the virus to others, likely guarantee further spreading of the epidemic. Because of this concern the World Health Organization declared the coronavirus outbreak a public-health emergency of international concern.

The WHO put SARS and MERS on the 2018 list of priority diseases. For the first time WHO also included 'Disease X' on this list. Disease X is a placeholder name given by the WHO for any new unknown pathogen that may cause disease and potentially an epidemic in the future. Clearly, SARS-CoV-2 has all these characteristics of Disease X, and as such can join the MERS- and SARS-CoVs on the list.

For the listed agents, there is an urgent need for research and development of vaccines and antiviral treatments. Currently, several broad-spectrum antiviral compounds that were developed to combat other viral infections, are being used to treat patients. These compounds, like chloroquine and remdesivir, effectively inhibited SARS-CoV-2 replication in vitro (22). However, no data are available on the in vivo

Gewijzigde veldcode

Gewijzigde veldcode

Gewijzigde veldcode

efficacy against SARS-CoV-2 infection (23). Also, experts doubt whether these compounds, specifically developed for other infectious diseases, will suffice to fight this coronavirus (24).

As the main goal of this project is the evaluation of vaccines and antiviral compounds against emerging coronaviruses, with a focus on SARS-CoV-2, this project perfectly fits within the scope of the WHO strategy.

3.4 Research strategy

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

Other research groups have established nonhuman primate (NHP) models for infection with emerging coronaviruses like SARS and MERS CoV (13-17,19-21). Mostly widely used in CoV research are rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*), but their susceptibility for infection with the recently emerged SARS-CoV-2 is not yet known. Currently, the first macaque studies are ongoing in other research institutes, and our choice for a specific macaque species will probably be based on the outcome of these studies. Depending on the virus strain used, slight differences were seen in virus replication, clinical signs, and pathology, indicating that both can be used in SARS-CoV-2 studies (13,14). ~~Cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) have also proved a suitable model for infection with the SARS and MERS-CoVs (15,21), and generally show more severe clinical signs than macaques. However, the small size of the marmoset complicates sampling of blood, but also collection using swabs. For this reason, common marmosets will not be the preferred species of choice in this project, but may be used when macaque species do not meet the necessary requirements for CoV vaccine evaluation or antiviral testing, like reproducible infection.~~ At this moment we cannot predict which of the NHP species will be used in our project, ~~but the~~ The first results of the a SARS-CoV-2 infection studies study in cynomolgus macaques will become available within a few weeks show the susceptibility of this species to SARS-CoV-2 infection. Only if these studies show the susceptibility of NHP to this virus, the current project will be initiated.

In order to evaluate that a new coronavirus vaccine candidate is immunogenic, has the capacity to protect against infection, and that no adverse effects occur, a vaccine evaluation experiment will be performed according to well-established procedures, as described in Appendix 2. In case the evaluation of the capacity of a vaccine to protect against infection requires that a virus, or virus stock, has to be used that has not been tested before in NHP at our institute, then this virus will first be tested in a number of animals to determine if all animals become infected and what the amount of virus production is (type 1 experiment).

The evaluation of the efficacy of antiviral compounds to protect against infection (prophylactic use), or to interfere with an ongoing CoV infection (therapeutic use) requires that the virus inoculum stock of each new strain/serotype is tested for its infectivity and the course of viremia in the nonhuman primate species used, prior to efficacy testing (Appendix 1).

The efficacy of a specific antiviral compound is determined using two different study protocols: a prophylactic efficacy study, and/or a therapeutic efficacy study protocol, depending on the research aims set for a specific compound. In both protocols a standard viral inoculum (determined in Appendix 1), and an established antiviral compound dose (determined in Appendix 23) will be used. In both protocols, the decrease in viral load will be measured as primary indicator of antiviral activity (Appendix 4). Before starting an efficacy testing, the compound will be tested in a pharmacokinetics (PK) study, in order to assess the bioavailability and half-life of the test compound.

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

Coronavirus infection in NHP. In order to establish infectivity and pathogenicity of a new virus, or virus stock that has not been tested previously in NHP at our institute or at other institutes, animals may be infected and monitored for clinical symptoms, fever, body weight and changes in blood parameters. Nasal and tracheal swabs will be taken to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. To evaluate a new virus, the virus is inoculated via (a combination of routes); i.e. intra-bronchial, oral, intranasal, or via an aerosol. ~~Proper application in vaccine evaluation requires that in these infection studies > 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the trachea over the infection period is clearly measurable to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved, the~~

experiment will be repeated with a 10-100 times higher virus dose. In case any of the animals reaches the clinical endpoint within the first few days after infection the 10-100 times lower virus dose will be evaluated. Virus replication is monitored as described in Appendix 1.

Vaccine evaluation in NHP. For this type of experiment, animals will be immunized either once or they will receive a number of immunizations over a certain time period. During the study, animals will be monitored for adverse effects of the vaccine, including monitoring of general behavior and health. Blood and occasionally nasal washes and lung lavages will be taken to measure induction of systemic as well as local immune responses. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with coronavirus. A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls.

Pharmacokinetics (PK) of CoV antiviral compounds in NHP. For this type of study, animals will be administered with different dosages of an antiviral compound. If necessary, the compound may be given at multiple time-points over a certain time period. At regular time-points after administration, blood samples will be collected for measurement of the concentration of the compound, or active component thereof. In parallel, blood chemistry and hematology will be performed to monitor for adverse effects of the compound. General behaviour, health, body weight, and body temperature will also be monitored.

CoV antiviral efficacy study in NHP. We will focus on the therapeutic (= curative) use of antiviral compounds. The efficacy of a specific compound against CoV may be determined using two different study protocols: a prophylactic efficacy study, or in a therapeutic efficacy study protocol, depending on the research question. In both protocols we will make use of a standard viral inoculum, and an established antiviral compound dose will be used. In the prophylactic efficacy study protocol animals will first be given a viral inoculum, followed by experimental infection with the virus. In the therapeutic efficacy study protocol, the animals will first be infected, and at a later time-point be given the antiviral compound. In the protocols, the absence or decrease in viral load in nasal and tracheal swabs will be measured as an indicator of antiviral activity. Additionally, during the studies the animals will be monitored for adverse effects of the compound, including monitoring of general behaviour and health. A group of non-treated animals will be included as infection controls.

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

Antiviral compounds are first tested *in vitro*, and in other animal models, like rodents, before they are evaluated for safety and efficacy in NHP. Equally, only vaccine candidates and antiviral compounds that have previously been tested for safety and efficacy-immunogenicity in other test species will be tested for their efficacy in NHP.

Candidates that fulfil these criteria for evaluation in NHP may be directly tested in a vaccine evaluation on study (Appendix 2), or antiviral compound PK study (Appendix 3), or efficacy study (Appendix 4) if the coronavirus that is to be used for establishing capacity of the vaccine to protect against infection has already been used in NHP at our institute. If this is not the case then the virus has to be tested first in a coronavirus infection study (Appendix 1). Requirements to proceed from coronavirus infection study to vaccine evaluation or antiviral efficacy studies are: a) more than 80% of the animals have become infected, b) variance between animals is such that a vaccine evaluation study less than 10 animals per test group suffice to obtain statistically significant results, c) no animals reach the clinical endpoint within 4 days after infection.

Reference List

1. Aasiyah Chafekar, Burtram Fielding. (2018). MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*, 10(2), 93.
2. Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D. (2020). Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of Medical Virology*, jmv.25681.
3. Corman, V. M., Ithete, N. L., Richards, L. R., Schoeman, M. C., Preiser, W., Drosten, C., & Drexler, J. F. (2014). Rooting the Phylogenetic Tree of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus by Characterization of a Conspecific Virus from an African Bat. *Journal of Virology*, 88(19), 11297-11303.

heeft opmaak toegepast: Lettertype: Cursief

4. de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., et al. (2013). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, 87(14), 7790–7792.
5. Fung, T. S., & Liu, D. X. (2019). Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 529–557.
5. Hu, B., Zeng, L.-P., Yang, X.-L., Ge, X.-Y., Zhang, W., Li, B., et al. (2017). Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathogens*, 13(11), e1006698.
7. Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J. H., et al. (2005). Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science (New York, NY)*, 310(5748), 676–679.
8. Okba, N. M., Raj, V. S., & Haagmans, B. L. (2017). Middle East respiratory syndrome coronavirus vaccines: current status and novel approaches. *Current Opinion in Virology*, 23, 49–58.
9. Peiris, J. S. M., Lai, S. T., Poon, L. L. M., Guan, Y., Yam, L. Y. C., Lim, W., et al. (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *The Lancet*, 361(9366), 1319–1325.
10. Perlman, S., & Netland, J. (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(6), 439–450.
11. WHO. (2018). 2018 WHO Research and Development Blueprint. *Who*, 1–17.
12. Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., et al. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, NEJMoa2001017.
13. Gong, S.-R., & Bao, L.-L. (2018). The battle against SARS and MERS coronaviruses: Reservoirs and Animal Models. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(2), 125–133.
14. Sutton, T. C., & Subbarao, K. (2015). Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*, 479–480, 247–258.
15. Carrion, R., Jr, & Patterson, J. L. (2012). An animal model that reflects human disease: the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Current Opinion in Virology*, 2(3), 357–362.
16. Fouchier, R. A. M., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G. J. J., van den Hoogen, B. G., et al. (2003). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 423(6937), 240.
17. Prescott, J., Falzarano, D., de Wit, E., Hardcastle, K., Feldmann, F., Haddock, E., et al. (2018). Pathogenicity and Viral Shedding of MERS-CoV in Immunocompromised Rhesus Macaques. *Frontiers in Immunology*, 9, 1814.
18. Rowe, T., Gao, G., Hoqan, R. J., Crystal, R. G., Voss, T. G., Grant, R. L., et al. (2004). Macaque Model for Severe Acute Respiratory Syndrome. *Journal of Virology*, 78(20), 11401–11404.
19. van Doremalen, N., & Munster, V. J. (2015). Animal models of Middle East respiratory syndrome coronavirus infect on *Antiviral Research*, 122, 28–38.
20. Yao, Y., Bao, L., Deng, W., Xu, L., Li, F., Lv, Q., et al. (2013). An Animal Model of MERS Produced by Infection of Rhesus Macaques With MERS Coronavirus. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(2), 236–242.
- 20.
21. Yu, P., Xu, Y., Deng, W., Bao, L., Huang, L., Xu, Y., et al. (2017). Comparative pathology of rhesus macaque and common marmoset animal models with Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS One*, 12(2), e0172093.
22. Wang, M et al. (2020). Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Research*, (2020) 0:1–3
23. Gilead launches remdesivir's Phase III trials in Cov d-19 patients. (2020) [https://www.clinicaltrialsarena.com/news/gilead-remdesivir-phaseiii-cov d-19/](https://www.clinicaltrialsarena.com/news/gilead-remdesivir-phaseiii-cov-d-19/)

heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, 9 pt
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Tekstkleur: Auto
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Tekstkleur: Auto
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, 9 pt
heeft opmaak toegepast: Tekstkleur: Auto
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, 9 pt
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, Cursief
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, 9 pt, Tekstkleur: Aangepaste kleur (RGB(10;10;10))
heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, 9 pt
Gewijzigde veldcode
heeft opmaak toegepast: Hyperlink, Lettertype: Verdana, 9 pt, Tekstkleur: Auto

24. Lewis, T. (2020). **A Promising Antiviral Is Being Tested for the Coronavirus—but Results Are Not Yet Out**. *Scientific American*. <https://www.scientificamerican.com/article/a-promising-antiviral-is-being-tested-for-the-coronavirus-but-results-are-not-yet-out/>

21.

Met opmaak: Inspringing: Links: -0,13 cm, Rechts: 0,79 cm, Afstand Voor: 0 pt, Na: 0 pt, Regelafstand: Minimaal 13,5 pt, Meerdere niveaus + Niveau: 1 + Nummeringstijl: 1, 2, 3, ... + Beginnen bij: 1 + Uitlijning: Links + Uitgelijnd op: 0,63 cm + Inspringen op: 1,27 cm

heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana, 9 pt

heeft opmaak toegepast: Lettertype: 9 pt

Met opmaak: Inspringing: Links: 0,5 cm, Geen opsommingstekens of nummering

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Development of a Coronavirus virus infection model in nonhuman primates
2	Vaccine evaluation in nonhuman primates
3	Pharmacokinetics (PK) of CoV antiviral compounds in nonhuman primates
4	CoV antiviral efficacy study in nonhuman primates
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

1

Development of a coronavirus virus infection model in nonhuman primates

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In order to establish the capacity of a vaccine to protect against coronavirus infection-, or to determine the therapeutic efficacy of an antiviral compound, it is necessary to have a well-defined coronavirus infection model. For new emerging coronaviruses, or viral strains that have not yet been used in NHP, it is necessary to establish infectivity and pathogenicity in NHP before they can be applied in vaccine efficacy evaluation studies. The main objective is to obtain an infection model that is sufficiently robust to allow adequate evaluation of vaccine efficacy in terms of reduction in clinical symptoms, fever and virus replication.

Typically, the study set-up is as follows: a small number of animals will be infected and monitored for clinical symptoms, fever, changes in body weight and changes in blood parameters. Nasal and tracheal swabs will be taken to determine if the animals have become infected and what the amount of virus production is. To evaluate a new virus, the virus can be inoculated by various (and combinations of) routes, like intravenous, intratracheal, oral, intranasal, intraocular, and aerosol. Proper application for vaccine evaluation requires that more than 80% of the animals become infected and that the amount of virus produced in the respiratory tract over the infection period is clearly measurable and that the variation between the animals is sufficiently low to allow measurement of reduction in virus load in vaccinated animals with less than 10 animals per group. In case these parameters are not achieved then the experiment will be repeated with a higher dose. In case any of the animals reaches the clinical endpoint within the first four days after infection, then a lower virus dose will be evaluated.

The primary outcome parameters for virus infection are:

1. Clinical symptoms, fever, virus replication.

2. Pathology in case viruses are used that are known to cause persistent lung pathology.

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

At least four weeks before infection, a telemetric temperature ~~transponder-sensor~~ will be implanted in the abdominal cavity of the animals that will allow continuous monitoring of body temperature. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate temperature recording during a two to three-weeks period to establish normal values before infection.

Then, the animals will be infected by intravenous, intradermal, intranasally, intra-tracheally, intra-bronchially using a bronchoscope, via aerosol, or a combination of these routes. At the same time, blood is collected for a baseline-value determination. The animals will be monitored daily during the study period for general behaviour, appetite, faeces, etc., and at each time-point when the animals are sedated, body weight will be measured. Typically, shortly before, and after infection of the animals, nasal and tracheal swabs and/or washes will be taken to measure virus replication in the upper airways. Lung lavages may be taken at selected time points (max 6 times) to measure virus replication in the lungs. Blood is taken simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters and leucocyte subsets, as well as to monitor the development of plasma viremia. At the same time points body weight is recorded and imaging (X-ray or PET-CT scan) may be performed to measure lung infiltration. After the animals have become virus-negative in the PCR on swab/wash samples for the first time, they may be followed for 4 weeks to confirm absence of the virus and to monitor for potential re-activations of virus replication. Thus, the length of an infection study will be maximally 6 weeks. At the end of the study, the animals will be humanely euthanized and necropsy will be performed for the collection of tissue samples for histopathological and virological tests. The latter will be done to investigate tissue and organ distribution of the virus, and to identify potential viral reservoirs. Viral reservoirs may contribute to virus re-activation, and are therefore of particular interest.

The details of each study, regarding the NHP species used, route of infection, dose used, etc., will be submitted for approval to the AWB.

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

The initial experiment, in which the NHPs are inoculated with the virus, will be performed in four animals. Experience by other researchers in the SARS and MERS NHP infection models has shown that with this number of animals an adequate assessment can be made on the reproducibility of infection (all 4 animals need to show virus replication in the ~~trachea~~upper respiratory tract), the variability of virus production in the trachea and the amount of fever induction. On the basis of these data a power calculation can be made about the number of animals needed in a vaccine evaluation study. Should the result of these calculations be that more than 10 animals are needed per group, or should not all four animals have become infected, then a new experiment with 4 animals is needed with a higher virus dose. Also, if at a high virus dose the variation between the animals is still too high then it may be necessary to repeat the experiment in another NHP species.

B. The animals

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

The experiment will be performed in macaques ~~or common marmosets~~, adult, M/F, n= 60.

Both rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) have been shown to be susceptible to emerging coronaviruses, like SARS and MERS (2-4,7-11), but their susceptibility for infection with the recently emerged SARS-CoV-2 is not yet known. Currently, the first macaque studies are ongoing in other research institutes, and our choice for a specific macaque species will probably be based on the outcome of these studies. Both macaque species have been widely used in emerging coronavirus pathogenesis and vaccine research. Depending on the virus strain used, slight differences were seen in virus replication, clinical signs, and pathology, indicating that both can be used in SARS-CoV-2 studies (4,9).

~~Common marmosets (*Callithrix jacchus*) have also proven a suitable model for infection with the SARS and MERS CoVs (2,12), and generally show more severe clinical signs than macaques. However, the small size of the marmoset complicates sampling of blood, as well as collection using swabs. For this reason,~~

~~common marmosets will not be the preferred species of choice in this project, but may be used when macaque species do not meet the necessary requirements for CoV vaccine evaluation, like reproducible infection, or clear signs of disease.~~

Thus, ~~at~~At this moment we cannot predict which of the NHP ~~macaque~~ species will be used in our studies to establish the infection model. The choice will depend on currently ongoing studies in NHP in other institutes.

In the literature, SARS and MERS CoV have been used at a dose of 10^6 to 10^7 TCID₅₀ in NHP (4). However, it may be necessary to evaluate an extra dose in some cases. Assuming 4 animals per group, the evaluation of 3 new viral strains, at 3 doses, the number of animals needed will be 36. In case it is necessary to use another NHP species, or another route of infection we calculate the use of $2 \times 12 = 24$ additional animals. Thus, the total maximum number of animals needed for setting up infection models for new coronaviruses is expected maximally 60 over a period of 5 years.

All animals are purpose bred. They are either bred at our institute or obtained from a certified supplier. Both male and female animals can be used.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments, have possibly been used in previous experiments/procedures. Animals that have pre-existing antibodies against recently emerged coronaviruses are not suitable. In view of the long life of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

Several animal species have been used to study coronavirus infection (2-4,7-10). However, of these different species, NHP have the advantage that they physiologically and immunologically most closely resemble humans. This has important implications, both for vaccine evaluation (Appendix 2), as well as for the interaction with coronaviruses, since this is affected both by physiology and by the reaction of the innate and adaptive immune system. As explained in Appendix 2, these aspects are important for the evaluation for vaccines. The proper evaluation of these vaccines requires adequate infection models in NHP, which is the purpose of the studies proposed here.

Reduction

Based on the extensive experience with other viral infection models within the institute where this research will be performed, it is expected that four animals per test group are sufficient in order to determine whether a suitable infection model has been achieved and to perform a power calculation to determine the number of animals needed in a vaccine or antiviral compound evaluation study. In case the criteria, as outlined under A are not met, a second experiment may be needed with another dose or in another NHP species. On the basis of the outcome of the first study the number of animals needed in follow up experiments can be calculated and less animals may be needed. Only the minimum number of animals needed, will be used.

Currently, no (published) data are available on the infection of NHP with this new coronavirus. However, it can be expected that such data become available in due time. If possible, these data will be used, and may result in the use of less animals

Refinement

The use of telemetric temperature ~~recording devices~~ sensors makes it possible to continuously record the temperature during the study-period. For our studies with the H1N1 influenza virus, we have designed a method that allows very precise calculation of fever induction caused by the infection using this method (6). In influenza studies, a significant reduction in ~~temperature~~ fever by some of the vaccine candidates was observed (5). This method will also be applied in this project. Such precise measurements are not possible with the traditional rectal temperature measurement. Placement of the telemetric ~~device~~ temperature sensor for body temperature measurement will require surgery, which will be done under anaesthesia. Subsequently animals will receive analgesics as long as required. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handling procedures, such as receiving the sedation. The application of X-ray or PET-CT scanning to measure lung infiltration will give us a ~~better~~ insight in the disease progression of the CoV infection. X-ray or PET-CT scanning will be performed when animals are already sedated for sampling of blood and swabs, and will thus not cause additional discomfort.

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

Animals will be socially housed with a socially compatible cage mate. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food. During the study animals will be observed daily by qualified animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. During the infection animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining et al. (1; see below). On the basis of the scoring system a clinical endpoint is defined. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a necropsy will be performed to determine the cause of disease. All handling procedures will be performed under sedation. On every time point when a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the first days of the infection the animal will receive tube feeding. This is necessary, because the daily sedations of the animals necessitate fasting of the animals, and the food intake during this period would otherwise be very limited.

Regular analysis of haematological and clinical chemistry parameters is part of the experiment. During these experiments, the virus load in plasma will also be analysed as an indicator of infection. These data will also be consulted to determine if changes in behaviour, appetite or stool are clinically relevant. If necessary, judged by the veterinarian, measures will then be taken to treat the animal.

The "Flora and Fauna wet" and "Wet Dieren" do not pose additional requirements that are needed for the type of studies proposed in this application.

Reference List

1. Brining, D. L., Mattoon, J. S., Kercher, L., LaCasse, R. A., Safronetz, D., Feldmann, H., & Parnell, M. J. (2010). Thoracic radiography as a refinement methodology for the study of H1N1 influenza in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Comparative Medicine*, 60(5), 389–395.
2. Carrion, R., Jr, & Patterson, J. L. (2012). An animal model that reflects human disease: the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Current Opinion in Virology*, 2(3), 357–362.
3. Fouchier, R. A. M., Kuiken, T., Schutten, M., van Amerongen, G., van Doornum, G. J. J., van den Hoogen, B. G., et al. (2003). Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 423(6937), 240.
4. Gong, S.-R., & Bao, L.-L. (2018). The battle against SARS and MERS coronaviruses: Reservoirs and Animal Models. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(2), 125–133.
5. Marriott, A. C., Dove, B. K., Whittaker, C. J., Bruce, C., Ryan, K. A., Bean, T. J., et al. (2014). Low Dose Influenza Virus Challenge in the Ferret Leads to Increased Virus Shedding and Greater Sensitivity to Oseltamivir. *PloS One*, 9(4), e94090.
6. Mooij, P., Koopman, G., Mortier, D., van Heteren, M., Oostermeijer, H., Fagrouch, Z., et al. (2015). Pandemic Swine-Origin H1N1 Influenza Virus Replicates to Higher Levels and Induces More Fever and Acute Inflammatory Cytokines in Cynomolgus versus Rhesus Monkeys and Can Replicate in Common Marmosets. *PloS One*, 10(5), e0126132.

7. Prescott, J., Falzarano, D., de Wit, E., Hardcastle, K., Feldmann, F., Haddock, E., et al. (2018). Pathogenicity and Viral Shedding of MERS-CoV in Immunocompromised Rhesus Macaques. *Frontiers in Immunology*, 9, 1814.
8. Rowe, T., Gao, G., Hogan, R. J., Crystal, R. G., Voss, T. G., Grant, R. L., et al. (2004). Macaque Model for Severe Acute Respiratory Syndrome. *Journal of Virology*, 78(20), 11401–11404.
9. Sutton, T. C., & Subbarao, K. (2015). Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*, 479-480, 247–258.
10. van Doremalen, N., & Munster, V. J. (2015). Animal models of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antiviral Research*, 122, 28–38.
11. Yao, Y., Bao, L., Deng, W., Xu, L., Li, F., Lv, Q., et al. (2013). An Animal Model of MERS Produced by Infection of Rhesus Macaques With MERS Coronavirus. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(2), 236–242.
12. Yu, P., Xu, Y., Deng, W., Bao, L., Huang, L., Xu, Y., et al. (2017). Comparative pathology of rhesus macaque and common marmoset animal models with Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS One*, 12(2), e0172093.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

After placing the telemetric temperature sensor in the abdomen, the animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some fever during the first days after insertion of the temperature recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation. After placing the telemetric temperature recording device sensor in the abdomen, the animals will receive analgesics for as long as necessary.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort because of insertion of the telemetric temperature sensor temperature recording device.
2. Discomfort due to lung lavages
3. Discomfort due to virus installation
4. Stress because of sedation
5. Reduced food intake during the first days after infection
6. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

1. The surgery needed for insertion of telemetric temperature sensor the temperature recording device will cause pain and some local inflammation.
2. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insertion will cause irritation
3. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this will cause irritation.
4. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling, virus infection, collection of swabs and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
5. Especially during daily sedation during the first days after infection, food intake will be reduced.
6. Coronavirus infections can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, loss of appetite, loss of weight, inactivity.

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

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. For the lung lavages animals are first deeply sedated and receive a muscle relaxant.
3. The same procedure as described under 2 will be followed.
4. Recovery of the animals is monitored by the animal caretakers, and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
5. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
6. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached the animal will be humanely euthanized and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory organs

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

X Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached the animal will be humanely euthanized. Individual scores are added and decision is based on the total daily score. Symptoms that lead to an immediate endpoint are respiratory problems (convulsive breathing, flank contraction) or lack of breathing, lethargy as defined by minimal response to human approach, and excessive loss of body weight of more than 15% in two days or 20% from the start of the infection.

Indicate the likely incidence.

100%

K. Classification of severity of procedures

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

Discomfort is caused by the implantation of the telemetric ~~device~~ **temperature sensor**. By using this device, the animals can be continuously monitored for changes in body temperature. In combination with frequent observations by animal caretakers, this will facilitate the appropriate intervention by veterinarians at the earliest time-point, and will preclude progression to serious disease caused by coronavirus infection. Therefore, the cumulative discomfort will be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

X Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals will be euthanized in case they show serious signs of disease in order to avoid severe discomfort. To investigate the presence of virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by CoV, it is necessary to euthanize the animals at the end of the study
Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

X Yes



Centrale Commissie Dierproeven

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

10.2.g

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Vaccine evaluation in nonhuman primates

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We will make use of a general study protocol for the evaluation of CoV vaccines in NHP. Typically, a telemetric temperature ~~sensor~~ is surgically placed in the abdominal cavity before the start of the study to evaluate body temperature in real-time. Subsequently, the animals are immunized either once or they receive a number of immunizations over a certain time period. Although the vaccines that are used in these studies have already been extensively evaluated in other animal models, and are expected to give no or only very limited adverse effects, animals will be monitored for possible changes in general behavior and health. The site of immunization will be checked for local reactions and blood will be drawn to measure clinical chemistry and hematology parameters. Before, between, and after immunizations, blood and occasionally nasal and tracheal swabs or washes, and lung lavages will be taken to measure induction of systemic as well as local immune responses. When adequate immune responses are induced that indicate that protection against infection might be achieved, the efficacy against infection will be tested by experimental infection with coronavirus. As it is currently not known what type of immune response, and also the strength of this response, is necessary to protect against this new virus, quantitative criteria for the decision to proceed with an experimental challenge cannot be given. A detectable vaccine-induced immune response in more than 50% of the animals will therefore be used as criterium to proceed with challenge of the vaccinated animals.

A group of non-vaccinated animals will be included as infection controls. The infection will be performed as described in Appendix 1.

The primary outcome parameters are:

Absence of unexpected reactivity of the vaccine: effects of the vaccine on general behavior, health, local reactions and blood parameters.

Immunogenicity: Induction of cellular and humoral immune responses. The type and strength of the induced responses will determine if the objectives of the vaccine strategy are achieved and whether immune responses are sufficiently strong to proceed with viral challenge.

Efficacy: Capacity to protect against viral challenge will be established in terms of reduction in clinical symptoms, fever, virus replication, and changes in blood parameters.

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

A telemetric temperature **recorder/transponder sensor** is surgically placed in the abdominal cavity at least 4 weeks before the first immunization takes place. This time frame is necessary for full recovery of the animals and to allow adequate temperature recording during a 2- to 3-weeks period to establish normal values before immunizations start.

Animals will receive one or more immunizations, typically at 4- to 8-week time intervals, although occasionally a longer time frame is needed between immunizations when different vaccine modalities are used for priming and boosting of the immune response. Usually 3 immunizations suffice over a period of 20 weeks. However, in rare occasions these limits may have to be exceeded. Specific rationale will then be presented to the animal welfare body (AWB).

Immunizations will be done either by intradermal injection, intramuscularly, subcutaneously, intravenously, intranasally, intra-tracheally, intra-bronchially using a bronchoscope, via jet-injection, or via aerosol using a nebulizer. Intravenous injection requires that an isotonic and pH neutral solution is used, under guidance of a veterinarian with a shock set ready. All vaccines will be sterile and will be given under aseptic conditions.

At regular time intervals, usually two and four weeks after every immunization, blood is drawn to measure systemic adverse effects, which includes measurement of clinical chemistry and hematology, and to measure induction of cellular and humoral immune responses. The two-week interval after immunization is chosen because this is optimal for measuring cellular immune responses, while four weeks is optimal for measuring humoral immune responses. The total amount of blood will be less than 1% of the body weight per month and less than 0,7% of body weight per bleeding. This amount can only be exceeded if the specific study requirements leave no other options, specific permission is obtained from the AWB, and the veterinarian agrees, based on the health status of the animal. Occasionally, usually before the start of the study and after the last immunisation, a nasal wash and lung lavage is taken in order to measure induction of local immune responses. Lymph node biopsies may be taken to study local immune responses in lymphoid tissue. Immune responses recorded after the final immunization will be used to decide whether protection against viral challenge can be reasonably expected. If these responses are inadequate then the study will be stopped and animals may be re-used in other non-coronavirus related experiments. Otherwise, experimental challenge will usually take place between 4 and 8 weeks after the last immunization. This time period is needed to allow immunological memory to form after the last immunization. CoV infection may be done intravenously, intradermally, intranasally, intra-tracheally, or intra-bronchially using a bronchoscope, or via aerosol (Appendix 1). Clinical symptoms will be monitored twice daily during the infection phase. Nasal and tracheal swabs will be taken before infection and at regular time points post-infection to measure virus replication in the upper airways. Lung lavages may be taken at selected time points (max. 6 times) to measure virus replication in the lungs. Blood is taken simultaneously with the swabs, to monitor changes in clinical chemistry and haematology parameters, leucocyte subsets and cytokine production. At the same time points body weights are recorded and imaging (X-ray or PET-CT scan) may be performed to measure lung infiltration. At the end of the study, the animals are humanely euthanized and a full necropsy is performed in order to establish (lung) pathology. In case an animal should reach the clinical endpoint during the study, it will be immediately humanely euthanized and a full necropsy will be performed. Also, tissues will be taken to determine virus dissemination.

The details of each study, regarding the interval between the immunizations, the number and time points of sampling, the specific criteria to proceed with a viral challenge, the time interval between the last immunization and viral challenge will depend on the actual type of vaccine that is being tested and this will be submitted to the AWB.

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

The number of animals will be based on statistical power analysis. Calculations account for the number of animals needed to measure statistically significant induction of immune responses in relation to unvaccinated controls or, in case different vaccines are compared, whether significant differences between the vaccine groups can be obtained.

In addition, calculations are performed to establish the number of animals needed to obtain a significant reduction in virus load between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Since historical data are available on infection in unvaccinated animals (Appendix 1), usually less animals can be used in the non-vaccinated challenge control group than in the vaccine groups.

B. The animals

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

The experiment will be performed in rhesus macaques, and/or cynomolgus macaques, ~~and/or common marmosets~~, adult, M/F, maximally n=150.

Macaque species have been extensively used in coronavirus research (6,7). The most often used species are the rhesus macaque (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). Both species are susceptible to an array of (emerging) coronaviruses. The decision to use rhesus or cynomolgus macaques will be based on currently ongoing infection studies with the recently emerged SARS-CoV-2, and studies already performed with SARS and MERS CoVs in NHP. ~~Equally, common marmosets (*Callithrix jacchus*) may be used as they have proven a suitable model for infection with the SARS and MERS CoVs (2,9), and generally show a severe clinical signs in the macaques.~~ All animals are purpose bred at our institute or obtained from a certified supplier. Both male and female animals can be used. The number of animals calculated assumes that each study will contain two vaccine groups and 1 control group, with max. 10 animals per group. The group size will be determined per experiment, and will be based on power calculations using reduction of virus load as primary outcome measure specific for the experiment.

As stated above, probably fewer animals will be needed in the non-vaccinated challenge control groups. In all, we anticipate performing 5 such studies over a 5-year period.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Animals that will be used in these experiments have possibly been used in previous experiments. Animals that have pre-existing antibodies against recently emerged coronaviruses are not suitable. In view of the long life of the animals of this species re-use of animals will take place within the limitations described in art 1e of the Wet op de Dierproeven.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

The immune system is very complex and the *in vivo* interactions between virus and/or vaccine and host are not completely understood. At present there is no *in vitro* model available that can mimic the human immune system sufficiently to study the potential of a vaccine to induce protective immune responses.

Met opmaak: Regelafstand: Meerdere 1,15 rg

heeft opmaak toegepast: Lettertype: Verdana

Met opmaak: Links, Regelafstand: Meerdere 1,15 rg

Due to the complex interaction of coronaviruses with different tissues and the role of local immunity in eradication of the virus, the efficacy of a CoV-vaccine to protect against infection can only be adequately established in an animal model. Several animal species have been used to study infection of emerging coronaviruses, like SARS and MERS (3,6,7). However, NHP have the advantage that their immune system most closely resembles that of humans. In addition, the availability of many cross-reactive reagents makes it possible to study in detail the contribution of the innate immune system and to analyse vaccine induced immune responses and evaluate their role in control of infection. These aspects are essential for the evaluation of vaccines, especially for vaccines designed to protect to a range of CoVs. The latter type of 'universal' CoV vaccines will aim for the induction of cross-protective cellular immune responses or induction of broadly cross-neutralizing antibody responses or non-neutralizing antibody responses that become effective through interaction with innate immune cells. Here, the close homology between the immune system in NHP and humans is essential for proper induction and adequate analysis of these responses, allowing a better extrapolation to the human situation. Evaluation in NHP is therefore needed before clinical evaluation in humans can start.

Reduction

The number of animals needed per experiment will be based on statistical power calculation for achieving statistically significant induction of immune responses and a significant reduction in virus load in the trachea between the vaccine groups and the challenge control group. Only the minimum number of animals needed will be used. Since historical data are available on infection in unvaccinated animals (Appendix 1), usually less animals can be used in the challenge control group than in the vaccine groups. ~~Furthermore, we aim to evaluate multiple vaccine candidates in a single experiment, so that a single challenge control group can be used. This has to be weighed against the fact that in order to obtain significant differences in immune response between the vaccine groups, more animals per vaccine group may be needed.~~

Refinement

The use of telemetric temperature ~~recording devices~~ sensors makes it possible to record and monitor the temperature in real-time. We have designed a method that allows very precise calculation of fever induced on caused by the infection (5). With this method we have observed a significant reduction in temperature by some of the vaccine candidates (4). Such precise measurements are not possible with the traditional rectal temperature measurement. Placement of the telemetric temperature sensors will require surgery, which will be done under anaesthesia. Subsequently, animals will receive analgesics as long as required, typically 3 days. Animals are trained to cooperate as much as possible for the invasive handlings, such as receiving the sedation. The application of X-ray or PET-CT scan to measure lung infiltration will give us a better insight in the disease progression of the CoV infection. X-ray or PET-CT scanning will be performed when animals are already sedated for sampling of blood and swabs, and will thus not cause additional discomfort.

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

Animals will be socially housed with a socially compatible cage mate. There is an extensive program for enrichment in our institute that consists of playing material and methods to present food.

During the study animals will be observed daily by qualified and competent animal caretakers. Should changes occur in behaviour, appetite or stool then a veterinarian will be informed and measures will be discussed with the investigator and implemented. Possible local reactions on the injection site of the vaccine will be recorded at multiple time points using a scoring system that includes redness, swelling and induration. In case substantial induration is seen, then the wound will be treated and analgesics will be applied. During the infection phase, animals will be observed twice daily and clinical symptoms will be scored using a well-established clinical scoring list adapted from Brining *et al.* (1) On the basis of the scoring system a clinical endpoint is defined. When this endpoint is reached the animal will be immediately euthanized and a full necropsy will be performed to determine the cause of clinical disease. All handlings will be performed under sedation. On every time point where a handling is performed the animal will be weighed and closely examined. During the period after infection when animals are sedated daily, they will receive tube feeding. This is necessary, because animals have to fast the night before the sedation and the food intake during this period would otherwise be very limited.

The "Flora and Fauna wet" and "Wet Dieren" do not pose additional requirements that are needed for the type of studies proposed in this application.

Reference List

1. Brining, D. L., Mattoon, J. S., Kercher, L., LaCasse, R. A., Safronetz, D., Feldmann, H., & Parnell, M. J. (2010). Thoracic radiography as a refinement methodology for the study of H1N1 influenza in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *Comparative Medicine*, 60(5), 389–395.
2. Carr on, R., Jr, & Patterson, J. L. (2012). An animal model that reflects human disease: the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Current Opinion in Virology*, 2(3), 357–362.
3. Gong, S.-R., & Bao, L.-L. (2018). The battle against SARS and MERS coronaviruses: Reservoirs and Animal Models. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(2), 125–133.
4. Marr ott, A. C., Dove, B. K., Whittaker, C. J., Bruce, C., Ryan, K. A., Bean, T. J., et al. (2014). Low Dose Influenza Virus Challenge in the Ferret Leads to Increased Virus Shedding and Greater Sens itiv ity to Oseltamivir. *PLoS One*, 9(4), e94090.
5. Mooij, P., Koopman, G., Mortier, D., van Heteren, M., Oostermeijer, H., Fagrouch, Z., et al. (2015). Pandemic Swine-Origin H1N1 Influenza Virus Replicates to Higher Levels and Induces More Fever and Acute Inflammatory Cytokines in Cynomolgus versus Rhesus Monkeys and Can Replicate in Common Marmosets. *PLoS One*, 10(5), e0126132.
6. Sutton, T. C., & Subbarao, K. (2015). Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus. *Virology*, 479–480, 247–258.
7. van Doremalen, N., & Munster, V. J. (2015). Animal models of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Antiviral Research*, 122, 28–38.
8. Yu, P., Xu, Y., Deng, W., Bao, L., Huang, L., Xu, Y., et al. (2017). Comparative pathology of rhesus macaque and common marmoset animal models with Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PLoS One*, 12(2), e0172093.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

After placing the ~~telemetric temperature sensor~~ ~~temperature recording device~~ in the abdomen, the animals will receive analgesics for as long as necessary, typically 3 days. In previous studies we have observed that animals can experience some fever during the first days after insert on of the temperature recording device, but have recovered very well within 1 week after the operation.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Discomfort because of insertion of the ~~telemetric temperature sensor~~ ~~temperature recording device~~.
2. Discomfort due to injection
3. Discomfort due to lung lavages
4. Discomfort due to virus installation
5. Stress because of sedation
6. Reduced food intake during the first days after infection
7. Disease symptoms due to the infection

Explain why these effects may emerge.

1. The surgery needed for insert on of ~~telemetric temperature sensor~~ ~~the temperature recording device~~ will cause pain and some local inflammation.
2. When vaccines are given by injection, this can cause local pain and irritation.
3. For the lung lavages a bronchoscope is used. Insert on will cause irritation
4. When virus is given intra-bronchially a bronchoscope is used and this will cause irritation.
5. Animals will be repeatedly sedated for blood sampling, virus infection, collection of swabs and lung lavages. Nausea can sometimes be observed during recovery from the sedation.
6. Especially during daily sedation during the first days after infection food intake will be reduced.
7. Coronavirus infections can cause fever, coughing, sneezing, nose discharge, laboured breathing, loss of appetite, loss of weight, inactivity.

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

1. Surgery will be done under anaesthesia and after surgery analgesics will be applied.
2. Animals will be sedated for vaccine delivery.
3. For the lung lavages animals are first deeply sedated and receive a muscle relaxant.
4. The same procedure as described under 3 will be followed.
5. Recovery of the animals is monitored ~~by the animal caretakers~~ and the veterinarian will intervene if animals do not recover fast enough.
6. Animals will receive tube feeding. This is applied during sedation.
7. Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached the animal will be humanely euthanized and a full necropsy will be performed to establish the cause of the disease and viral distribution over the respiratory organs.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals are monitored twice daily and a weighed clinical scoring list is used to record the clinical symptoms. When a certain pre-determined clinical score is reached the animal will be humanely euthanized. Individual scores are added and decision is based on the total daily score. Symptoms that lead to an immediate endpoint are respiratory problems (convulsive breathing, flank contraction) or lack of breathing, lethargy as defined by minimal response to human approach, and excessive loss of body weight of more than 15% in two days or 20% from the start of the infection.

Indicate the likely incidence.

100%

K. Classification of severity of procedures

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

Discomfort is caused by the implantation of the telemetric temperature **transponder sensor**. By using this device, the animals can be continuously monitored for body temperature or changes in activity. In combination with frequent observations by animal caretakers, this will facilitate the appropriate intervention by veterinarians at the earliest time-point, and will preclude progression to serious disease caused by coronavirus infection. Therefore, the cumulative discomfort will be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Animals will be euthanized in case they show signs of disease symptoms in order to avoid severe discomfort. To investigate the presence of virus in tissues and organs, and for the investigation of possible tissue damage caused by CoV or by the vaccines, it is necessary to euthanize the animals at the end of the study.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes