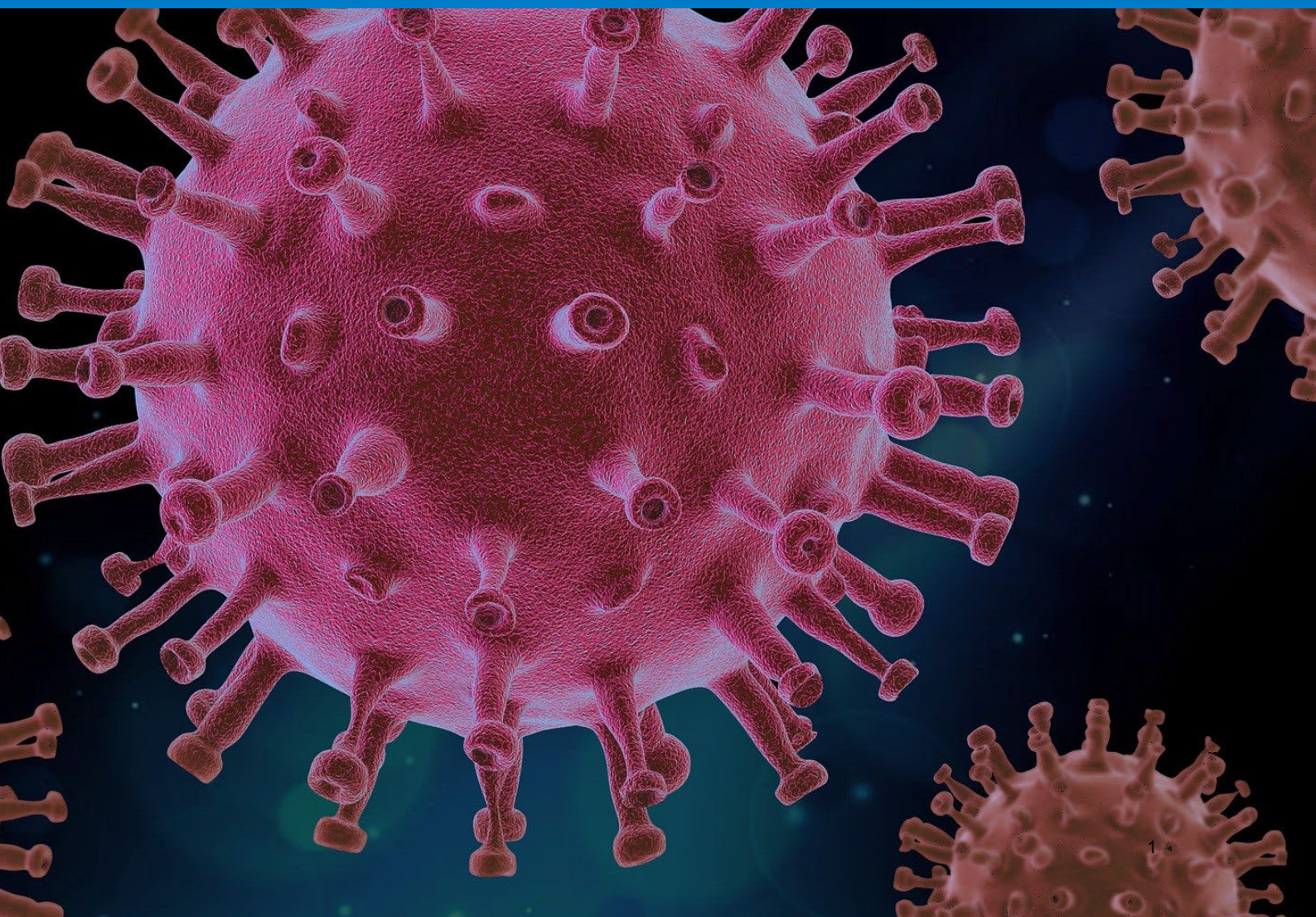




Nationaal Comité  
advies dierproevenbeleid

# COVID-19: het gebruik van proefdieren en proefdiervrije methoden in de dynamiek van een pandemie

Advies van het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid



## Het NCad en haar werkwijze

Het Nationaal Comité advies dierproevenbeleid (NCad) is een onafhankelijk adviesorgaan dat het welzijn van proefdieren beschermt. Dit doet het comité door gevraagd en ongevraagd advies uit te brengen, innovatie en kennisontwikkeling te stimuleren en stakeholders aan elkaar te verbinden. Hiermee realiseert het NCad zichtbare verbeteringen voor het Vervangen, Verminderen en Verfijnen (3V's) van dierproeven en proefdiervrije innovatie.

*Voor proefdieren van nu en innovaties van morgen*



### Leden NCad

Van links naar rechts: Pieter Roelfsema, Reineke Hameleers, Henk Smid (voorzitter), Jan-Bas Prins, Coenraad Hendriksen, Monique Janssens, Wim de Leeuw.

### Contactgegevens

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid  
Postbus 93118 | 2595 AL Den Haag  
Mail: [ncad@rvo.nl](mailto:ncad@rvo.nl) | website: [ncadierproevenbeleid.nl](http://ncadierproevenbeleid.nl)

# Inhoud

Samenvatting	4
Inleiding	8
1 Welke diermodellen zijn wereldwijd gebruikt in het kader van COVID-19-onderzoek? Welke invloed heeft het onderzoek naar COVID-19 wereldwijd gehad op het gebruik van proefdieren?	11
2 Welke alternatieve (dierproefvrije) methoden zijn er wereldwijd in het kader van COVID-19-onderzoek toegepast? Met welk effect?	16
2.1 Fysisch-chemische en immuno-chemische modellen	16
2.2 In vitro modellen	17
2.3 Humane studies	17
2.4 In silico modellen & strategieën	18
2.5 Multidisciplinaire benaderingen	19
2.6 Financiering van onderzoek	19
2.6.1 Overzicht Financiering COVID-19 onderzoek vanuit de Europese Commissie (H-2020)	19
2.6.2 Overzicht Financiering Programma Meer Kennis met Minder Dieren (MKMD) van ZonMw.	20
2.7 Effect alternatieve (dierproefvrije) methoden	20
3 Welke wijzigingen zijn opgetreden in de (internationale navolging van) de voorgeschreven procedures voor vaccin- en/of medicijn-ontwikkeling?	21
4 Welke lessen of adviezen, in de context van de COVID-19 pandemie, kunnen worden getrokken voor de toekomst van de transitie proefdiervrije innovatie?	28
4.1 Macro-niveau	29
4.1.1 One-Health	29
4.1.2 Vaccin R&D	30
4.2 Meso-niveau	31
4.3 Micro-niveau	32
4.3.1 Vaccin Platform	32
4.3.2 Optimalisatie van innovatieve in vitro methoden en aandacht voor overige proefdiervrije methoden	33
4.3.3 Verkorting van de onderzoeksduur	34
4.3.4 Delen van onderzoekgegevens	35
Dankwoord	36
Bijlage 1	37
Bijlage 2	81



## Samenvatting

Op 27 oktober 2020 heeft de minister van LNV het NCad verzocht haar te adviseren over de effecten van COVID-19 op de transitie naar proefdier vrije innovatie en werden de volgende vragen voorgelegd:

1. Welke diermodellen zijn wereldwijd gebruikt in het kader van COVID-19-onderzoek? Welke invloed heeft het onderzoek naar COVID-19 wereldwijd gehad op het gebruik van proefdieren?
2. Welke alternatieve (dierproefvrije) methoden zijn er wereldwijd in het kader van COVID-19-onderzoek toegepast? Met welk effect?
3. Welke wijzigingen zijn opgetreden in de (internationale navolging van) de voorgeschreven procedures voor vaccin- en/of medicijn-ontwikkeling?
4. Naar aanleiding van a, b en c: welke lessen of adviezen kunnen worden getrokken voor de toekomst van de transitie proefdier vrije innovatie?

In maart 2021 heeft het NCad de tussenrapportage 'Leren van Covid-19' uitgebracht waarin de eerste bevindingen zijn gedeeld. Daarin is via een narratieve invalshoek vooral het COVID-19 onderzoeklandschap beschreven. Centraal in deze tussenrapportage stonden de aspecten van het onderzoek waarin het proefdier en/of de proefdier vrije methode een rol spelen.

In de eindrapportage 'COVID-19: het gebruik van proefdieren en proefdier vrije methoden in de dynamiek van een pandemie' wordt expliciet ingegaan op de 4 vragen zoals die door de minister van LNV aan het NCad zijn gesteld.

[Ad vraag 1: Welke diermodellen zijn wereldwijd gebruikt in het kader van COVID-19-onderzoek? Welke invloed heeft het onderzoek naar COVID-19 wereldwijd gehad op het gebruik van proefdieren?](#)

Vanwege de bestaande systematiek in de jaarlijkse rapportage proefdiergebruik en de gehanteerde onderzoekscategorieën, zowel nationaal als Europees, is het niet mogelijk in detail inzicht te krijgen in de omvang van dit gebruik voor het COVID-19 onderzoek.

Uit de gehouden interviews komt naar voren dat voor het COVID-19 onderzoek diermodellen zijn gebruikt die ook zijn gebruikt in het onderzoek naar SARS en MERS, twee ziekten veroorzaakt door verwante coronavirussen. In zijn algemeenheid wordt de muis gebruikt voor het basaal wetenschappelijk onderzoek (zoals keuze antigeen) en het voorbereidende onderzoek zoals veiligheid en immunogeniteit (het opwekken van antistoffen), de hamster vooral voor onderzoek op effectiviteit van vaccins en geneesmiddelen, de fret voor onderzoek naar virus transmissie en de NHP voor de fine-tuning van bij kleine knaagdieren verkregen informatie en voor de transitie van de preklinische fase naar de klinische fase ('First-in-human'). Daarnaast valt op dat Fase 1 studies soms al gestart werden voordat alle gegevens uit het preklinisch onderzoek beschikbaar waren (zie Tabel 6). Gezien de mondiale omvang van het onderzoek, in het bijzonder naar vaccins en geneesmiddelen, mag worden aangenomen dat het gebruik van muizen, hamsters, fretten en NHPs zal zijn toegenomen, waarbij de kanttekening dat onderzoek met NHPs vooral in de VS en in China heeft plaatsgevonden.

[Ad vraag 2: Welke alternatieve \(dierproefvrije\) methoden zijn er wereldwijd in het kader van COVID-19-onderzoek toegepast? Met welk effect?](#)

Bij het uitbreken van de pandemie is vooral gekozen voor de (dier)modellen waarmee al eerder ervaring was opgedaan. Naast de urgentie van het moment zal dit ook te maken hebben gehad met het vasthouden aan beproefde systemen. Wel zijn nieuwe projecten opgestart gericht op de ontwikkeling, optimalisatie en toepassing van proefdier vrije modellen.

Veel van deze modellen zullen pas over 4 tot 5 jaar beschikbaar komen, dat wil zeggen na afloop van de COVID-19 pandemie.

Dat laat onverlet dat in het COVID-19 onderzoek, naast diermodellen, ook gebruik is gemaakt van een breed scala aan bestaande proefdiervrije methoden.

Voor vaccinontwikkeling en vaccinkarakterisatie is veel gebruik gemaakt van fysisch- en immuno-chemische methoden; voor viruskarakterisatie, pathofysiologie en geneesmiddelen ontwikkeling zijn *in vitro* modellen gebruikt, zowel eenvoudige celkweek methoden als geavanceerde organoidculturen en organs-on-a-chip; pathofysiologie is vooral onderzocht in COVID-19 patiënten en vooral voor geneesmiddelenonderzoek zijn menselijke vrijwilligers ingezet. In silico modellen zijn gebruikt voor viruskarakterisatie, selectie van potentiële geneesmiddelen, epidemiologie en analyses van patiëntgegevens.

In termen van proefdiergebruik is binnen het COVID-19 onderzoek de ontwikkeling van geneesmiddelen en vooral van vaccins de belangrijkste reden voor proefdiergebruik geweest. De combinatie van vaccinontwikkeling op basis van de nieuwste technologieën (vector-; RNA/DNA- en peptide vaccins), het gebruik van fysisch- en immuno-chemische technieken en de toepassing van *in vitro* methoden heeft de potentie om tot een transitie te leiden in het gebruik van proefdieren.

Een beperkende factor in deze transitie is het ontbreken van cruciale *in vitro* immuunparameters in organoidculturen en organs-on-a-chip. Hierdoor is het nog niet mogelijk om zonder gebruik van een diermodel de effectiviteit van een geneesmiddel of vaccin te meten. Het genereren van een complex *in vitro* model inclusief relevante aspecten van het immuunsysteem vergt een aanzienlijke inzet van tijd en middelen.

#### Ad vraag 3: Welke wijzigingen zijn opgetreden in de (internationale navolging van) de voorgeschreven procedures voor vaccin- en/of medicijn-ontwikkeling?

Begin april 2022 waren 349 COVID-19 vaccins in ontwikkeling; 196 in de preklinische fase van het onderzoek en 153 in de klinische fase van het onderzoek. De urgentie van de pandemie is een belangrijke blokkade geweest voor het gebruik van nieuwe en minder vertrouwde modellen. Die urgentie heeft, tenminste voor een deel van de vaccins, ook geleid tot een significante reductie in tijd van vaccinontwikkeling tot registratie. Dit door maatregelen als overlap van klinisch onderzoek en preklinisch onderzoek, beoordeling op basis van een rolling review en conditional authorisation. Deze aanpassingen hebben zowel in de ontwikkelingsfase als in de beoordelingsfase geleid tot een hogere investering in capaciteit en derhalve in kosten.

De tijdswinst die geboekt is, is niet ten koste gegaan van de aspecten veiligheid en effectiviteit; noch in de ontwikkeling van het vaccin of geneesmiddel bij de producent, noch bij de registratie autoriteiten. Dat wil zeggen, er is niet ingeleverd op de kwaliteit van de productbeoordeling, dit met uitzondering van de studies die nodig zijn voor lange termijneffecten, zoals duur van opgebouwde bescherming na vaccinatie, effecten op de zwangerschap. Informatie over deze aspecten is later in de tijd aangeboden en bij gebleken afwezigheid van effecten is de conditional authorisation omgezet in een authorisation.

#### Ad vraag 4: Welke lessen of adviezen, in de context van de COVID-19 pandemie, kunnen worden getrokken voor de toekomst van de transitie proefdiervrije innovatie?

##### Macro-niveau

One Health is de stroming in de medisch-biologisch gemeenschap die uitgaat van samenhang en verbinding tussen mens, dier en natuur. Veranderingen in het ene domein zullen consequenties hebben voor een ander domein. Onderzoek en aanpak zullen derhalve een multidisciplinair karakter moeten hebben. COVID-19 is een zoonose, dat wil zeggen een ziekte die van dier op mens kan worden overgebracht. Nederland is één van de voorlopers geweest van de One-Health gedachte.

*De minister wordt gevraagd het belang van One Health en daarmee van duurzame en structurele oplossingen om pandemieën te voorkomen uit te blijven dragen.*

*Tevens wordt de minister gevraagd zich in multinationale samenwerkingsverbanden te blijven inzetten voor pandemische paraatheid.*

In het kader van de pandemische paraatheid heeft het kabinet in het coalitieakkoord een investeringsbedrag van 180 miljoen Euro opgenomen voor 2022, oplopend tot 300 miljoen Euro in 2026.

*De minister wordt gevraagd zich te beijveren een deel van deze investering te bestemmen voor de ontwikkeling van innovatieve proefdiervrije instrumenten voor monitoring, preventie en profylaxe.*

De urgentie van de COVID-19 pandemie heeft grote druk gelegd op de ontwikkeling van een vaccin of geneesmiddel, vooral bij de industrie. Daarbij werd vaak gebruik gemaakt van platform technologieën die ontwikkeld zijn in een academische setting. Technologieën zijn vervolgens door de industrie ingezet voor de ontwikkeling van virus specifieke vaccins en de optimalisatie en productie-opscaling daarvan. De druk op de ontwikkeling van een veilig en effectief vaccin verklaart echter niet de hoeveelheid vaccins waaraan gewerkt wordt. Het is aannemelijk dat naast het aspect volksgezondheid daarbij ook economische en nationale belangen een rol gespeeld hebben.

Vaccinontwikkeling kan nog niet zonder proefdiergebruik is de mening van vaccindeskundigen. De veelheid aan vaccins die in ontwikkeling zijn, hebben - zonder dit te kunnen kwantificeren - geleid tot omvangrijk diergebruik. Mondiaal heeft de WHO een coördinerende rol in het COVID-19 onderzoek op zich genomen, onder andere door middel van de BluePrint groep voor het dierexperimenteel onderzoek, maar ook in de ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen. Deze rol wordt vormgegeven in een samenwerking met andere mondiaal opererende organisatie zoals de Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI). CEPI wordt door een aantal landen ondersteund, waaronder Nederland. Een andere mondiale organisatie die actief is op het gebied van vaccinontwikkeling is Gavi, een samenwerking op het gebied van vaccins tussen de WHO, UNICEF, de Wereld Bank, Bill & Melinda Gates Foundation, private vaccinontwikkelaars en donorlanden. Gavi richt zich vooral op Derde Wereldlanden. In een ideale situatie zouden deze mondiale organisaties, een 'selectie aan de poort' moeten kunnen maken van vaccinontwikkeling, dit op basis van behoefte, ontwikkel-concept en veronderstelde meerwaarde ten opzichte van andere producten. Onderkend wordt dat dit inbreuk doet op het vrijemarktdenken en dat dit vrijemarktdenken innovatie sturend kan zijn.

*In het kader van restrictief proefdierbeleid wordt de minister gevraagd zich via de nationale contacten met organisaties als WHO, CEPI en Gavi in te zetten voor een afstemming en coördinatie van vaccinontwikkeling.*

*De minister wordt tevens verzocht na te laten gaan of een benadering waarbij voor een aantal virusfamilies prototype vaccins worden ontwikkeld ook voordelen biedt in termen proefdiergebruik, dit in de context van technische en praktische haalbaarheid.*

### Meso-niveau

In het interim-rapport werd aangegeven dat het toepassen van een niet sequentiële benadering van het preklinisch en klinisch onderzoek, het beoordelen van deeldossiers bij binnenkomst bij het COVID-19 onderzoek (de 'rolling review') en de conditional licencing geleid heeft tot een versnelling van het beoordelingstraject. Uit aanvullende interviews is gebleken dat deze benadering ook beperkingen kent en nuancering behoeft. De argumenten die in dit verband worden genoemd staan beschreven in Tabel 6. Dit alles maakt dat de versnelling van het beoordelingsproces consequenties heeft voor budgetten. Introductie van een versnelling wordt daarmee een politieke keuze; namelijk de bereidheid om voor aanvullende financiering te zorgen.

Voor wat het proefdiergebruik betreft geldt dat een sequentiële benadering als zodanig niet zal leiden tot een vermindering van dit gebruik. Het preklinisch onderzoek zal noodzakelijk blijven, maar wordt in de tijd herverdeeld. Een gouden en wettelijk vastgelegde standaard binnen de ontwikkeling en productie van vaccins en geneesmiddelen is dat een nieuw product veilig en effectief dient te zijn. Nergens is vastgelegd dat dit op basis van dierexperimenteel onderzoek moet. In de context van de beperkingen die een aantal van de gebruikte diermodellen laten zien is

daarom meer te verwachten van een studie naar de relevantie van bestaande dierstudies en naar het gebruik van tijdbesparende proefdiervrije methoden.

*De minister wordt gevraagd, om in overleg met het ministerie van VWS gelden beschikbaar te maken voor het uitvoeren van een retrospectieve analyse over de waarde en beperkingen van standaard dierstudies in de research fase en het preklinisch onderzoek van vaccins en geneesmiddelen.*

Belangrijke factoren voor de toepassing van proefdiervrije methoden in het wettelijk voorgeschreven onderzoek is het voeren van een beleid dat gericht is op de ontwikkeling van deze methoden, de acceptatie hiervan door nationale en internationale controle autoriteiten en de mondiale harmonisatie van testrichtlijnen.

*In dit verband wordt de minister gevraagd zich, via bestaande kanalen, in te zetten voor een sturend beleid, onder andere bij organisaties als de World Health Organization (WHO), de European Medicines Agency (EMA) en de Europese Pharmacopee (Ph.Eur.).*

### Micro-niveau

De klassieke vaccins zijn gebaseerd op de inactivatie of attenuatie van het micro-organisme of op detoxificatie van het toxine dat door het micro-organisme wordt geproduceerd.

De nieuwste generatie vaccins, zoals de mRNA vaccins en vector vaccins bij COVID-19) maken gebruik van moleculairbiologische technieken welke eind vorige eeuw zijn ontwikkeld.

Voor de nieuwe generatie vaccins geldt dat proefdieren nodig zijn in de ontwikkelingsfase maar niet of nauwelijks in de routine batchcontrole. Dit heeft alles te maken met het feit dat deze typen vaccins uitvoerig gekarakteriseerd zijn in de ontwikkelingsfase en de productie vergaand gestandaardiseerd en gemonitord wordt door middel van een set aan analytische methoden. In het kader van een reductie in proefdiergebruik is het dan ook aan te bevelen om in geval van vaccinontwikkeling in te zetten op niet klassieke methoden van ontwikkeling.

*Om het proefdiergebruik verder te kunnen reduceren wordt de minister geadviseerd zoveel mogelijk aan te sluiten bij vaccinontwikkeling op internationaal niveau, gericht op de ontwikkeling en inzet van niet klassieke methoden.*

Orgaan specifieke organoids worden gebruikt voor het onderzoek naar de pathogeniteit van het virus en microfluidic-culturen van longweefsel voor het onderzoek naar de kinetiek en dynamiek van het virus.

Proefdiervrije methoden, zoals orgaan specifieke organoids kennen veel voordelen waarvan de vermindering van het proefdiergebruik er een is, maar ook een reductie van kosten en onderzoekstijd. Door niet alle onderzoekers worden deze voordelen opgepakt en zal aandacht voor deze modellen noodzakelijk blijven. Proefdiervrije methoden worden ook (nog) gekenmerkt door beperkingen. Een van de belangrijkste is de beperkte integratie van immuunparameters in de *in vitro* modellen. Eerste stappen op dit terrein zijn gezet maar verkeren nog in een embryonaal stadium.

In het alternatievenbeleid van de overheid ligt de aandacht vooral bij de innovatieve celweek modellen. Dit vertaalt zich in de financiering van proefdiervrije onderzoek dat vaak eenzijdig gericht is op ontwikkeling van deze celweek modellen. Geconstateerd moet worden dat er, zeker in het veld van infectieziekten minstens even veel potentie ligt bij andere proefdiervrije technieken. Meer balans en evenredigheid in de verdeling van beleidsaandacht en beschikbare middelen zou recht doen aan de belang van deze technieken voor het proefdiervrije onderzoek.

*De minister wordt gevraagd in te zetten op onderzoek naar het integreren van complexe immunologische parameters in de nieuwe generatie in vitro methoden. Daarnaast wordt de minister gevraagd om de beleidsaandacht en middelenverdeling voor proefdiervrij onderzoek naast de innovatieve celweeksystemen ook te richten op andere technieken en methoden.*

# Inleiding

Op 27 oktober 2020 heeft de minister van LNV het NCad verzocht haar te adviseren over de effecten van COVID-19 op de transitie naar proefdiervrije innovatie en werden ons de volgende vragen voorgelegd:

1. Welke diersmodellen zijn wereldwijd gebruikt in het kader van COVID-19-onderzoek? Welke invloed heeft het onderzoek naar COVID-19 wereldwijd gehad op het gebruik van proefdieren?
2. Welke alternatieve (dierproefvrije) methoden zijn er wereldwijd in het kader van COVID-19-onderzoek toegepast? Met welk effect?
3. Welke wijzigingen zijn opgetreden in de (internationale navolging van) de voorgeschreven procedures voor vaccin- en/of medicijn-ontwikkeling?
4. Naar aanleiding van a, b en c: welke lessen of adviezen kunnen worden getrokken voor de toekomst van de transitie proefdiervrije innovatie?

Het beoogde doel van de minister is om met de beantwoording van deze adviesvraag overzicht en inzicht te bieden in het gebruik van proefdieren en van proefdiervrije methoden in het wereldwijde onderzoek naar vaccins en behandelmethode voor COVID-19. Op basis daarvan kunnen (mogelijke) implicaties voor de transitie naar proefdiervrije innovaties (TPI) in kaart worden gebracht en lessen worden geleerd voor de toekomst van TPI.

In het navolgende gaat het NCad in op de gestelde vragen met daarbij de kanttekening dat voor enkele vragen gedetailleerde informatie en gegevens (nog) niet voorhanden zijn. Ook is de pandemie nog geen afgesloten periode en kunnen toekomstige ontwikkelingen leiden tot een nuancering van de conclusies en aanbevelingen.

In grote lijnen heeft het COVID-19 onderzoekstraject de stappen gevolgd die voor elk ander onbekend pathogeen micro-organisme gelden: identificatie en karakterisatie van het micro-organisme, onder andere op de wijze van verspreiding; selectie van (*in vivo* en *in vitro*) onderzoeksmodellen; onderzoek van pathogeniteit van het virus, inclusief de lange termijn effecten; ontwikkeling en beoordeling van geneesmiddelen (therapeutica) en vaccins (proylactica) en het registratieproces van deze middelen. Het verschil van dit virus met voorgaande pathogenen is dat de snelheid waarmee het virus zich wereldwijd verspreid heeft en de ernst van de infectie een ongekennde dynamiek heeft gegeven aan het onderzoeksveld. Een dynamiek die verder versterkt is door het ontstaan van virulente en infectieuze varianten van het oorspronkelijke (Wuhan) virus, waarvan de belangrijkste<sup>1</sup> zijn de Alpha (VK), de Beta (Zuid Afrika), de Gamma (Brazilië), de Delta (India) en, hoewel minder virulent, de Omikron variant.

Inmiddels zijn er officieel 507.501.771 miljoen besmettingen geregistreerd en zijn er 6.220.390 miljoen mensen aan het COVID-19 overleden (gegevens WHO van 14 april 2022<sup>2</sup>). Daarnaast worden in Nederland de uitgaven van de rijksoverheid aan coronamaatregelen 2020-2022 geschat op een bedrag van 89,8 miljard Euro<sup>3</sup> (voorjaarseditie 2022) en mondiaal op 12,5 x 10<sup>12</sup> (12,5 duizend miljard) Dollar<sup>4</sup> (22 januari 2022).

---

<sup>1</sup> [www.hopkinsmedicine.org](http://www.hopkinsmedicine.org)

<sup>2</sup> [Covid19.who.int](https://covid19.who.int)

<sup>3</sup> <https://www.rekenkamer.nl/onderwerpen/corona/nieuws/2022/03/17/coronarekening---voorjaarseditie-2022>

<sup>4</sup> [Reuters.com](https://reuters.com)



In maart 2021 heeft het NCad de tussenrapportage 'Leren van Covid-19'<sup>5</sup> uitgebracht waarin de eerste bevindingen zijn gedeeld.

De belangrijkste conclusies uit de tussenrapportage waren dat:

- voor het onderzoek naar het SARS-CoV-2 virus, zowel voor de karakterisatie en geneesmiddelen/vaccinontwikkeling vooral teruggegrepen is op de diersoorten die in 2002-2003, respectievelijk 2012 gebruikt zijn voor twee andere virussen uit de familie van de Coronavirussen: het SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) virus en het MERS (Middle East Respiratory Syndrome) virus, voornamelijk muis, hamster, fret en niet humane primate;
- het gebruik van proefdiervrije methoden in eerste instantie beperkt was, deels terug te voeren op de urgentie van de pandemie waardoor de voorkeur werd gegeven aan de bestaande en bekende (dier)modellen boven relatief onbekende proefdiervrije methoden, maar ook door beperkingen die *in vitro*-modellen (nog) kennen, in het bijzonder de integratie van aspecten van het immuunsysteem;
- ieder model zijn beperkingen kent, maar ook mogelijkheden biedt voor wat betreft de vertaling naar de mens. Dit geldt zowel voor diersmodellen als voor modellen waarbij geen proefdieren worden gebruikt. In zijn algemeenheid werden diersmodellen veel gebruikt in het vaccinonderzoek en *in vitro* modellen als organoidculturen in het onderzoek naar pathogeniteit;
- enige mate van coördinatie in het COVID-19 onderzoek werd en wordt verricht via de WHO Blue Print Group<sup>6</sup> waar de resultaten van met name proefdieronderzoek in een vroeg stadium werden gedeeld en bediscussieerd en waar nieuwe onderzoeksvragen werden uitgezet;
- de versnelling in het registratieproces van vaccins en geneesmiddelen is bereikt door preklinische en klinische studies niet sequentieel - op basis van resultaten uit voorgaand onderzoek - uit te voeren maar studies deels te laten overlappen (de zogenaamde 'rolling review'). Daarnaast werd een absolute prioritering aan het registratieproces van COVID-19 medicijnen en vaccins gegeven, zowel op het niveau van de CCD en CCMO en de beoordelings- en registratieautoriteiten (EMA/CBG). Daarnaast waren er andere factoren die hebben bijgedragen aan de snelle registratie van nieuwe vaccins (zie tabel 6).

---

<sup>5</sup>Tussenrapportage 'Leren van Covid-19' | Nieuwsbericht | Nationaal Comité advies dierproevenbeleid ([ncadierproevenbeleid.nl](http://ncadierproevenbeleid.nl)), [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

<sup>6</sup> <https://www.who.int/teams/blueprint/covid-19>

De tussenrapportage 'Leren van COVID-19' heeft via een narratieve invalshoek vooral het COVID-19 onderzoeklandschap beschreven. Centraal in deze tussenrapportage stonden de aspecten van het onderzoek waarin het proefdier en/of de proefdiervrije methode een rol spelen.

In de eindrapportage 'COVID-19: het gebruik van proefdieren en proefdiervrije methoden in de dynamiek van een pandemie' wordt expliciet ingegaan op de 4 vragen zoals die door de minister van LNV aan het NCad zijn gesteld (zie Inleiding). Een nadere uitwerking van de beantwoording is gebeurd door literatuurstudie en aanvullende interviews met betrokken experts (zie overzicht onder 'Werkwijze'). Voor de verdieping van de vraag over alternatieve (dierproefvrije) methoden en een vooruitblik naar de toekomst zijn twee aanvullende literatuurstudies uitgevoerd: één bij het Amsterdam UMC (*in vitro* methoden) en een tweede bij de Universiteit Leiden (analytische methoden). Daarnaast zal in deze eindrapportage in meer detail worden ingegaan op de vaccins en geneesmiddelen die in het kader van COVID-19 in ontwikkeling zijn, inclusief de mogelijkheden en beperkingen van het versnellen van het registratieproces. Aan de hand van een aantal lessen die uit de Coronapandemie te trekken is, zullen tenslotte aanbevelingen worden gedaan die nu of op termijn kunnen leiden tot een reductie van proefdiergebruik en het optimaler inzetten van proefdiervrije methoden.

### Werkwijze

Voor de eindrapportage heeft het NCad online interviews gehouden met deskundigen die direct of indirect betrokken zijn bij één of meerdere aspecten van de pandemie. Om een beeld te krijgen van de dynamiek in het onderzoeksveld werden sommige deskundigen die in het kader van de tussenrapportage waren geïnterviewd, nogmaals geraadpleegd. Deskundigen waren afkomstig uit de academische wereld met kennis op het gebied van de virologie, immunologie, epidemiologie, diermodellen en proefdiervrije modellen, uit het regulatoire veld, de overheid (nationaal en internationaal), uit de dierenbescherming, de vaccinontwikkeling en contract research organisaties.

De geïnterviewde deskundigen waren, in alfabetische volgorde, werkzaam of betrokken bij:

- Blue Print Group van de WHO
- CBG (College ter Beoordeling van Geneesmiddelen), preklinisch gebied
- CBG Kwaliteit Geneesmiddelen
- CCMO (Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek)
- CHMP (Committee for Medicinal Products for Human use)
- CRO (Contract research organizations)
- Dierenbelangenorganisaties (Eurogroup, RSPCA)
- Europese Commissie: DG research and Innovation
- Europese Commissie: Joint research Centre Ispra
- FDA (Food and Drug Administration, VS)
- Onderzoeksinstituut Primaten
- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)
- TNO
- Universitair medisch onderzoekscentrum (Erasmus MC; afdeling Virologie)
- Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde
- Vaccinontwikkeling, humaan en veterinair
- Veterinaire Hochschule Hannover

Op basis van de verkregen informatie door interviews, twee literatuurstudies en eigen literatuuronderzoek wordt hier verder ingegaan op de vragen van de minister.

## 1. Welke diermodellen zijn wereldwijd gebruikt in het kader van COVID-19-onderzoek? Welke invloed heeft het onderzoek naar COVID-19 wereldwijd gehad op het gebruik van proefdieren?

In de periode van de pandemie van januari 2020 tot april 2022 zijn in Nederland door de CCD vergund 18 projecten vergund waarin onderzoek naar COVID-19 centraal staat of onderdeel van uitmaakt. In totaal zijn 120.347 dieren voor deze projecten aangevraagd. In onderstaande tabel wordt een overzicht gegeven van genoemde diersoorten en de aangevraagde aantallen per diersoort. Vergunde projecten hadden vooral betrekking op translationeel onderzoek of een combinatie van fundamenteel en translationeel onderzoek. Benadrukt moet worden dat het in de vergunde projecten om maximale aantallen gaat en dat projecten veelal een looptijd hebben van 5 jaar. De praktijk leert dat vaak niet alle vergunde dieren of diersoorten worden gebruikt en dit zal waarschijnlijk ook voor het COVID-19 onderzoek het geval zijn. Door de urgentie van het onderzoek zijn ook diersoorten aangevraagd die inmiddels minder geschikt zijn gebleken voor het COVID-19 onderzoek. Voorbeelden hiervan zijn het konijn en de rat.

Omdat in de jaarlijkse rapportages over het proefdiergebruik (Zo doende) COVID-19 onderzoek geen unieke doelcategorie is, maar gegevens over dit onderzoek verdeeld zijn over verschillende doelen van onderzoek, zal het niet mogelijk zijn betrouwbare informatie te verzamelen over het gebruik van dieren voor COVID-19 onderzoek per jaar. Informatie hierover zal pas zichtbaar worden in de eindrapportage van uitgevoerde projecten en dan alleen voor die projecten die een wettelijke verplichting hebben van een retrospectieve projectbeoordeling. Dit geldt alleen voor projecten waarin ernstig ongerief is opgetreden bij (een deel van) de dieren en voor onderzoek met niet humane primaten.

De in Nederland vergunde COVID-19 projecten hebben vooral betrekking op de ontwikkeling, veiligheid en werkzaamheid van antivirale interventie strategieën tegen het SARS-CoV-2 virus (vaccin en geneesmiddelen ontwikkeling) bij mens en dier. In mindere mate zijn of worden dieren gebruikt voor de karakterisatie van het SARS-CoV-2 virus en varianten daarvan.

Gebruik van dieren voor onderzoek op pathogeniteit van het virus, inclusief Long (chronische) Covid heeft maar zeer beperkt plaatsgevonden en lijkt vooral uitgevoerd in patiëntenpopulaties (zie ook Paragraaf CCMO).

**Tabel 1. Aangevraagde aantallen dieren in CCD vergunde projecten voor COVID-19 onderzoek. Periode: januari 2020 - april 2022**

Diersoort	Aantallen
Muis	77610
Rat	5.000
Hamster	24.019
Konijn	2.469
Fret	2.717
Kat	1.870*
Hond	301*
Nerts	248
Varken	248
Niet Humane Primate	402
Knaagdieren	1560

\* een substantieel deel van deze dieren zijn gebruikt in een project gericht op de serologische screening in huisdieren op antistoffen tegen SARS-CoV-2

Gegevens over proefdiergebruik zijn ook beschikbaar voor Duitsland<sup>7</sup>. Deze gegevens komen niet uit de jaarrapportage van de overheid maar zijn afkomstig uit een wetenschappelijke publicatie. In de periode van 01-02-2020 tot 01-08-2021 zijn 4893 projecten vergund met dierexperimenteel onderzoek met een totaal van 7.7 miljoen aangevraagde dieren. Van deze dieren zijn er 61.389 bestemd voor onderzoek aan SARS-CoV-2: 89.5% muis, 7.3% hamsters en 0.06% niet humane primaten.

Sinds 1 januari 2021 dienen in de EU<sup>8</sup> de Niet Technische Samenvattingen (NTS) van alle Europese projectaanvragen met laboratoriumdieren in de publiektoegankelijke database ALURES (Animal Use Reporting -EU System) van de Europese Commissie te worden geplaatst. In deze periode van de pandemie leverde dit bij gebruik van de zoekterm 'Covid-19' een totaal aan 51 hits op en bij gebruik van de zoekterm 'SARS-CoV-2' 65 hits.

Gegevens over dierproeven in Nederland in 2020<sup>9</sup> laten zien dat in dat jaar 448.798 dierproeven zijn uitgevoerd. Dat zijn er 142 meer dan in 2019. Uitgaande van Tabel 1 laat het jaarverslag 2020 zien dat in vergelijking met 2019 (het jaar voorafgaand aan de COVID-19 pandemie) het aantal proeven met muizen, fretten en varkens is afgenomen, terwijl het aantal proeven met ratten (7%), hamsters (317%), konijnen (15%), honden (46%), katten (253%) en Niet humane primaten (36%) is toegenomen. Niet alles is te relateren aan het COVID-19 onderzoek, maar voor hamsters, katten, honden en niet humane primaten is dit wel het geval. De toename in gebruik van honden en katten is deels terug te voeren op een grootschalig bloedonderzoek in huisdieren op antistoffen tegen het SARS-CoV-2 virus. Voor wat betreft een vergelijking met het proefdiergebruik in de jaren 2016 – 2020 kan worden opgemerkt dat voor de meeste genoemde diersoorten het proefdiergebruik in 2020 ligt binnen de range van gebruik in de pre-corona periode, dit met uitzondering van het gebruik van hamsters en katten (zie voor katten bovengenoemde opmerking) en in mindere mate voor NHPs en konijnen. Voor fretten geldt dat de afname waarschijnlijk te maken heeft met het feit dat in de beginfase van de pandemie het onderzoek naar influenza, waarvoor de fret het relevante diermodel is, is afgeschaald. De toename als gevolg van het COVID-19 onderzoek is ongedaan gemaakt door de afname in het gebruik van fretten voor influenza onderzoek.

**Tabel 2. Overzicht proefdiergebruik voor diersoorten genoemd in relatie tot COVID-19 onderzoek van 2016-2020**

Diersoort	Jaar				
	2020	2019	2018	2017	2016
Muis	148.291	159.614	155.524	205.993	161.978
Rat	87.169	81.603	91.579	91.537	109.589
Cavia	8.537	9.108	11.443	5.816	3.148
Hamster	2.856	684	911	1035	1443
Konijn	15.373	13.298	13.788	9.764	8.579
Hond	803	550	1016	909	656
Kat	604	171	120	200	89
Fret	570	641	475	680	294
NHP (makaken)	187	155	160	276	104

Een aanvullende vraag is in hoeverre het uitbreken van de pandemie en de daarop volgende lockdown periode geleid heeft tot het afbreken van lopende proeven en/of het afschalen van fokkolonies en het effect hiervan op het proefdiergebruik/aantallen dieren gedood voorafgaand aan

<sup>7</sup>How many animals are used for SARS-CoV-2 research? Schwedhelm P. et al. EMBO Reports 2021: <https://doi.org/10.15252>

<sup>8</sup> [Webgate.ec.europa.eu](http://Webgate.ec.europa.eu)

<sup>9</sup> Zo doende 2020-2016; Jaaroverzicht dierproeven en proefdieren van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteiten



de proef. Informatie hierover is verzameld door de NVWA maar is nog niet beschikbaar voor het jaar 2021.

Door de 'not-for-profit' organisatie Understanding Animal Research uit het Verenigd Koninkrijk wordt het afschalen van onderzoek wel bevestigd<sup>10</sup> "*Despite all this research to develop vaccines and treatments for Covid-19, the majority of UK research facilities carried out significantly less research than usual, due to the various national lockdowns*", evenals door informanten in Nederland.

## Diermodellen

Gebruikte diermodellen hebben hun oorsprong in het onderzoek naar corona-virussen, in het bijzonder SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome, 2002/03) en MERS (Middle East Respiratory Syndrome, 2012). Evenals voor andere modellen geldt dat ook de diermodellen binnen het COVID-19 onderzoek mogelijkheden en beperkingen kennen (Tabel 3).

**Tabel 3. Diermodellen in het SARS-CoV-2 onderzoek: mogelijkheden, beperkingen en doel<sup>11, 12, 13</sup>**

	Mogelijkheden	Beperkingen	Gebruikt in
Muis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Veel reagentia aanwezig voor immunologisch onderzoek</li> <li>• Veel bekend over het immuunsysteem</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muis bezit niet ACE2, het enzym dat SARS-CoV-2 binding en opname in de cel mogelijk maakt. De ACE2 Tg muis heeft dit enzym wel.</li> <li>• Verschillen immuunsysteem muis en mens</li> <li>• Beperkte pathologie (interstitiële pneumonie)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fundamenteel onderzoek naar het virus</li> <li>• Onderzoek naar immunogeniteit vaccins</li> </ul>
Syrische hamster	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Homologie met humane ACE2 receptor</li> <li>• Gevoelig voor het SARS-CoV-2 virus</li> <li>• Overeenkomst klinische verschijnselen en pathologie mens</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infectie verloopt minder ernstig dan bij mens</li> <li>• Verschillen immuunsysteem hamster en mens</li> <li>• Beperkte beschikbaarheid specifieke reagentia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ontwikkeling vaccins en geneesmiddelen</li> </ul>
Fret	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gevoelig voor SARS-CoV-2 virus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ziekteverloop minder ernstig dan bij mens (koorts,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Onderzoek naar transmissie virus</li> </ul>

<sup>10</sup> Understandinganimalresearch.org.uk. Animal research numbers 2020. 15 July 2021.

<sup>11</sup> Ketelaars M.F.M. & Kersten G.F.A. (2021). In vitro vaccine characterisation & animal models in COVID-19 vaccine development. Annex 1 of this report.

<sup>12</sup> How many animals are used for SARS-CoV-2 research? Schwedhelm P. et al. EMBO Reports 2021: <https://doi.org/10.15252>

<sup>13</sup> Munoz-Fontela C et al. Animal models for Covid-19. Nature (2020) : <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2787-6>

		focale longpathologie) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus repliceert voornamelijk in bovenste luchtwegen</li> </ul>	
Rat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Standaard model in toxicologisch onderzoek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beperkte pathologie, vergelijkbaar met muis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vooral gebruikt in onderzoek op veiligheid vaccins</li> </ul>
Konijn	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Standaardmodel in pyrogeniteitsonderzoek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Konijn heeft ACE-2 receptor maar gevoeligheid voor SARS-CoV-2 is niet duidelijk</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gebruikt in pyrogeniteitsonderzoek van vaccins en in toxiciteitsonderzoek</li> </ul>
Niet humane primate (vooral Rhesus- en Java makaken)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immuunsysteem vergelijkbaar met mens</li> <li>• Mogelijkheden voor additionele en verfijnde immuunparameters</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethisk</li> <li>• Kosten en huisvesting</li> <li>• Beperkte ziekteverschijnselen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bestudering eigenschappen virus</li> <li>• Ontwikkeling vaccins (veiligheid en werkzaamheid)</li> <li>• Pathogeniteit</li> </ul>

### Niet-humane primaten

Onderzoek met niet-humane primaten (NHP), vooral *Cynomolgus* (Java) makaken en Rhesus makaken, wordt in vaccinkringen vaak als voorwaarde gezien voor de First in Human (FIH) trials met een nieuw vaccin of geneesmiddel. NHP studies op hun beurt zijn vaak de laatste stap na vooronderzoek in knaagdieren (muis, hamster) waarbij vooral de veiligheid en werkzaamheid van het te onderzoeken product centraal staan. Verder worden NHPs gebruikt in het onderzoek naar transmissie van het virus en naar de aan-/afwezigheid van steriele immuniteit, dat wil zeggen dat een gevaccineerd dier ondanks de vaccinatie nog steeds het virus kan uitscheiden. Voor alle vaccins die in het kader van de bijlage Analytische modellen nader zijn bekeken, geldt, dat deze in primaten zijn getest.

Het gebruik van NHP voor Covid-19 onderzoek is wereldwijd sterk toegenomen. In Nederland zijn gedurende de pandemie circa 200 makaken gebruikt voor Covid-gerelateerd onderzoek. Wereldwijd zijn er geen exacte cijfers bekend maar dat er een sterke toename bestaat is af te leiden uit de problemen die gemeld worden bij het verkrijgen van NHPs. In Europa wordt een restrictief beleid gevoerd inzake onderzoek met NHPs en mogen alleen F2 dieren worden gebruikt, dat wil zeggen: nakomelingen van ouderdieren die in gevangenschap zijn gefokt. Veel NHP-experimenten werden en worden buiten Europa uitgevoerd, onder andere in de VS. Amerikaanse primatencentra geven aan grote problemen te ondervinden voor wat betreft de beschikbaarheid<sup>14</sup>. Door de NIH (National Institutes of Health, USA) is in de corona periode een aanvullende subsidie van circa 35 miljoen dollar beschikbaar gesteld aan de 7 NHP overheidscentra in de VS. Informatie over het gebruik in de VS van NHPs voor COVID-19 onderzoek is niet beschikbaar. Ter informatie, in 2019, het jaar voorafgaand aan de pandemie, werden in de VS 68.257 NHPs gebruikt<sup>13</sup>. China, een van de grootste primaten leveranciers in de wereld, heeft de export teruggedroefd vanwege de grote behoefte voor eigen COVID-19 onderzoek.

Gebruik van NHPs wordt door een deel van de geïnterviewden als ethisch discutabel, maar wetenschappelijk essentieel gezien. Hoewel primaten na infectie met het SARS-CoV-2 virus zelden de ernst van het ziektebeeld laten zien dat bij de mens kan optreden, is de pathologie van de

<sup>14</sup> Nidhi Subbaraman. The US is boosting funding for research monkey in the wake of COVID. Nature 595, 633-634, 15 July 2021, <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01894>.

infectie vaak wel vergelijkbaar<sup>15</sup>. Ook zijn het immuunsysteem van primate en mens nauw aan elkaar verwant en is een monitoring van de ziekteontwikkeling mogelijk dankzij niet-invasieve technologieën als CT en PET-scan. Echter het NHP-onderzoek kent op verschillende terreinen beperkingen<sup>16</sup>:

- Ethische dilemma's. Ethische dilemma's zoals over de inbreuk op de integriteit gelden voor al het onderzoek dat met proefdieren wordt uitgevoerd, maar in onze samenleving speelt dat in het bijzonder bij het gebruik van NHPs. Primaten staan het dichtst bij de mens, zijn hoogontwikkeld en hebben een complex en verfijnd sociaal leven. Vooral in de landen van de EU is het gebruik van NHPs aan stringente regels gebonden;
- Ecologische effecten: Met uitzondering van de EU-landen is het gebruik van NHPs uit het wild nog toegestaan, ook van mensapen als chimpansee.
- COVID-19 is vooral prevalent bij ouderen en bij onderliggende gezondheidsproblemen. Dit is bij proefdieren en in het bijzonder bij NHPs moeilijk te realiseren; logistiek en qua kosten. Door één van de geraadpleegde deskundigen is aangegeven dat bij studies naar COVID-19 en veroudering het daarom beter is oudere dieren (muis/hamster/rat) te gebruiken;
- Praktische consequenties. Huisvesting van SARS-CoV-2 besmette dieren moet in extra beveiligde ruimtes (Biosafety Level 3) plaatsvinden<sup>17</sup>. Dit maakt het onderzoek bijzonder kostbaar.

Concluderend voor wat de vragen *'Welke diermodellen zijn wereldwijd gebruikt in het kader van COVID-19-onderzoek en welke invloed heeft het onderzoek naar COVID-19 wereldwijd gehad op het gebruik van proefdieren?'* betreft, het volgende:

- Vanwege de bestaande systematiek in de jaarlijkse rapportage proefdiergebruik en de gehanteerde onderzoekscategorieën, zowel nationaal als Europees, is het niet mogelijk in detail inzicht te krijgen in de omvang van dit gebruik voor het COVID-19-onderzoek. Wel kunnen uit de rapportage 'Zo doende' enkele voorlopige conclusies worden getrokken over gebruikte diermodellen. Daarnaast kunnen indicaties worden gegeven op basis van maximale aantallen aangevraagde dieren in vergunde projecten. Gegevens hierover waren beschikbaar uit Nederland en Duitsland (informatie wetenschappelijke publicatie). Deze aantallen zijn echter gebaseerd op mogelijk gebruik in de loop van het project (veelal 5 jaar) en zullen op basis van nieuwe inzichten (en dit geldt zeker voor een pandemie als COVID-19) bijgesteld worden.
- Uit de gehouden interviews komt naar voren dat een duidelijke prevalentie in het onderzoek ligt bij de diermodellen die ook zijn gebruikt in het onderzoek naar SARS en MERS. Wel is het zo dat sommige modellen, zoals muis en fret, voor bepaalde doelen minder geschikt zijn gebleken. In zijn algemeenheid wordt de muis gebruikt voor het basaal wetenschappelijk onderzoek (zoals keuze antigeen) en het voorbereidende onderzoek zoals veiligheid en immunogeniteit (het opwekken van antistoffen), de hamster vooral voor onderzoek op effectiviteit van vaccins en geneesmiddelen, de fret voor onderzoek naar virustransmissie en de NHP voor de fine-tuning van bij kleine knaagdieren verkregen informatie en voor de transitie van de preklinische fase naar de klinische fase ('First-in-human'). Daarnaast valt ook op dat Fase 1 studies in het klinisch onderzoek soms al gestart werden voordat alle gegevens uit het preklinisch onderzoek beschikbaar waren (zie Tabel 6).
- Gezien de mondiale omvang van het onderzoek, in het bijzonder naar vaccins en geneesmiddelen, mag worden aangenomen dat het gebruik van muizen, hamsters, fretten en NHPs zal zijn toegenomen, waarbij de kanttekening dat het gebruik van NHPs vooral in de VS en in China heeft plaatsgevonden.

<sup>15</sup> Interview Vincent Munster, Opschalen vaccinproductie wordt het grote probleem. Bionieuws 16 mei 2020.

<sup>16</sup> Chatfield K and Morton D. The Use of Non-human Primates in Research. In: Ethics Dumping. Schroeder D et al. (eds), pp 81-90. Springer Link. ISBN 978-3-319-64730-2 (2018)

<sup>17</sup> The Atlantic Sarah Zhang. The Atlantic. August 31, 2020. COVID-19 Vaccine Research is Facing a Monkey Shortage.

## 2. Welke alternatieve (dierproefvrije) methoden zijn er wereldwijd in het kader van COVID-19-onderzoek toegepast? Met welk effect?

Globaal gesproken kunnen dierproefvrije methoden onderverdeeld worden in biologische modellen, niet biologische of analytische modellen en *in silico* modellen. In biologische modellen is de afleesparameter een functionele en kwalitatieve respons, zoals bijvoorbeeld de neutralisatie van SARS-CoV-2 virus door antistoffen. Bij analytische modellen gaat het om de kwantiteit van de afleesparameter, bijvoorbeeld de hoeveelheid antistoffen die door witte bloedcellen zijn geproduceerd, zonder dat deze hoeveelheid iets zegt over het vermogen om het virus te neutraliseren. *In silico* modellen maken gebruik van computerprogramma's voor simulatie, opzet van databanken of modelleringsstudies.

Binnen het COVID-19 onderzoek zijn weefselkweken een voorbeeld van biologische modellen en een belangrijke categorie proefdiervrije methoden. Deze methoden kunnen minder (zoals primaire celculturen) of meer (zoals organoidculturen en organs-on-a-chip) complex van opzet zijn. Belangrijke analytische methoden binnen het COVID-19 onderzoek zijn de fysisch-chemische methoden zoals massaspectrometrie en immuno-chemische methoden zoals ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay). *In silico* modellen zijn bijvoorbeeld gebruikt om systematisch genetische veranderingen in het virus te analyseren of om in repositories gericht te zoeken naar geneesmiddelen met een potentiële werking tegen het SARS-CoV-2 virus.

Als onderdeel van de beantwoording van de adviesvragen van de minister van LNV zijn twee verdiepende literatuurstudies uitgevoerd; een studie bij het Amsterdam UMC naar het gebruik en de mogelijkheden en beperkingen van weefselkweek (*in vitro*) methoden en een studie bij de Universiteit Leiden naar het gebruik, de mogelijkheden en beperkingen van analytische methoden. In de studie naar *in vitro* methoden lag de nadruk op de innovatieve modellen, in het bijzonder organoidculturen en organ(s)-on-a-chip. De eindverslagen van deze studies zijn als bijlagen bij dit het eindadvies opgenomen. Hieronder volgt een samenvatting van de resultaten.

### 2.1 Fysisch-chemische en immuno-chemische modellen

In de studie naar analytische methoden wordt een onderscheid gemaakt tussen de fysisch-chemische methoden en de immuno-chemische methoden. Fysisch-chemische methoden geven vooral inzicht in de structuur (zowel 2- als 3-dimensionaal) en kwantiteit van een molecuul/stof. Met deze methoden kan een product adequaat worden gekarakteriseerd en op basis daarvan kan de consistentie in productie worden bewaakt. Bij immuno-chemische methoden wordt gebruik gemaakt van immunologische technieken om aan de hand van aspecten als binding en sterkte van binding tussen antigeen en antistof waardevolle informatie te verzamelen over de immuunreacties. Voorbeelden van toegepaste fysisch-chemische methoden in de vaccinontwikkeling zijn Chromatografie en Spectroscopie en in voor de immuno-chemische methoden zijn dat ELISA (Enzyme-linked immunoabsorbent assay) en Biosensor analyse.

In de literatuurstudie door de Universiteit Leiden is voor 12 vaccins, verdeeld over verschillende productie-technieken (RNA en DNA, Vector, Sub-unit, geïnactiveerd) en geregistreerd of in de klinische fase van onderzoek, nagegaan welke analytische methoden zijn gebruikt in de ontwikkelingsfase. Geconcludeerd wordt dat voor het COVID-19 onderzoek alleen gebruik is gemaakt methoden die al bestonden voor de COVID-19 pandemie. Er zijn geen fysisch- en immuno-chemische modellen ontwikkeld specifiek voor het COVID-19 onderzoek. Het gebruik van deze type modellen heeft niet 1 op 1 geleid tot een vervanging of reductie in proefdiergebruik. Echter van de combinatie van goed gekarakteriseerde productieplatforms voor vaccins waarmee een consistente productiekwaliteit kan worden bereikt en de fysisch- en immuno-chemische test modaliteiten voor een goede monitoring van de productie, kan worden verwacht dat deze uiteindelijk kan leiden tot vaccinontwikkeling en productie zonder proefdieren. In dit verband refereert het rapport aan het feit dat, in de context van de COVID-19 vaccinontwikkeling, klinische studies simultaan of zelfs al voorafgaand aan de preklinische studies werden uitgevoerd. Dat zou erop kunnen wijzen dat dierexperimenteel onderzoek voor de hedendaagse vaccins minder relevant is dan voor de vroegere generatie vaccins. Op dit punt zal het rapport in 4.2.1. terug komen.



## 2.2 In vitro modellen

De term '*in vitro*' (latijn voor 'in glas') verwijst naar de oorspronkelijke manier waarop cellen of weefsels buiten het lichaam werden gekweekt. Cellen kunnen vers verkregen worden uit mens of dier (primaire celkweken), of kunnen verkregen worden uit getransformeerde en doordelende (geimmortaliseerde) cellen (cellijnen). Deze kweken worden nog steeds gebruikt maar zijn inmiddels aangevuld met innovatievere technieken die meer complexiteit geven aan de culturen. Bekend zijn vooral de organoidculturen (mini-orgaantjes); 3-dimensionale structuren die ontstaan op basis van de differentiatie van stamcellen, en de organs-on-a-chip (microfluidic-culturen); polymere plaatjes waarin een circuit van vaatjes belijnd wordt door specifieke cellen en weefsels, die op basis van perfusie systemen een zekere mate van dynamiek van een orgaan kunnen nabootsen. Veel van deze systemen werken met humane cellen.

De studie van Amsterdam UMC (bijlage 2) heeft zich gericht op 3 deelvragen: a) wat is het aandeel van *in vitro* methoden geweest in het wereldwijde COVID-19 onderzoek; b) bij welke onderzoeksvragen is gewerkt met *in vitro* humane luchtwegmodellen en c) welke rol hebben organoidmodellen gespeeld in het geneesmiddelenonderzoek. Van alle COVID-19 publicaties (tot februari 2022 zijn dat er 461.907) richten 85.077 publicaties zich op de rapportage van onderzoeksresultaten. Bij het overgrote deel hiervan (56.579) gaat het om klinisch onderzoek. 4044 publicaties beschrijven dierexperimenteel onderzoek, 2673 *in vitro* onderzoek en 1193 publicaties een combinatie van dierexperimenteel en *in vitro* onderzoek. *In vitro* modellen lijken ingezet in onderzoek naar het vermogen van infectie van het virus en voor onderzoek naar orgaanspecifieke schade en vooral ook voor de bestudering van het effect van geneesmiddelen.

Voor de innovatie op het gebied van de organoidmodellen en de organs-on-a-chip bieden veel potentie om op een aantal gebieden het proefdiergebruik te vervangen<sup>18</sup>. Uitgebreide collecties van deze modellen zijn aanwezig. Zo beschikt het Hubrecht lab in Utrecht over meer dan 1000 organoid lijnen van diverse organen en pathologieën.<sup>19</sup> De Respiratory data catalogue van het EURL-ECVAM (European Reference Lab- European Center for the Validation of Alternative Methods) van de Europese Commissie bevat 284 *in vitro* modellen voor respiratoire processen en aandoeningen<sup>20</sup>. Deze voorbeelden illustreren de aandacht voor en activiteit op het gebied van *in vitro* modellen maar leggen ook een zwakte bloot, namelijk het feit dat veel van deze modellen slecht gestandaardiseerd zijn en beperkt gevalideerd. Aandacht voor deze aspecten, nog los van technische beperkingen als een korte levensduur en beperkte orgaanfunctionaliteit, is noodzakelijk om een brede toepassing te mogelijk te maken<sup>21</sup>.

## 2.3 Humane studies

Studies met humane vrijwilligers liggen ten grondslag aan de Phase 1, 2 en 3 van het klinische onderzoek bij de registratie van nieuwe geneesmiddelen en vaccins. In dat opzicht zijn dit geen voorbeelden van proefdieronderzoek. Maar studies in mensen voorafgaand aan de klinische studies zijn dat wel. Van gezonde vrijwilligers is, buiten de klinische studies om, maar beperkt gebruik gemaakt en als dit gebeurde was het vooral om in een vroeg stadium van vaccinontwikkeling aan te tonen dat een potentieel vaccin in staat is een immuunrespons op te wekken. Dit natuurlijk na bewezen veiligheid van het product.

---

<sup>18</sup> Partho Protim Adhikary et al. 2021. COVID-19 highlights the model dilemma in biomedical research. Nature Review. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00305-z>

<sup>19</sup> Perrone F & Zilbauer M. Biobanking of human gut organoids for translational research. Experimental & Molecular Medicine 53, 1451-1458 (2021)

<sup>20</sup> Hynes J et al. (2020). Advanced Non-animal Models in Biomedical Research: Respiratory Tract diseases. Doi 10.2760/725821 (data.jrc.ec.europa.eu)

<sup>21</sup> Hofer M and Lutolf P. Engineering organoids. Nature Review Materials (2021), 6, 402 - 420

Voor zover bekend is er 'slechts' een enkele studie (niet in Nederland) geweest waarin gevaccineerde proefpersonen in het kader van de proef zijn geïnfecteerd met het virulente virus (challenge studies)<sup>22</sup>. Voorafgaand aan deze studie heeft een uitgebreide ethische afweging plaatsgevonden<sup>23</sup> en zijn er de nodige voorzorgsmaatregelen genomen: het gaat om jonge gezonde vrijwilligers en het challenge virus is voorafgaand aan de proef uitvoerig in proefdieren op virulentie getest<sup>24</sup>. Op grond van de resultaten van de humane challenge studie concludeerde de voorzitter van de British Society for Immunology "*In the longer-term, the hope is that the findings of the study will now open up a new research avenue to develop a platform that will allow us to speed up the development of new vaccines, antivirals and diagnostics against COVID-19*".

Veel van de studies naar de pathofysiologie van het virus zijn uitgevoerd in COVID-19 besmette personen, soms in combinatie met ander onderliggend lijden. Vraagstellingen waren zeer divers en konden gaan over de pathofysiologie van een acute infectie of bij Long Covid, waarbij sommige studies gericht werden op vrijwilligers met onderliggend lijden. Voorbeelden van deze studies zijn hieronder gegeven. Humaan onderzoek is aan strikte ethische en wetenschappelijke regels gebonden en moet zijn goedgekeurd door een Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO) of de Medisch Ethische Toetsingscommissie (METC)<sup>25</sup>. De gegevens van de CCMO<sup>26</sup> gaven voor de periode van de pandemie circa<sup>27</sup> 250 vergunde studies op basis van de zoektermen COVID 19 en SARS-CoV-2 en corona. Voorbeelden van vergunde studies zijn:

- SAR-CoV-2 vaccinatie respons in mensen die leven met een SARS-CoV-2 infectie
- Vroege fase SARS-CoV-2 afweerreactie inclusief antilichamen kinetiek in patiënten met milde COVID-19 klachten
- Prevalentie van asymptomatische diep veneuze trombose in opgenomen patiënten met COVID-19
- Een gerandomiseerd dubbelblinde, placebo gecontroleerd, enkele dosering studie om de veiligheid, verdraagzaamheid, farmacokinetiek en farmacodynamiek van ALKS 6610 te onderzoeken in gezonde volwassen vrijwilligers

## 2.4 In silico modellen & strategieën

*In silico* methoden en strategieën maken gebruik van computersoftware en bio-informatica. De toepassing binnen het COVID-19 onderzoek is zeer divers en varieert van het gebruik van databestanden tot het modelleren van processen op basis van computerprogramma's<sup>28</sup>. Enkele voorbeelden hiervan zijn het zoeken naar potentiële COVID-19 medicijnen in data-bestanden van medicijnen die voor andere doeleinden zijn ontwikkeld (zogenaamde re-purpose medicijnen) of op basis van computer modellering informatie te verzamelen over de kinetiek en dynamiek van het virus. Bio-informatica speelt een rol om bijvoorbeeld aan de hand van de sequentie van het genoom uitspraken te doen over nieuwe varianten van het virus en de verspreiding daarvan of om virus-epitopen te identificeren voor vaccin ontwikkeling. Bewerking van databestanden is essentieel voor epidemiologische vragen maar ook om gericht en volgens specifieke criteria (Machine Learning) te zoeken naar relevante literatuur.

---

<sup>22</sup> Williams S. First COVID-19 Human Challenge Trial Reveals Uneven Susceptibility. The Scientist, February 3, 2022. [www.the-scientist.com](http://www.the-scientist.com)

<sup>23</sup> Lambkin-Williams R & DeVincenzo J.P. A COVID-19 human viral challenge model. Learning from Experience.. Influenza Other Respir viruses. Nov.14(6), 747-756. <http://doi.org/10.1111/irv.12797>

<sup>24</sup> Ramathan R. et al. (2019). Use of controlled human infection models (CHIMS) to support vaccine development in US regulatory considerations. Vaccine. Doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.009

<sup>25</sup> De CCMO gaat over klinische studies in het kader van vaccinonderzoek en de MEC over klinische studies in het kader van geneesmiddelenonderzoek.

<sup>26</sup> CCMO website, Openbaar CCMO-register: [www.ccmo.nl](http://www.ccmo.nl)

<sup>27</sup> Niet alle hits zijn op basis van de titel te herleiden naar studies in het kader van COVID-19 onderzoek.

<sup>28</sup> Basu S et al. In silico strategies to combat COVID-19: A comprehensive review. Biotechnol Genet Eng Rev. (2021), 1: 64-81. Doi 10.1080/02648725.2021.1966920

Veel van de genoemde toepassingsgebieden hebben niet direct geleid tot een vervanging of vermindering van diergebruik maar wel indirect door het beter en gerichter beschikbaar maken van data.

## 2.5 Multidisciplinaire benaderingen

Een model overstijgende toepassing is de integratie van verschillende proefdiervrije methoden in een multidisciplinaire studie benadering. In het kader van infectieziekten-onderzoek zullen twee voorbeelden worden beschreven.

Door EURL-Joint Research Centre van de Europese Commissie is het project Modelling the Pathogenesis of COVID-19 using the Adverse Outcome Pathway (CIAO<sup>29</sup>) gestart. Dit project beoogt beschikbare data (*in vivo*, *in vitro* en klinisch) te integreren in een samenhangend beeld over de mechanismen betrokken bij de pathogeniteit (adverse outcome) van het SARS-CoV-2 virus. Het project werkt op basis van een vrijwillige bijdrage aan een wetenschap community waarbij ieder lid kennis deelt en betrokken is bij de integratie van die kennis. Verschillende groepen werken aan verschillende biologische systemen zoals long en luchtwegen.

Het tweede voorbeeld is het onlangs afgesloten project VAC2VAC dat gefinancierd werd door IMI (Innovative Medicines Initiative). Het project telt 22 partners afkomstig uit de universitaire wereld, regelgeving, industrie en publieke onderzoeksinstituten. Doelstelling van het project is het karakteriseren van geproduceerde vaccinbatches, gebruikmakend van *in vitro* en analytische methoden met als uiteindelijke doel het vervangen van het omvangrijke proefdiergebruik voor de wettelijk verplichte batchvrijgifte (circa 10% van het Europese proefdiergebruik) door proefdiervrije methoden. De resultaten zullen vooral effect hebben op het proefdiergebruik van klassiek geproduceerde vaccins, zoals het tetanus en difterie vaccin en minder voor de nieuwe generatie vaccins zoals de mRNA en DNA-vaccins en de eiwit subunit vaccins. Geproduceerde batches van deze nieuwe generatie vaccins worden veelal vrijgegeven op basis van fysisch-chemische en immunochemische methoden en bewezen consistency in productie.

## 2.6 Financiering van onderzoek

Het is vooralsnog onduidelijk of en in welke mate de COVID-19 pandemie in verschillende landen geleid heeft tot additioneel onderzoek naar proefdiervrije methoden. Op basis van de beschikbare gegevens kan daarover geen uitspraak worden gedaan. Gegevens zijn wel bekend van onderzoek gefinancierd door de Europese Commissie, in het bijzonder het programma H-2020 en het proefdiervrij onderzoek gefinancierd door ZonMw, in samenwerking met de Stichting Proefdiervrij.

### 2.6.1 Overzicht Financiering COVID-19 onderzoek vanuit de Europese Commissie (H-2020)

Door de Europese Commissie zijn, lopende de pandemie, additionele gelden vrijgemaakt voor COVID-19 onderzoek. Dit onderzoek bestrijkt een breed palet van aandachtsgebieden: geneesmiddelen- en vaccinonderzoek, bestudering van het virus, maar ook de maatschappelijke impact en de financiële consequenties van de pandemie. Het grootste deel van de gelden komen uit het EU-subsidieprogramma Horizon 2020 voor onderzoek & innovatie.

Tot medio 2021 kende dit COVID-19 deel een totaal budget van 500M Euro. H-2020 kent geen specifiek budget voor proefdiervrij onderzoek maar subsidies zijn ge-earmarked in projecten waarvan proefdiervrije methoden deel uitmaken.

---

<sup>29</sup> Modelling the pathogenesis of COVID-19 using the Adverse Outcome Pathway Framework (<https://europa.eu/newsroom/events>)

**Tabel 4. Financiering COVID-19 onderzoek door de Europese Commissie**

Bedrag (Euro)	Aantal projecten	Projecten met dierstudies	Bijzonderheden
circa 500M	>100	10 (circa 1M)	3 projecten met NHPs (allen gericht op prophylaxe) 1 project met wilde dieren (vleermuis/muis) gericht op faeces onderzoek

#### Bijzonderheden H2020 projecten

Ongeveer 10% van de biomedische H2020 projecten op het gebied van COVID-19 werkten met alternatieven voor dierproeven

- Voorbeelden van gebruikte alternatieven in het COVID-19 onderzoek:
  - Air-liquidculturen van humaan luchtweg epitheel
  - Micro-fluidic-culturen op gebied van vasculair epitheel, hersenen, neuro-epitheel
  - Organoidculturen van dunne darm, lever, long, hart, nier

#### 2.6.2 Overzicht Financiering Programma Meer Kennis met Minder Dieren (MKMD) van ZonMw.

In Nederland worden door ZonMw vooral vanuit het programma Meer Kennis met Minder Dieren (MKMD) verschillende studies gefinancierd (budget 2.25 miljoen Euro) die gericht zijn op proefdiervrije innovaties in het COVID-19 onderzoek. Het betreft de volgende projecten:

- Het opzetten van een dynamisch celmodel in bioreactoren op basis van menselijke luchtwegepitheel cellen en bloedvat cellen;
- Onderzoek in celmodellen van de effecten van een corona-infectie op diverse organen, zoals bovenste en onderste luchtwegen, darmen en nieren;
- Het gebruik van een bloedvatenmodel op een microchip om het ontstaan van bloedstolling, een voorkomende complicatie bij COVID-19 patiënten, te onderzoeken;
- Het bestuderen van longschade en de pathofysiologie hierachter in diverse *in vitro* modellen als humane celmodellen, organoidculturen en conventionele kweekmodellen;
- Onderzoek in humane vrijwilligers naar het mechanisme achter de preventieve werking van heparine in de binding van SARS-CoV-2 aan luchtweg-epitheelcellen.
- Ook wordt door ZonMw onderzoek gefinancierd naar de beschermende werking van het tuberculose vaccin BCG tegen een COVID-19 infectie, dit in humane vrijwilligers.

Het betreft allemaal studies waarvan de financiering in 2021 is gestart. Omdat de projecten een looptijd hebben van circa 4 jaar, zijn resultaten van de studies nog niet beschikbaar.

#### 2.7 Effect alternatieve (dierproefvrije) methoden

De vraag wat het wereldwijde effect is geweest van de proefdiervrije methoden op het COVID-19 onderzoek is moeilijk te beantwoorden en kan op verschillende manieren worden gelezen. Concrete cijfers over een invloed van proefdiervrije methoden op proefdiergebruik ontbreken. Zelfs in de Europese Unie, waar monitoring van het proefdiergebruik in de regelgeving is vastgelegd, ontbreekt de systematiek om per individuele onderzoeksvraag het proefdiergebruik te volgen. Verder komt uit de interviews en de uitgevoerde literatuurstudies naar voren dat in het COVID-19 onderzoek vanwege de urgentie vooral is teruggегrepen op bestaande en geaccepteerde methoden, mogelijk met uitzondering van de nieuwste generatie (RNA/DNA) vaccins. Deze laatste constatering is belangrijk omdat dit ook productieplatformen zijn die bij uitstek leiden tot hoog gedefinieerde producten waarvoor een goede karakterisatie op basis van analytische methoden mogelijk belangrijker is dan het uitvoeren van dierstudies. De indruk bestaat ook dat COVID-19 onderzoek weliswaar niet geleid heeft tot de ontwikkeling van nieuwe proefdiervrije technologieën (zie ook het rapport analytische technieken), maar dat recent ontwikkelde technieken die een bijdrage kunnen leveren aan een reductie van het proefdiergebruik zich hebben kunnen bewijzen.



Dit geldt bijvoorbeeld voor de fysisch- chemische methoden in vaccinproductie en het gebruik van organoidculturen in het pathogeniteitsonderzoek, Verder heeft de COVID pandemie bijgedragen aan een versnelde doorontwikkeling en toepassing van platforms voor vaccinproductie zoals de RNA/DNA platformen en zijn de analytische testmethoden bij uitstek geschikt gebleken voor een effectieve en afdoende product controle.

Concluderend voor wat betreft de vraag 'Welke alternatieve (dierproefvrije) methoden zijn er wereldwijd in het kader van COVID-19-onderzoek toegepast? En met welk effect?' het volgende:

- Zoals gemeld bij het onderdeel 'Diermodellen' is bij het uitbreken van de pandemie vooral teruggeslagen op bestaande diermodellen. Naast de urgentie van het moment zal dit ook te maken hebben gehad met het vasthouden aan beproefde systemen. Wel zijn nieuwe projecten opgestart gericht op de ontwikkeling van proefdiervrije modellen, maar met een looptijd van 4 tot 5 jaar zullen deze modellen pas beschikbaar komen na afloop van de pandemie.
- Dat laat onverlet dat in het COVID-19 onderzoek, naast diermodellen, ook gebruik is gemaakt van bestaande proefdiervrije methoden (zie hiervoor ook de bijlagen). Voor vaccinontwikkeling en vaccinkarakterisatie is veel gebruik gemaakt van fysisch- en immuno-chemische methoden; voor viruskarakterisatie, pathofysiologie en geneesmiddelen ontwikkeling zijn *in vitro* modellen gebruikt, zowel eenvoudige celkweek methoden als geavanceerde organoidculturen en organs-on-a-chip; pathofysiologie is vooral onderzocht in COVID-19 patiënten en vooral geneesmiddelenonderzoek zijn menselijke vrijwilligers ingezet. *In silico* modellen tenslotte zijn gebruikt voor viruskarakterisatie, selectie van potentiële geneesmiddelen, epidemiologie en analyses van patiëntgegevens.
- In termen van proefdiergebruik is binnen het COVID-19 onderzoek de ontwikkeling van geneesmiddelen en vooral van vaccins de belangrijkste reden voor proefdiergebruik geweest. De combinatie van vaccinontwikkeling op basis van de nieuwste technologieën (vector-; RNA/DNA- en peptide vaccins), het gebruik van fysisch- en immuno-chemische technieken en de toepassing van *in vitro* methoden heeft de potentie om tot een transitie te leiden in het gebruik van proefdieren. (zie voor verdere onderbouwing Hoofdstuk 3 en de bijlagen van dit advies).
- Een beperkende factor in deze transitie is het ontbreken van *in vitro* immuunparameters in organoidculturen en organs-on-a-chip. Hierdoor is het nog niet mogelijk om zonder gebruik van een diermodel de effectiviteit van een geneesmiddel of vaccin te meten. Het genereren van een complex *in vitro* model vergt een aanzienlijke inzet van tijd en middelen (zie ook 4.3.2.).

### 3. Welke wijzigingen zijn opgetreden in de (internationale navolging van) de voorgeschreven procedures voor vaccin- en/of medicijn-ontwikkeling?

Bij het afronden van dit advies (april 2022) zijn er wereldwijd 8 COVID-19 vaccins toegelaten tot de markt<sup>30</sup>: 2 RNA vaccins (Pfizer-BioNTech en Moderna); 2 vaccins op basis van een virale adenovectoren (Astra-Zeneca en Janssen Pharmaceuticals), 1 eiwit subunit vaccin (Nuvaxovid van Novavax) en 3 geïnactiveerde vaccins op basis van Vero celkweek: Sinovac (China) en 2 vaccins van Sinopharm (China). Daarnaast lopen er voor 153 vaccins klinische studies en verkeren 196 vaccins in de preklinische fase van ontwikkeling. Bij EMA wacht 1 vaccin op markt autorisatie (Vidprevtyn van Sanofi-Pasteur) en zijn 5 vaccins onder rolling review<sup>31</sup>. Voor de ontwikkeling van

<sup>30</sup> WHO COVID-19 vaccine tracker and landscape (who.int) (15 april 2022).

<sup>31</sup> [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu) (15 april 2022)

vaccins worden verschillende platform technologieën gebruikt. Voor de vaccins die deel uitmaken van klinische studies is in Tabel 5 een overzicht van de gebruikte platform technologieën gegeven.

**Tabel 5. Gebruikte vaccin platformen in de ontwikkeling van COVID-19 vaccins**

Platform technologie	Aantal vaccins in klinische studies
Eiwit subunit	51
Virale vector (niet replicerend)	21
DNA	16
Geïnactiveerd	21
RNA	28
Virus like partikel	6
Overig	10

(WHO COVID-19 vaccine tracker)

Het totaal aantal van 349 vaccins (preklinisch en klinisch onderzoek) is hoger dan gemeld in de interim-rapportage (321; 3 mei 2021). Enige internationale regie in vaccinontwikkeling heeft plaatsgevonden door de WHO, Europese Commissie en organisaties als CEPI (the Coalition for Epidemic Preparedness Innovations) en Gavi (een vaccin alliance met als belangrijkste partners WHO, UNICEF, de Wereldbank en de Bill & Melinda Gates Foundation), maar geconstateerd moet worden dat de urgentie van vaccinontwikkeling zo groot is geweest dat individuele landen en/of bedrijven direct bij het begin van de pandemie een ontwikkelingstraject zijn ingegaan en dit traject zijn blijven volgen.

Het aantal geneesmiddelen voor COVID-19 dat door EMA<sup>32</sup> is toegelaten (april 2022) tot de markt bedraagt 8. Daarnaast wachten 2 aanvragen op autorisatie. Van deze geneesmiddelen behoren er 5 tot de categorie van monoclonale antistoffen en 5 zijn farmaca. Geneesmiddelen worden curatief gegeven, na vaststelling van de besmetting, maar er zijn ook middelen in ontwikkeling met een preventieve werking. Naast deze antivirale middelen wordt ook onderzoek gedaan naar ondersteunende geneesmiddelen bij een COVID-19 infectie zoals het gebruik van ontstekingsremmers als dexamethasone of convalescent plasma. Tenslotte zijn middelen onderzocht die door de autoriteiten zijn vrijgegeven voor andere doeleinden maar waarvan de verwachting was dat ze ook werkzaam zouden kunnen zijn bij COVID-19. Voorbeelden van deze zogenaamde repurposed medicijnen zijn het anti-parasitaire middel Ivermectine en Hydroxychloroquine, een geneesmiddel tegen malaria<sup>33</sup>. Van repurposed geneesmiddelen zijn gegevens over de veiligheid reeds aanwezig, maar voor de mogelijke bescherming tegen een COVID-19 besmetting is in de regel aanvullend onderzoek (ook in dieren) nodig.

Stappen in de ontwikkeling en autorisatie van een vaccin of geneesmiddel zijn beschreven in de interim rapportage. Kort samengevat wordt de ontwikkelingsfase (isolatie en karakterisatie virus, selectie antigeen) gevolgd door preklinische studies waarin de veiligheid van het vaccin of geneesmiddel wordt beoordeeld, de farmacokinetiek en dynamiek van het vaccin of geneesmiddel wordt bestudeerd, informatie wordt gegenereerd over doseringen, toedieningsroute en aantal benodigde immunisaties/injecties, en waarin de werkzaamheid van het product wordt bepaald. Deels wordt in het preklinisch onderzoek gebruik gemaakt van proefdiervrije methoden, maar voor een aantal studies worden ook proefdieren gebruikt. Grofweg is het zo dat proefdiervrije methoden worden ingezet in de beginfase van het preklinisch onderzoek. In de eindfase gaat het vooral om dierstudies. Preklinische dierstudies zijn niet wettelijk voorgeschreven maar kunnen bij autorisatie van het vaccin of geneesmiddel wel worden opgenomen in het registratiedossier en dan alsnog een wettelijk voorgeschreven controle test worden voor de routine productie van de vaccins of geneesmiddelen. Dit kan het geval zijn bij de traditioneel geproduceerde vaccins (geïnactiveerde

<sup>32</sup> [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu) (15 april 2022)

<sup>33</sup> Van beide geneesmiddelen wordt de werkzaamheid bij COVID-19 sterk in twijfel getrokken

en levend verzwakte vaccins), maar zelden bij de innovatievere platformtechnologie als RNA, DNA en eiwit subunit vaccins.

Deze laatste producten zijn reeds zeer uitvoerig gekarakteriseerd en gestandaardiseerd in de ontwikkelingsfase. Controle bij de batchgewijze productie kan dan beperkt blijven tot proefdiervrije methoden, waarmee de consistentie in productie wordt aangetoond.

De gangbare procedure in geneesmiddelen- en vaccinontwikkeling is dat de diverse stappen tot autorisatie sequentieel worden uitgevoerd. Dit biedt de ontwikkelaars de mogelijkheid voor het nemen van Go/No-Go beslissingen. Zo kunnen ontwikkelaars op grond van de resultaten van veiligheidsstudies besluiten verdere ontwikkeling te stoppen of wordt op grond van immunogeniteitsstudies besloten om de antigeensamenstelling aan te passen. De beoordelingsautoriteiten krijgen uiteindelijk het gehele registratiedossier wat de mogelijkheid biedt om specifieke resultaten in de context van het geheel te bekijken. Consequentie is wel dat het registratiedossier pas beoordeeld kan worden in de eindfase van productontwikkeling; in de praktijk vaak een aantal jaren na start van de ontwikkeling. Door de grote urgentie van de COVID-19 pandemie is afgeweken van de standaardprocedure, zijn sommige klinische studies al gestart voordat de preklinische studies waren afgerond en is overgestapt op een beoordeling van onderzoekdata door beoordelingsautoriteiten vanaf het moment dat ze beschikbaar kwamen; de zogenaamde 'rolling review'. Op basis van de bevindingen van de beoordelingsautoriteiten wordt door de registratieautoriteit (in Europa de European Medicines Agency, EMA) besloten een product vrij te geven voor de markt.

De niet sequentiële benadering in onderzoek en het toepassen van de rolling review bij COVID-19 vaccins en geneesmiddelen heeft voor een significante reductie in tijd gezorgd tussen start van ontwikkeling en productregistratie. De rolling review procedure kent echter ook beperkingen. De normale beoordelingstijd voor een productdossier is 1.200 uur. Bij een versnelde procedure loopt dit op tot het dubbele. Reden is dat door de fabrikant aangeboden beoordelingstukken niet op elkaar aansluiten, aanvullende informatie opgevraagd moet worden en stukken opnieuw beoordeeld moeten worden bij een gewijzigde context door aanvullende data. De personele belasting van de registratieautoriteiten neemt op deze wijze enorm toe en de consequentie is dat de beoordeling van andere dossiers vertraging oploopt. (zie ook Tabel 6).

In de interim rapportage zijn in tabelvorm de factoren benoemd die tot een versnelling hebben geleid in het vaccinontwikkelingstraject. Voor de eindversie van het advies zijn verdiepende gesprekken gevoerd met vertegenwoordigers van de beoordeling- en registratie-autoriteiten. Dit heeft geleid tot een aantal kanttekeningen bij de versnelling die het minder aannemelijk maken dat een rolling review procedure de standaard zal worden. De kanttekeningen worden gespecificeerd in onderstaande tabel.

Tabel 6. Versnelling in vaccinontwikkeling en autorisatie: factoren, versnelling en kanttekeningen

Factoren	Traditionele route van ontwikkeling tot registratie	Versnelling ontwikkeling en registratie van COVID 19 vaccins	Aanvullende opmerkingen
<b>Technologie</b>	Klassieke vaccins op basis van inactivatie/attenuatie van het micro-organisme. Vaak toevoeging van een adjuvans voor versterking immuunrespons.	Gebruik is gemaakt van innovatieve vaccintechnologieën (RNA en DNA) die zich onder andere bewezen hadden bij de ontwikkeling van het Ebolavaccin. Doordat informatie over werking en veiligheid van deze technologieën beschikbaar was bij aanvang van de pandemie kon een de ontwikkeling van deze vaccins een versnelling worden gegeven.	Door de mutatie-gevoeligheid van het SARS-CoV-2 virus zullen aanpassingen van vaccins noodzakelijk blijven. Zowel uit wetenschappelijk en maatschappelijk oogpunt als omwille van het proefdiergebruik is het belangrijk goed gekarakteriseerde vaccin-platformen te gebruiken zoals de mRNA-, DNA vector- of peptide vaccins. Goed gekarakteriseerd betekent dat informatie over structuur, stabiliteit, eiwit-vouwing vastligt, en productie op een consistente wijze verloopt. Dit voorkomt dat voor de batchgewijze vaccinrijgite routinematig dierproeven moeten worden uitgevoerd op veiligheid en werkzaamheid.  Vaccinontwikkeling vergt tijd <sup>34</sup> . Door Antony Fauci, directeur US NIAID <sup>35</sup> is voorgesteld hierop te anticiperen en voor 20 virus families prototype vaccins te ontwikkelen en karakteriseren.
<b>Vaccin-producenten</b>	Veelal is de markt voor een nieuw vaccin beperkt en vergt de beslissing om te investeren in ontwikkeling een diepgaande kosten-batenanalyse.	COVID-19 is een pandemie. Het op de markt brengen van een vaccin kan voor de producent een blockbuster zijn. Daarnaast levert het op de markt brengen voor een producent reputatievoordelen op.	Aan de ontwikkeling en het op de markt brengen van deze 'emergency' producten is ook een afbreukrisico verbonden, vooral als een ontwikkeld product minder effectief is als gedacht. Producenten hebben in de urgentie van de pandemie dit risico genomen maar zullen dit minder snel doen voor producten waar ontwikkelingssnelheid minder een rol speelt.
	Vaccinontwikkeling is een kostbare investering. In de ontwikkeling zijn talrijke Go/No Go-stappen ingebouwd om economische en wetenschappelijke risico's beheersbaar te maken.	Met overheden werden al tijdens de ontwikkelingsfase afspraken gemaakt over afname-volumina. Economische risico's waren daarom minder aan de orde. Producenten konden daardoor een significante versnelling geven aan de ontwikkeling van kansrijke producten.  Een versnelling werd aangebracht door het deels parallel uitvoeren van Fase-1 en Fase-2 studies aan preklinische studies (o.a. dierstudies zoals in NHPs).	Bij minder spoedeisende vaccinontwikkeling zullen overheden minder tot niet bereid zijn om grote investeringen te doen. Economische risico's komen derhalve te liggen bij de industrie die, om deze risico's te minimaliseren, gebruik zal maken van strak gedefinieerde en tijdvergende Go/No Go criteria. Ook zal vaccinproductie pas opgeschaald worden als registratie van het vaccin is gegarandeerd.  Het deels parallel uitvoeren van klinische studies aan preklinische studies heeft consequenties voor de benodigde capaciteit van beoordelaars (zie eerdere toelichting).

<sup>34</sup> Ter illustratie, de aanzet tot de ontwikkeling van mRNA vaccins verpakt in kleine vetbolletjes (liposomen) ligt in de jaren 60 van de vorige eeuw (Dolgin E., The tangled history of mRNA vaccines. Nature, Sept 16, 2021, Vol. 597: 318-324.

<sup>35</sup> NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, US

		Opschaling vaccinproductie werd al gestart voordat (conditionele) registratie verkregen was.	
	Vaccinontwikkeling is een van de activiteiten van een producent en 'concurrereert' met andere prioriteringen	Absolute prioriteit is gegeven aan de ontwikkeling van een COVID-19- vaccin. Dit heeft geleid tot meer dan 300 kandidaatvaccins die meer of minder ver in de pijplijn van ontwikkeling zitten. Ondersteuning werd gegeven door academische- en andere onderzoeksinstellingen	Absolute prioritering zal uitblijven als de urgentie voor de ontwikkeling ontbreekt. Samenwerkingen tussen industrie en academische instellingen zullen blijven maar met minder dynamiek.
Preklinisch onderzoek	Preklinische studies alleen na goedkeuring door CCD (na advies DEC) en iedere individuele dierstudie na goedkeuring door de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD)	Procedures en afwegingskader zijn niet gewijzigd. Wel is in de prioritering voorrang gegeven van COVID-19 gerelateerd onderzoek en heeft de CCD waar mogelijk dossiers schriftelijk behandeld i.p.v. in de drie wekelijkse vergadering <sup>36</sup>	Ook hier geldt dat teruggegaan zal worden naar de werkwijze in de pre-corona periode waarbij geen prioritering meer zal plaatsvinden.
Klinisch onderzoek	Klinische studies kunnen alleen worden uitgevoerd op basis van een wettelijk verplichte toetsing door een bevoegde instantie (CCMO/METC). Er vindt geen prioritering in de dossiers plaats.	Situatie in NL: versnelde toetsing door CCMO (vaccins) of METC's (therapeutica) middels een versnelde procedure. Geen verschil in afwegingskader tussen COVID-19-onderzoek en ander onderzoek. Voor therapeutische klinische studies is prioritering uitgevoerd door de commissie CoCoN (Covid Commissie NFU) van de NFU <sup>37</sup>	Ook hier geldt dat teruggegaan zal worden naar de werkwijze in de pre-corona periode waarbij geen prioritering wordt toegepast.
	Voor klinische studies zijn voldoende grote cohorten mensen nodig om het effect van de behandeling aan te kunnen tonen. Bij vaccins tegen infectieziekten is de mate van bescherming het criterium. In veel gevallen is de besmetting in een populatie laag, waardoor het lang duurt voordat effect is aangetoond.	In het geval van COVID-19 was de besmettingsgraad hoog waardoor in korte tijd voldoende informatie beschikbaar kwam over controle- en vaccingroepen om de beschermende werking aan te tonen. Ook was de bereidheid van mensen om mee te werken aan de studies hoog.	Het opstarten van klinische studies zal langer duren omdat het samenstellen van cohorten proefpersonen veelal meer tijd zal vergen. Het zal moeilijker zijn om, vooral voor Fase 1, proefpersonen te vinden.
Beoordelings- autoriteiten	Beoordeling van het compleet ingediende registratiedossier vindt plaats na afronding van alle studies (preklinisch en klinisch) door de producent.  Alle bij de beoordelingsautoriteit aangeboden dossiers worden in behandeling genomen. Er vindt geen prioritering plaats.	Er is voorrang gegeven aan COVID-19- protocollen, waarvoor aparte beoordelingssessies zijn gepland. Uitgegaan werd van een <i>rolling review</i> procedure waarbij tussentijdse advisering plaatsvond en delen van het dossier op moment van binnenkomen bij de autoriteiten al werden beoordeeld.	De sequentiële wijze van onderzoek biedt de ontwikkelaars momentum voor het nemen van Go/No go beslissingen na elke stap. De beoordelingsautoriteiten krijgen uiteindelijk het finale registratiedossier wat de mogelijkheid biedt om specifieke resultaten in de context van het geheel te bekijken. Consequentie is wel dat het registratiedossier pas beoordeeld kan worden in de eindfase van productontwikkeling, hetgeen in de praktijk vaak na afloop van het klinische onderzoek zal zijn.

<sup>36</sup> Inmiddels heeft de CCD tot november 2021 zeventien aanvragen inzake COVID-19 projecten behandeld.

<sup>37</sup> NFU: Nederlandse Federatie Universitair Medische Centra. [www.nfu.nl](http://www.nfu.nl)

	<p>Alle bij de beoordelingsautoriteit aangeboden dossiers worden in behandeling genomen. Er vindt geen prioritering plaats.</p>	<p>Hierdoor werd het mogelijk om klinische studies reeds op te starten op basis van getoonde veiligheid in preklinische studies.</p> <p>Door EMA is een EMA pandemic Task Force (ETF) ingesteld die op basis van kwaliteit/volledigheid van ingediende dossiers een voorstel voor selectie maakt. De ETF geeft advies aan de EMA-CHMP.</p>	<p>Door de grote urgentie van de COVID-19 pandemie is afgeweken van de standaardprocedure en is de <i>rolling review</i> gebruikt. Op basis van de bevindingen van de beoordelingsautoriteiten wordt door de registratieautoriteit (in Europa de European Medicines Agency, EMA) besloten een product vrij te geven voor de markt.</p> <p>De niet sequentiële benadering in onderzoek en het toepassen van de <i>rolling review</i> bij COVID-19 vaccins en geneesmiddelen heeft voor een significante reductie in tijd gezorgd tussen start van ontwikkeling en productregistratie. De <i>rolling review</i> procedure kent echter ook beperkingen om redenen zoals boven beschreven.</p>
	<p>Beoordeling van het dossier vindt alleen plaats als <b>alle</b> resultaten beschikbaar zijn, ook de resultaten van langdurige (longivity-) studies (om te bepalen hoelang na vaccinatie er nog bescherming is) en van studies naar reproductietoxiciteit, studies die langer dan een half jaar duren.</p> <p>Bij indiening zijn er al drie partijen van het product op commerciële basis geproduceerd en getest om consistentie in het productieproces aan te tonen.</p>	<p>In een <i>rolling review</i> wordt gebruik gemaakt van Conditional Marketing Authorizations (CMA); d.w.z. het ontwikkelde vaccin wordt onder condities vrijgegeven. Daarbij ligt de verplichting bij de producent om aanvullende gegevens later aan te leveren. Het gaat daarbij bijvoorbeeld om data over productie-opscaling en uitkomsten van longivity studies. Bij niet nakomen van deze verplichting wordt de conditionele vrijgifte ongedaan gemaakt.</p> <p>Resultaten van genoemde studies zijn nog niet in het registratiedossier meegenomen en worden in latere instantie (na registratie) alsnog toegevoegd. Bij toelating waren er nog geen drie charges die het commerciële proces bevestigen, maar er was wel een protocol waaraan deze moesten voldoen</p>	<p>De niet sequentiële benadering in onderzoek en het toepassen van de <i>rolling review</i> bij COVID-19 vaccins en geneesmiddelen heeft voor een significante reductie in tijd gezorgd tussen start van ontwikkeling en productregistratie. De <i>rolling review</i> procedure kent echter ook beperkingen., zoals reeds beschreven</p> <p>Voor longevity studies geldt dat data niet direct noodzakelijk zijn voor een kosten/baten evaluatie maar wel voor de mogelijke lange termijneffecten (veiligheid, effectiviteit) van het vaccin en dus voor de uiteindelijke acceptatie van het vaccin.</p>



In het stappenoverzicht van de productie en autorisatie van vaccins en geneesmiddelen ontbreekt een laatste stap en dat is de post-marketing surveillance op mogelijke bijwerkingen<sup>38</sup>. Dit is relevant voor het COVID-19 vaccin omdat de mogelijke bijwerkingen van deze vaccins onder een vergrootglas liggen. Postmarketing surveillance is een wettelijke verplichting bij het op de markt brengen van een vaccin/geneesmiddel. Bevindingen van artsen worden centraal geregistreerd en beoordeeld op causaliteit. Soms kunnen bevindingen leiden tot aanvullend onderzoek waaronder ook dierexperimenteel onderzoek. Een bekend voorbeeld hiervan is het onderzoek dat een aantal jaren geleden is uitgevoerd naar een mogelijke relatie tussen het optreden van autisme en de aanwezigheid van kwik in het conserveermiddel Thiomersal dat aan vaccins kan worden toegevoegd. Uitvoerig onderzoek heeft laten zien dat die relatie er niet was<sup>39</sup>. Bijwerkingen na COVID-19 vaccinatie zijn gemeld aan Lareb, het meld- en kenniscentrum voor bijwerkingen van geneesmiddelen. Lareb voert voor het CBG een deel van de wettelijke taak uit op het gebied van de geneesmiddelenbewaking. Tot en met 3 april 2022 zijn er bij Lareb 212.887 meldingen binnengekomen op een totaal van 34.8 miljoen gegeven COVID-19 vaccinaties. Voor zover valt na te gaan hebben deze meldingen niet geleid tot aanvullend dierexperimenteel onderzoek. De frequentie van optreden bij de mens was zo laag dat statistisch gezien een dergelijke bijwerking in proefdieren niet opgepakt zal worden tenzij zeer grote aantallen dieren zouden worden gebruikt.

Concluderend voor wat betreft de vraag *'Welke wijzigingen zijn opgetreden in de (internationale navolging van) de voorgeschreven procedures voor vaccin- en/of medicijn-ontwikkeling'* het volgende:

- Begin april 2022 waren 349 COVID-19 vaccins in ontwikkeling; 196 in de preklinische fase van het onderzoek en 153 in de klinisch onderzoek.
- Bij het begin van de pandemie is vooral gebruik gemaakt van conventionele modellen (zowel *in vivo* en proefdiervrij) uit het corona-onderzoek. De urgentie van de pandemie is een blokkade geweest voor het gebruik van nieuwe en minder vertrouwde modellen.
- Die urgentie heeft, tenminste voor een deel van de vaccins, ook geleid tot een significante reductie in tijd van vaccinontwikkeling tot registratie. Dit door maatregelen als overlap van klinische onderzoek en preklinisch onderzoek, beoordeling op basis van een rolling review en conditional authorisation. Deze aanpassingen hebben zowel in de ontwikkelingsfase als in de beoordelingsfase consequenties gehad voor de investering in capaciteit en derhalve in kosten.
- De tijdwinst die geboekt is, is niet ten koste gegaan van de aspecten veiligheid en effectiviteit; noch in de ontwikkeling van het vaccin of geneesmiddel bij de producent, noch bij de registratie autoriteiten. Dat wil zeggen, er is niet ingeleverd op de kwaliteit van de productbeoordeling, dit met uitzondering van de studies die nodig zijn voor lange termijneffecten, zoals duur van opgebouwde bescherming na vaccinatie, effecten op de zwangerschap. Informatie over deze aspecten is later in de tijd aangeboden en bij gebleken afwezigheid van effecten is de conditional authorisation omgezet in een authorisation.

---

<sup>38</sup> [www.lareb.nl](http://www.lareb.nl)

<sup>39</sup> DeStefano F et.al. Principle controversies in vaccine safety in the United States. Clin.Infect.Dis. 2019; 69 (4), 726-731 1

## 4. Welke lessen of adviezen, in de context van de COVID-19 pandemie, kunnen worden getrokken voor de toekomst van de transitie proefdier vrije innovatie?

De COVID-19 pandemie kwam eind 2019 onverwacht, in een wereld die daar niet op was voorbereid en die ons deed beseffen dat een pandemie zo maar weer kan gebeuren. De impact van COVID-19 was en is nog steeds (voorjaar 2022) gigantisch. Een overbelaste gezondheidszorg, complexe sociaal-maatschappelijke problemen en een nauwelijks te benoemen, laat staan te bevatten, kostenpost.

Helaas is nog niet mogelijk om exacte cijfers te geven over het proefdiergebruik maar de eerste gegevens in Nederland en Duitsland<sup>40</sup> (dit laatste op basis van een wetenschappelijke publicatie) laten zien dat er weliswaar verschuivingen in het proefdiergebruik zijn opgetreden, maar niet exceptioneel. Van de 369 aanvragen die in de periode januari 2020 tot november 2021 door de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) zijn toegewezen hadden 18 projecten betrekking op COVID-19 onderzoek (karakterisatie van het virus, ontwikkeling en controle van vaccins en – zij het in mindere mate – van geneesmiddelen) Van november 2021 tot april 2022 zijn er geen projecten meer goedgekeurd in relatie tot COVID-19 onderzoek.

Het gebruik van dieren voor het COVID-19 onderzoek vertaalt zich met name in een toenemend aantal hamsters, muizen en niet humane primaten (NHPs), met daarbij de aantekening dat de toename van muizen voor COVID-19 in de jaarregistratie Zo doende is versluierd is door een afschaling van ander onderzoek met muizen.

Een constatering dat de cijfers over het proefdiergebruik lijken mee te vallen zou, zonder verdere informatie en discussie, afbreuk doen aan de problematiek van het proefdiergebruik. In onze Europese wetgeving wordt aan dieren een intrinsieke waarde toegekend. Dat maakt dieren meer dan alleen een model voor onderzoek. Elk gebruik vraagt om een ethische afweging, ongeacht het doel van het gebruik. Om die reden is ook bij het COVID-19 onderzoek de vraag gerechtvaardigd of en hoe we dit gebruik kunnen vervangen door proefdier vrije methoden; direct of indirect.

In het navolgende wordt ingegaan op de vraag van de minister naar de lessen die uit de COVID-19 pandemie getrokken kunnen worden met betrekking tot de transitie naar proefdier vrije innovatie. Het begrip 'innovatie' zal breed worden geïnterpreteerd en ook betrekkingen hebben op strategieën in beleid, wet- en regelgeving en onderzoek. Daarbij wordt de indeling voor Technologie Transitie gehanteerd op basis van het multilevel perspective. In het multilevel perspective wordt een onderscheid gemaakt tussen 3 niveaus: macro-; meso- en micro-niveau. Het macro-niveau vertegenwoordigt het regime van mondiale of continentale infrastructures, inzichten of samenwerkingen. Het meso-niveau gaat uit van het wet- en regelgeving regime, van kennisstructuren en internationale organisaties. Het micro-niveau tenslotte is het niche niveau waarin nieuwe ontwikkelingen of inzichten tot 'rijping' komen.

Aanbevelingen die in het onderstaande worden gedaan hebben betrekking op de COVID-19 pandemie, maar de reikwijdte zal hieraan overstijgend zijn.

Waar mogelijk zullen getrokken lessen worden voorzien van voorstellen richting de minister om de transitie naar proefdier vrije innovatie te bevorderen. Deze voorstellen includeren nadrukkelijk ook preventie van proefdiergebruik in mogelijk volgende pandemieën.

---

<sup>40</sup> How many animals are used for SARS-CoV-2 research? Schwedhelm P. et al. EMBO Reports 2021: <https://doi.org/10.15252>

## 4.1 Macro-niveau

### 4.1.1 One-Health

One Health is de stroming in de medisch-biologisch gemeenschap die uitgaat van samenhang en verbinding tussen mens, dier en natuur. Veranderingen in de ene categorie zullen consequenties hebben voor een andere categorie en onderzoek en aanpak zullen derhalve een multidisciplinair karakter moeten hebben.

COVID-19 is een zoönose, dat wil zeggen een ziekte die van dier op mens kan worden overgebracht. Bij bepaalde zoönotische aandoeningen zal de mens de ziekte niet verder verspreiden zoals bij Q-koorts. Bij deze ziekte wordt de ziektekiem van schaaap/geit op de mens overgedragen maar niet van mens op mens. Dit ligt anders bij zoönotische ziekten als influenza en ook COVID-19 waarbij mens op mens besmettingen optreden. Het SARS-CoV-2 virus is inmiddels in diverse diersoorten aangetoond<sup>41, 42</sup> waaronder nerts, fret, kat, hond, vleermuis, kip, varken en hamster.

Er bestaat geen directe link tussen One Health en proefdiergebruik maar wel een indirecte. Het voorkomen van een pandemie neemt de noodzaak weg om grote aantallen dieren te gebruiken voor de ontwikkeling van therapeutica en profylactica.

Pandemieën vinden onder andere hun oorsprong in de manier waarop we dieren houden en benutten<sup>43</sup>. Aspecten die in dit verband worden genoemd zijn ontbossing en klimaatverandering waardoor wilde dieren naar bewoonde gebieden worden verdreven, het nauw samenleven van mens en dier in sommige culturen en intensieve veehouderij. Dit maakt dat potentiële ziektekiemen zich snel kunnen vermeerderen en zich door ons reisgedrag in korte tijd over de wereld kunnen verspreiden. Pandemieën op basis van een zoönose zijn niet altijd te voorkomen maar de kans daarop kan wel verkleind worden door een aanpak van de milieuproblematiek, een verandering in de omgang met dieren en aanpassingen van onze levensstijl. Dit alles zou ondersteund moeten worden door aangescherpte mondiale monitoringsystemen voor potentieel zoönotische ziektes (pandemische paraatheid). Een organisatie die ervaring heeft opgebouwd met pandemische paraatheid is de World Organization for Animal Health (OIE)<sup>44</sup>, onder andere bij zoönotische influenza pandemieën. Investerings in pandemische paraatheid systemen zijn aanzienlijk maar zullen uiteindelijk in het niet vallen tegen de kosten van een pandemie.

*Nederland is één van de voorlopers geweest van de One-Health gedachte. De minister wordt gevraagd het belang van One Health en daarmee van duurzame en structurele oplossingen om pandemieën te voorkomen uit te blijven dragen. Tevens wordt de minister gevraagd zich in multinationale samenwerkingsverbanden te blijven inzetten voor pandemische paraatheid*

*In het kader van de pandemische paraatheid heeft het kabinet in het coalitieakkoord een investeringsbedrag van 180 miljoen Euro opgenomen voor 2022, oplopend tot 300 miljoen Euro in 2026<sup>45</sup>. De minister wordt gevraagd zich te beijveren een deel van deze investering te bestemmen voor de ontwikkeling van innovatieve proefdiervrije instrumenten voor monitoring, preventie en profylaxe.*

<sup>41</sup> OIE, COVID-19. [www.oie.int](http://www.oie.int)

<sup>42</sup> Animal Models and Resources for Coronavirus Research. National Institutes of Health (NIH), Office of Research Structure. [www.orip.nih.gov](http://www.orip.nih.gov)

<sup>43</sup> Laaser U. One Health for One Planet: How to address 21<sup>st</sup> century education challenges. Business Environment, Health, Policies & Foreign Affairs. SDG Series, Society, Impakter. October 6, 2021.

<sup>44</sup> World Organization for Animal Health (OIE). COVID-19. [www.oie.int](http://www.oie.int)

<sup>45</sup> Rijksoverheid. Budgettaire bijlage coalitieakkoord, 15 december 2021.

### 4.1.2 Vaccin R&D

De urgentie van de COVID-19 pandemie heeft grote druk gelegd op de ontwikkeling van een vaccin of geneesmiddel, vooral bij de industrie. Daarbij werd vaak gebruik gemaakt van platform technologieën die ontwikkeld zijn in een academische setting. Technologieën zijn vervolgens door de industrie ingezet voor de ontwikkeling van virusspecifieke vaccins en de optimalisatie en productie-opscaling daarvan. Vooral problemen bij dit laatste aspect leidt nogal eens tot vertragingen in de opleverdatum van een nieuw vaccin.

De cijfers van de WHO COVIN-19 vaccine tracker laten zien dat er op 3 februari 2022 acht vaccins geregistreerd zijn, daarnaast loopt klinisch onderzoek op 153 potentiële vaccins en verkeren 196 vaccins in het stadium van preklinisch onderzoek. Alle vaccins zijn globaal gesproken terug te voeren op 11 typen productie platformen, waaronder de RNA, DNA en subunit vaccins. Tussen de in ontwikkeling zijnde vaccins zitten verschillen in de keuze van het antigeen, de formulering, de toedieningsroute, gebruik van een adjuvant, etc. Ook de problematiek van virus mutaties heeft zijn weerslag op de ontwikkeling van nieuwe vaccins en vraagt om vaccins op basis van geconserveerde antigenen, dat wil zeggen virus antigenen die bij alle COVID-19 virusmutanten aanwezig zijn. De druk op de ontwikkeling van een veilig en effectief vaccin verklaart echter niet de hoeveelheid vaccins waaraan gewerkt wordt. Het is aannemelijk dat naast het aspect volksgezondheid daarbij ook economische en nationale belangen een rol gespeeld hebben. Vaccinontwikkeling kan nog niet zonder proefdiergebruik is de mening van vaccindeskundigen. De veelheid aan vaccins die in ontwikkeling zijn hebben geleid tot omvangrijk diergebruik. Uit een onderzoek in het VK naar de acceptatie van proefdiergebruik voor COVID-19 onderzoek kwam naar voren dat een meerderheid van de geënquêteerden burgers het gebruik van dieren acceptabel vond maar moreel wel problematisch. Of, zoals een van de geïnterviewde treffend verwoordde: *"Because I can accept it, doesn't mean that I like it"*<sup>46</sup>

Mondiaal heeft de WHO een coördinerende rol in het COVID-19 onderzoek op zich genomen, onder andere door middel van de BluePrint groep, maar ook in de ontwikkeling van vaccins en geneesmiddelen. Deze rol wordt vormgegeven in een samenwerking met andere mondiaal opererende organisatie zoals de Coalition for Epidemic Preparedness Innovations (CEPI). CEPI<sup>47</sup> wordt door een aantal landen ondersteund, waaronder Nederland. Een andere mondiale organisatie die actief is op vaccinontwikkeling is Gavi<sup>48</sup>, een samenwerking op het gebied van vaccins tussen de WHO, UNICEF, de Wereld Bank, Bill & Melinda Gates Foundation, private vaccinontwikkelaars en donorlanden. Gavi richt zich vooral op Derde Wereldlanden. In een ideale situatie zouden deze mondiale organisaties, een 'selectie aan de poort' moeten kunnen maken van vaccinontwikkeling, dit op basis van behoefte, ontwikkel-concept en veronderstelde meerwaarde ten opzichte van andere producten. Onderkend wordt dat dit inbreuk doet op het vrije markt denken en dat dit vrije markt denken innovatie sturend kan zijn.

Vanuit de optiek van snelle vaccinontwikkeling is een benadering interessant die naar voren is gebracht door Anthony Fauci<sup>49</sup>, Directeur van het US National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Zijn voorstel is om voor 20 virusfamilies, die mogelijk een pandemie kunnen veroorzaken, een prototype vaccin te ontwikkelen, te testen op veiligheid en effectiviteit en de condities voor grootschalige productie te realiseren. In geval van een pandemie kan het prototype vaccin in korte tijd worden aangepast aan de veroorzakende ziektekiem. Dit vaccin zou vervolgens op basis van minimale additionele data door regulatoire autoriteiten kunnen worden geregistreerd, waarna de productie in zeer korte tijd kan worden opgeschaald.

---

<sup>46</sup> [www.understandinganimalresearch.org.uk](http://www.understandinganimalresearch.org.uk)

<sup>47</sup> [www.CEPI.net](http://www.CEPI.net)

<sup>48</sup> [www.gavi.org](http://www.gavi.org)

<sup>49</sup> Kahn L. Future pandemics : act now or pay more later – How One Health and prototype vaccines shift the odds. Health, Politics & Foreign Affairs, Science, Society. Impakter, October 6, 2021

*In het kader van restrictief proefdierbeleid wordt de minister gevraagd zich via de nationale contacten met organisaties als WHO, CEPI en Gavi in te zetten voor een afstemming en coördinatie van vaccinontwikkeling.*

*De minister wordt verzocht na te laten gaan of een benadering waarbij voor een aantal virusfamilies prototype vaccins worden ontwikkeld ook voordelen biedt in termen proefdiergebruik, dit in de context van technische en praktische haalbaarheid.*

## 4.2 Meso-niveau

### Beoordeling & registratie

In het interim-rapport werd aangegeven dat het toepassen van een niet sequentiële benadering van het preklinisch en klinisch onderzoek, het beoordelen van deeldossiers bij binnenkomst bij het COVID-19 onderzoek (de 'rolling review') en de conditional licencing geleid heeft tot een versnelling van het beoordelingstraject. Uit aanvullende interviews is gebleken dat deze benadering ook beperkingen kent en nuancering behoeft. De argumenten die in dit verband worden genoemd staan beschreven in Tabel 6.

Dit alles maakt dat de versnelling van het beoordelingsproces consequenties heeft voor budgetten. Introductie van een versnelling wordt daarmee een politieke keuze; namelijk de bereidheid om voor aanvullende financiering te zorgen.

Voor wat het proefdiergebruik betreft geldt dat een sequentiële benadering als zodanig niet zal leiden tot een vermindering van dit gebruik. Het preklinisch onderzoek zal noodzakelijk blijven, maar wordt in de tijd herverdeeld.

Dat laat onverlet dat er andere mogelijkheden zijn om tot een vermindering in het proefdiergebruik te komen, dit zowel op meso-niveau als op micro-niveau.

Een gouden en wettelijk vastgelegde standaard binnen de ontwikkeling en productie van vaccins en geneesmiddelen is dat een nieuw product veilig en effectief dient te zijn. Nergens is vastgelegd dat dit op basis van dierexperimenteel onderzoek moet. In de research en preklinische fase hebben ontwikkelaars de mogelijkheid om die methode(n) te gebruiken die als meest relevant wordt of worden gezien. Ondanks het feit dat er op diverse vlakken van het onderzoek gebruik gemaakt wordt van proefdiervrije methoden, zoals van analytische methoden, blijft de default het uitvoeren van standaard dierstudies. Deels begrijpelijk omdat het diermodel weliswaar beperkingen kent maar altijd nog meer informatie geeft dan de proefdiervrije benadering. Maar deels is de terughoudendheid ook ingegeven door onzekerheid over en/of angst voor mogelijke verborgen valkuilen bij het niet uitvoeren van de dierproef, met andere woorden 'de angst van loslaten'. Dit zou ook kunnen gelden voor het uitvoeren van een studie in NHPs voorafgaand aan de eerste klinische studies ('First in Human'). Mogelijk illustratief is het feit dat alle vaccins in tabel 4 van de bijlage Analytische methoden in NHPs zijn getest. Op basis van een retrospectieve analyse van ingediende aanvragen voor klinische studies bij de CCMO en dossiers bij beoordelingsautoriteiten (CBG/EMA) zou inzicht verkregen kunnen worden in de bijdrage van gebruikte dierstudies op de uiteindelijke beslissing door CCMO om klinische studies uit te voeren en bij de beoordeling van dossiers door de registratie autoriteiten. Omdat de verantwoordelijkheid van dossierbeoordeling en productregistratie onder het ministerie van VWS valt, is samenwerking met en sturing van dit ministerie noodzakelijk.

*Uitgangspunt van het beoordelingsproces is bewezen veiligheid en effectiviteit van het nieuwe vaccin of geneesmiddel. In deze context valt het te betwijfelen of beoordeling via de (kostbare) rolling review benadering minder dierexperimenteel onderzoek vereist dan via de gebruikelijke sequentiële benadering. Meer is te verwachten van een studie naar de relevantie van bestaande dierstudies (hieronder) en naar het gebruik van tijdbesparende proefdiervrije methoden (zie 4.3.2.)*

*De minister wordt gevraagd, om in overleg met het ministerie van VWS gelden beschikbaar te maken voor het uitvoeren van een retrospectieve analyse over de waarde en beperkingen van standaard dierstudies in de research fase en het preklinisch onderzoek van vaccins en geneesmiddelen.*

*Belangrijke factoren voor de toepassing van proefdiervrije methoden in het wettelijk voorgeschreven onderzoek is het voeren van een beleid dat gericht is op de ontwikkeling van deze methoden, de acceptatie hiervan door nationale en internationale controle autoriteiten en de mondiale harmonisatie van testrichtlijnen.*

*In dit verband wordt de minister gevraagd zich, via bestaande kanalen, in te zetten voor een sturend beleid, onder andere bij organisaties als de World Health Organization (WHO), de European Medicines Agency (EMA) of de Europese Pharmacopee (Ph.Eur.).*

## 4.3 Micro-niveau

### 4.3.1 Vaccin Platform

Sinds de introductie van het eerste vaccin door Jenner (pokkenvaccin), eind 18<sup>e</sup> eeuw is vaccinontwikkeling geëvolueerd. De klassieke vaccins zijn gebaseerd op de inactivatie of attenuatie van het micro-organisme of op detoxificatie van het toxine dat door het micro-organisme wordt geproduceerd. Voorbeelden van geïnactiveerde vaccins zijn het hondsdolheid vaccin en het kinkhoestvaccin, geattenueerde vaccins zijn bijvoorbeeld het mazelen en bof vaccin en voorbeelden van toxoid vaccins zijn het tetanus- en difterie-vaccin. Sinds de jaren 70 van de vorige eeuw zijn de subunit eiwit vaccins ter beschikking gekomen. Bij deze vaccins worden alleen de onderdelen (antigenen) van een micro-organisme gebruikt die belangrijk zijn voor het opwekken van immuniteit. Voorbeelden hiervan zijn het acellulaire kinkhoestvaccin, het hepatitis B vaccin en het pneumococcon vaccin. De nieuwste generatie vaccins, zoals de mRNA vaccins en vector vaccins bij COVID-19) maken gebruik van moleculairbiologische technieken welke eind vorige eeuw zijn ontwikkeld.

De gegevens over het proefdiergebruik in de EU laten zien dat grofweg 10% van alle proefdieren wordt ingezet voor de ontwikkeling, productie en controle van biologische producten<sup>50</sup>. De categorie kenmerkt zich ook door het hoge percentage dieren dat ernstig ongerief ondervindt. Nadere analyse van de getallen leert dat het merendeel van de dieren wordt ingezet voor de controle op kwaliteit van routinematig geproduceerde vaccinbatches voor humaan en veterinair gebruik. Bij deze vaccins gaat het voornamelijk om de klassieke vaccins als tetanus en difterie of de clostridium vaccins voor veterinaire toepassing. Voor de nieuwe generatie vaccins geldt dat proefdieren nodig zijn in de ontwikkelingsfase maar niet of nauwelijks in de routine batchcontrole. Dit heeft alles te maken met het feit dat deze typen vaccins uitvoerig gekarakteriseerd zijn in de ontwikkelingsfase en de productie vergaand gestandaardiseerd en gemonitord wordt door middel van een set aan analytische methoden. In het kader van een reductie in proefdiergebruik is het dan ook aan te bevelen om in geval van vaccinontwikkeling in te zetten op niet klassieke methoden van ontwikkeling.

*Om het proefdiergebruik verder te kunnen reduceren wordt de minister geadviseerd zoveel mogelijk aan te sluiten bij vaccinontwikkeling op internationaal niveau, gericht op de ontwikkeling en inzet van niet klassieke methoden.*

---

<sup>50</sup> European Commission. Summary report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of European Union and Norway in 2018. 14.7.2021 SWD(2021) 204Final



#### 4.3.2 Optimalisatie van innovatieve *in vitro* methoden en aandacht voor overige proefdiervrije methoden

In bijlage 2 “Learning from COVID-19. SARS-CoV-2 and Organoid technology (Rapport Amsterdam UMC) is een overzicht gepresenteerd van innovatieve *in vitro* methoden als de organoidculturen en de micro-fluidic cultures of organs-on-a-chip. Deze methoden hebben inmiddels een plek gevonden, ook binnen het COVID-19 onderzoek. Orgaan specifieke organoids worden gebruikt voor het onderzoek naar de pathogeniteit van het virus en microfluidic-culturen van longweefsel voor het onderzoek naar de kinetiek en dynamiek van het virus. Deze methoden kennen veel voordelen waarvan de vermindering van het proefdiergebruik er een is, maar ook een reductie van kosten en onderzoekstijd. Door niet alle onderzoekers worden deze voordelen opgepakt en zal aandacht voor deze modellen noodzakelijk blijven. Een hulpmiddel daarbij kan zijn om de voordelen van robuuste en valide *in vitro* methoden inzichtelijk te maken.

Maar de methoden worden ook (nog) gekenmerkt door beperkingen. Een van de belangrijkste binnen het onderzoek op respiratoire virussen zoals SARS-CoV-2 is de beperkte integratie van immuunparameters in de *in vitro* modellen<sup>51</sup>. Deze beperkingen spelen vooral bij onderzoeksvragen waarin deze parameters essentieel zijn, zoals onderzoek naar de immunogeniteit en effectiviteit van vaccins. Het immuunsysteem is uitermate complex en omvat diverse typen immuuncellen en signaalstoffen, elk met een specifieke functie en een uitgebreid communicatienetwerk. Integratie van immuunparameters in *in vitro* methoden als microfluidic-culturen zal een moeilijke opgave zijn en een forse investering in tijd, geld en samenwerking vergen. Eerste stappen op dit terrein zijn gezet maar verkeren nog in een embryonaal stadium<sup>52</sup>. Daarnaast zijn voor veel innovatieve celkweek methoden aspecten als protocol standaardisatie en validatie van levensbelang om deze methoden aantrekkelijk te maken voor het onderzoek.

In het alternatievenbeleid van de overheid ligt de aandacht vooral bij de innovatieve celkweek modellen. Dit vertaalt zich in de financiering van proefdiervrije onderzoek dat vaak eenzijdig gericht is op ontwikkeling van deze celkweek modellen. Geconstateerd moet worden dat er, zeker in het veld van infectieziekten en de daaraan gerelateerde vaccin- en geneesmiddelenontwikkeling, minstens even veel potentie ligt bij andere proefdiervrije technieken. Meer balans en evenredigheid in de verdeling van beleidsaandacht en beschikbare middelen zou recht doen aan de belang van fysisch- en immuno-chemische technieken, mensgebonden onderzoek en *in silico* modellen voor het proefdiervrije onderzoek.

*De minister wordt gevraagd in te zetten op onderzoek naar het integreren van complexe immunologische parameters in de nieuwe generatie *in vitro* methoden.*

*Voor wat betreft bestaande innovatieve *in vitro* systemen wordt de minister gevraagd om in onderzoeksprogramma's middelen beschikbaar te stellen voor standaardisatie en validatie van deze systemen, zo mogelijk in internationaal verband.*

*Daarnaast wordt de minister gevraagd om de beleidsaandacht en middelenverdeling voor proefdiervrij onderzoek naast de innovatieve celkweeksystemen ook te richten op andere technieken en methoden. Daarbij kan onder andere gedacht worden aan de analytische technieken, mensgebonden onderzoek en *in silico* technieken.*

<sup>51</sup> Bartfeld S. Realizing the potentials of organoids – an interview with Hans Clevers. *Journal of Molecular Medicine* (2021), 99: 443-447

<sup>52</sup> Bar-Ephraim Y.E., Kretzschmar K and Clevers H. Organoids in immunological research: Review. *Nature Reviews/Immunology* (2020), 20: 279-293.

### 4.3.3 Verkorting van de onderzoeksduur

In de landen van Europese Unie zijn aan het uitvoeren van dierexperimenteel onderzoek voorwaarden verbonden. Art. 36 van Directive 2010/63/EU on the Protection of animals used for scientific purposes<sup>53</sup> schrijft voor dat projecten met dierstudies alleen mogen worden uitgevoerd als ze geautoriseerd zijn door een bevoegde autoriteit. In Nederland is dit de Centrale Commissie Dierproeven (CCD). Autorisatie berust op een ethische afweging van de belangen van de dieren (aantasting integriteit, ongerief) versus het belang (wetenschappelijk, maatschappelijk, economisch) van het onderzoek. Dit afwegingsproces vergt tijd en wordt om die reden soms aangevoerd als rem om snel op biomedische problemen zoals de COVID-19 pandemie in te spelen<sup>54</sup>. In zijn algemeenheid zijn er echter geen aanwijzingen dat dit het geval is geweest. Integendeel. Vergelijkbaar met de toetsing door de CCMO voor wat betreft klinische studies en voor de dossierbeoordeling door het CBG is ook door de CCD prioriteit gegeven aan de beoordeling van projecten die betrekking hadden op COVID-19 onderzoek, dit met inachtneming van de zorgvuldigheid in toetsing.

Het zijn voor wat betreft het dierexperimenteel onderzoek niet zozeer de administratieve handelingen van CCD die het moeilijk maken in zeer korte tijd tot onderzoeksresultaten te komen maar meer de logistiek van het onderzoek (planning, beschikbaarheid dieren) en de lengte van het onderzoekstraject (onderzoek op effectiviteit van een vaccin door middel van een dierproef vergt al snel enkele maanden, onderzoek naar duur van de immuniteit meer dan 6 maanden) dat vertragend werkt. Kenmerk van veel proefdiervrije methoden is dat ze in kortere tijd veel onderzoeksdata genereren. Analytische methoden vergen veelal maar enkele dagen, *in vitro* methoden enkele weken. Daarnaast is voor gebruik van deze proefdiervrije methoden geen autorisatie procedure nodig wat additionele tijdwinst oplevert. Mede om deze redenen wordt de urgentie voor de ontwikkeling van proefdiervrije methoden breed gedeeld<sup>55</sup>.

*De verkorting van de onderzoekduur zal voornamelijk gerealiseerd moeten worden door de inzet van snellere testmethoden. Daarbij gaat het vooral om proefdiervrije methoden, zowel in vitro als analytisch. De minister wordt geadviseerd te investeren in de ontwikkeling, optimalisatie en validatie van deze methoden.*

---

<sup>53</sup> Council Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific procedures. Document 32010L0063, 22 September 2010.

<sup>54</sup> Genzel Lisa et al. How the COVID-19 pandemic highlights the necessity of animal research. *Current Biology* (2020), 30: 1014 – 1018.

<sup>55</sup> OECD. Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP). PECD Series on Testing and Assessment. OECD Publishing, 2018. Doi.org/101787/9789264304796-en

#### 4.3.4 Delen van onderzoeksgegevens

De COVID-19 pandemie heeft geleid tot een wereldwijde aandacht voor het virus, de ziekte veroorzaakt door het virus, de gevolgen van de ziekte en voor preventie en therapie. De tijd sinds het begin van de pandemie tot het verschijnen van dit advies is in termen van onderzoekduur extreem kort geweest. Gezien het grote aantal wetenschappelijke publicaties die er vanaf januari 2020 verschenen zijn moet er overlap zijn geweest in onderzoek hetgeen voor dubbeling van onderzoek heeft gezorgd maar waarschijnlijk ook dat een deel van de lopende studies ingehaald zijn door voortschrijdend inzicht.

Dit onderschrijft het belang van een andere systematiek voor informatieverspreiding, niet langs de tijd-intensieve weg van peer review, terugkoppeling en aanpassing van een manuscript voor publicatie maar een portaal voor onderzoekresultaten die (open science) gedeeld worden met het veld. In ons land heeft de Organisatie voor Natuurwetenschappelijk Onderzoek (NWO) het voortouw genomen in de transitie naar open science. NWO ziet open science als een beweging die staat voor een meer open en participatieve onderzoekspraktijk waarbij publicaties, data, software en andere vormen van wetenschappelijke informatie in een zo vroeg mogelijk stadium gedeeld worden en voor hergebruik beschikbaar gesteld worden<sup>56</sup>

In zekere zin is deze aanzet gevolgd door de WHO Blue Print group, waarbij in een community van onderzoekers uit verschillende gremia onderzoeksresultaten werden gedeeld en besproken in wekelijkse online bijeenkomsten. Vergelijkbaar in opzet maar meer gericht op samenwerking is het project CIAO van het EURL-Joint Research Centre (zie ook 2.5.). Dergelijke initiatieven verdienen ondersteuning waarbij vooraf goede afspraken moeten worden gemaakt over het 'brengen' en 'halen' van informatie.

---

<sup>56</sup> NWO. Open Science. [nwo.nl](https://www.nwo.nl)

## Dankwoord

Het NCad maakt bij het opstellen van haar adviezen dankbaar gebruik van experts uit binnen- en buitenland. Ook worden belanghebbenden en ketenpartners geconsulteerd. De geraadpleegde experts zijn geen co-auteurs van dit NCad-advies en kunnen op bepaalde punten een mening hebben die afwijkt van hetgeen het NCad in dit advies presenteert. Dit advies is tot stand gekomen met een bijdrage van de volgende experts en organisaties:

L. Bastos MSc PhD, Eurogroup for animals  
Laure-Alix Clerbaux, Scientific Project Officer of the European Commission at JRC  
C. Desaintes, PhD at the European Commission  
Prof. dr. J.M.A. van Gerven, neuroloog-klinisch farmacoloog, voorzitter CCMO  
dr. Gribaldo Laura, Scientific Officer of the European Commission at JRC  
dr. B. L. Haagmans, viroloog, Erasmus MC  
P. Hawkins BSc PhD, RSPCA  
Prof.Dr. J.L. Hillege, CHMP  
M. Hoefnagels, PhD, CBG  
J. de Jonge, PhD, Viral immunologist, IIV, Cib, RIVM  
dr. J.W. van der Laan, CBG, SWP/EMA  
Prof. J.A.M. Langermans, PhD, BPRC  
R. Levis, PhD, FDA  
Prof. dr. A.D.M.E. Osterhaus, viroloog  
Prof. dr F.R. Rosendaal, Hoogleraar Klinische Epidemiologie LUMC, Lid CCMO, Voorzitter NFU-commissie CoCon  
Prof. dr. J.A. Stegeman, UU  
dr. E. van de Steeg, Senior Scientist Human Cell Biology & DMPK  
P. Vermeij, Merck,  
B. Verstrepen, PhD  
L. de Waal PhD, art.9, Sr. Study Director

Bijlage 1

# **COVID-19 vaccine development and characterisation: animal models and analytical methods**

The potential of analytical methods to reduce, refine & replace animal use

M.F.M. Ketelaars  
G.F.A. Kersten  
August 2021 – November 2021  
Leiden University

## Abstract

**Background.** Standard vaccine development takes several years, but during the SARS-CoV-2 pandemic we have seen lightning-fast product development. This was possible because of parallel execution of clinical and preclinical assessment, and commercial production 'at economical risk'. It gives rise to new questions on what we can learn from this pandemic about vaccine development and quality control.

**Aim.** The aim of this paper is to gather all relevant literature on COVID-19 vaccines in development to provide an overview of the analytical methods used in vaccine development and their potential and limitations in replacing of animal models. Moreover, the role of these methods in SARS-CoV-2 vaccine development and their contribution to reduction, refinement or replacement of animal use will be investigated. Finally, developments in analytical characterisation that may affect animal use in the coming years will be discussed.

**Introduction.** Vaccines are a heterogeneous product group that are difficult to characterise, and their mechanisms of action are not always fully understood. Hence, each candidate vaccine needs a specific set of analytical methods to characterise and test it. Numerous analytical methods are available that could be part of a set of immunochemical and physico-chemical assays to improve the characterisation without the frequent use of long lasting, expensive, or inaccurate functional immunogenicity studies, partly done in animal models.

**Findings.** Analytical characterisation techniques used for COVID-19 vaccines were not different from other new generation vaccines, nor did they contribute to reduction of animal use. The SARS-CoV-2 vaccine development as such did not lead to extensive use of new analytics or new characterisation technology, mainly due the urgency of the pandemic which urged scientist to use existing and accepted techniques, rather than using innovative but less established methods. It is expected that the mRNA and vector platforms will be further developed and increasingly applied. The availability of proven vaccine platform technology with respect to safety, efficacy and technical robustness likely will lead to shorter development time for future vaccines and potentially reduced animal use.

**Conclusions and perspectives.** The analytical toolbox is not expected to change dramatically or replace animal studies soon. Platform technology, highly reproducible manufacturing methods, extensive in vitro characterisation and functional assays may allow for animal free development of vaccines, but this is a long way off. Adaptive immunogenicity cannot be measured in vitro because of the complexity of the immune system. Besides that, animal studies are mandated by regulatory agencies in order to minimize risks during first in human studies. More is expected from better use of the employed animal or human models. Improved analysis of the immune response by applying proteomics and other omics technologies and multi-analyte assays can provide more information from less animals. Human challenge models could measure protection under controlled conditions. Guaranteed product quality using robust analytics could enable these developments since better characterised products increase product knowledge and reduce risks of unexpected events in early clinical development.

Keywords: in vitro characterisation; vaccine development; animal models; COVID-19 vaccines



## Introduction

Standard vaccine development is a long process that includes multiple sequential phases. To ensure optimal quality (potency, safety, and stability) and to comply with regulations, the quality control strategy is of crucial importance. In vitro and in vivo studies are used to characterise the vaccine product and to analyse the immunogenicity, before the vaccine can proceed into clinical trials (European Medicines Agency (EMA), 2020).

During the SARS-CoV-2 pandemic we have seen lightning-fast product development. While traditionally it took years or decades to produce an efficacious and safe vaccine, a global united effort has led to the conditional marketing authorisation of several vaccines within just over a year. The unprecedented speed of these vaccines can partially be credited to the parallel execution of clinical trials and preclinical assessment as well as commercial production 'at economic risk', i.e. preparations for vaccine production, including the construction of manufacturing sites and actual production of bulk vaccine under Good Manufacturing Practices. Although all mandatory steps for market authorisation have been executed for all licenced vaccines, this gives rise to new questions on what lessons can be learned from this pandemic about vaccine development and quality control.

There are five main vaccine categories in the global effort to combat SARS-CoV-2: protein subunit vaccines (including virus like particles), DNA & RNA vaccines, vector vaccines, inactivated vaccines, and live attenuated vaccines. In this report, the latter will not be discussed since the number of live attenuated COVID-19 vaccines is very limited. The WHO keeps an overview of all COVID-19 vaccines in clinical and preclinical development (WHO, 2021b).

Vaccines are a highly heterogenous product group that are often difficult to characterise when compared to other protein-based biologics. The large diversity of pathogens makes vaccines a very diverse product group of which the different mechanisms of action are not always fully understood. Hence, each candidate vaccine needs its own specific set of analytical methods to accurately define it and test its quality (Metz et al., 2009). The selection of these methods depends on the required information and nature of the vaccine. There are now numerous analytical methods available that could potentially be part of a set of immunochemical and physico-chemical assays to improve the characterisation by fingerprinting of the product without the frequent use of long lasting, expensive, or inaccurate functional (in vivo) immunogenicity studies and thus increase effectivity of vaccine development.

To find out what lessons can be learned from the application of characterisation techniques in COVID-19 vaccine development, how animal models were used, and to further investigate what the potential of in vitro assays is in replacing animal studies, literature on the development of COVID-19 vaccines was studied. The Vaccine Tracker by the WHO served as a starting point for relevant literature (WHO, 2021b). For each vaccine category, four vaccines were selected that were in the most advanced stage of research on August 3<sup>rd</sup>, 2021. The clinical and preclinical reports were gathered from ClinicalTrials.gov and PubMed (Dai et al., 2020a; S. G. Smith, Smits, Joosten, Van Meijgaarden, et al., 2015a). Since the vaccines were still in development, once weekly, the WHO Vaccine Tracker was screened for updates and additional searches were carried out if necessary. Due to the vast amount of literature on the subject and the continuous publication of new material during the project, this is not a

systematic review. Also, analytical methods are often used as tools and marginally described. In literature databases papers using certain methods and assays are hard to find in a systematic way. And finally, only a relatively small fraction of the vaccine development work is reported; industry is usually reluctant to disclose data which may have impact on their position relative to competitors. Literature was collected until December 1<sup>st</sup>, 2021. From the identified literature, an overview of all reported characterisation assays and animal models was made. In some cases, not all information was published. For example, for one vaccine that has proceeded to phase III, no animal studies have been reported. Moreover, routine quality control tests were possibly not performed, available or reported because they were considered of minor importance at the time of reporting, potentially causing underreporting. Also, some information is proprietary knowledge.

Using full analytical capacity to improve the characterisation and quality control of vaccine further could potentially help to reduce, refine, and replace animal studies. Animal studies are still considered as valuable tests by many vaccine developers and regulators. There is a wide variety of available animal models, but their potential to be predictive for performance in humans is not clear in the case of emerging infectious diseases such as COVID-19. In this review, the use of non-animal analytics in COVID-19 vaccine development is evaluated. Also, drawbacks and opportunities for each available animal model are discussed and their predictive value towards human responses is evaluated.

The objective of the report is to shed light on the following questions:

- Which analytical methods are used in vaccine development and what potential and limitations do these methods have in replacement of animal models?
- What was the role of these methods in SARS-CoV-2 vaccine development and did these methods contribute to reduction or replacement of animal use?
- In the coming years, what developments in analytical characterisation are expected that may affect animal use?

## List of abbreviations

AF4	Asymmetrical flow field-flow fractionation
API	Active pharmaceutical ingredient
AUC	Analytical ultracentrifugation
BAL	Bronchoalveolar lavage
BALB-c mouse	Immunodeficient laboratory-bred strain of the house mouse
BLI	Biolayer interferometry
c-EM	Cryogenic electron microscope
CE	Capillary electrophoresis
CPE	Cytopathic effect
DLS	Dynamic Light Scattering
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
EM	Electron microscope
GMT	Geometric mean titre
hACE2	Human angiotensin-converting enzyme 2
IEF	Isoelectric focusing
IgG	Immunoglobulin G
LC-MS	Liquid-chromatography/mass spectrometry
LNP	Lipid nanoparticle
MALS	Multi-angle Light Scattering
NAb	Neutralising antibody
NHP	Non-human primate
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
QC	Quality control
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RBD	Receptor binding domain
S-protein	SARS-CoV-2 Spike protein
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC-HPLC	size exclusion chromatography
SPR	Surface plasmon resonance
UV	Ultraviolet
UV/Vis	UV–visible spectrophotometry
VNT	Virus neutralisation titre

## Overview of studied vaccines

Table 1. Overview of the studied vaccines. Vaccine group, WHO Tracker ID number, name and developer are shown (WHO, 2021a).

Vaccine group	ID	Vaccine name	Vaccine developer
<b>Protein subunit</b>	#11	ZF2001	Anhui Zhifei Longcom Biopharmaceutical
	#21	VAT00002	Sanofi Pasteur + GSK
	#28	SCB-2019	Clover Biopharmaceuticals Inc./GSK/Dynavax
	#8	SARS-CoV-2-S	Novavax
<b>DNA/RNA</b>	#10	BNT162b2	Pfizer/BioNTech
	#15	INO-4800	Inovio Pharmaceuticals
	#39	ArCoV	Academy of Military Science (AMS), Walvax Biotech.
	#9	mRNA-1273	Moderna
<b>Vector</b>	#25	GRAd-COV2	ReiThera + Leukocare + Univercells
	#4	ChAdOx1nCov-19	AstraZeneca + University of Oxford
	#5	Ad5 v. COVID Vacc.	CanSino Biological Inc./Beijing Institute of Biotech.
	#7	Ad26.COVS.2	Janssen Pharmaceutical
<b>Inactivated</b>	#1	CoronaVac	Sinovac Research and Development Co., Ltd
	#19	BBV152	Bharat Biotech International Limited
	#2	SinoPharm-1	Sinopharm
	#3	BBIBP-CorV	Sinopharm

## 1.1 Product characterisation

Product characterization is defined here as non-animal testing of the product, either drug product or intermediate products like drug substance. It provides mainly information about the chemical and physical state of the product. These methods do not a priori provide information about functional properties of the antigen or vaccine, i.e. potency and safety. For these latter characteristics in vivo data are needed (animal or human) or an assay with a proven and validated correlate with biological activity.

### Electrophoresis & Western blotting

Electrophoresis is used to assess protein or RNA/DNA composition and integrity. With respect to protein antigens, it can give information on covalent modifications and size, as well as the isoelectric point, purity and aggregation and degradation of a protein (Metz et al., 2009). This includes detection of glycosylation and the presence of charge variants in protein antigen. In vaccine development, generally four types of electrophoresis can be distinguished: capillary electrophoresis (CE), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), isoelectric focusing (IEF) and 2d-electrophoresis (2d-E), the latter combining IEF and PAGE, i.e., charge and size-based separation. IEF and 2d-E were not reported in the identified literature while PAGE was frequently described. CE was only reported once, for the characterisation of DNA/RNA vaccines. Vogel et al. (2021) describe the use of microfluidic CE to determine the purity and integrity of the SARS-CoV-2 RNA in the BNT162b1/2 mRNA vaccines. By comparing the CE peaks to the calculated lengths of the RNA, the method can be used to confirm purity and integrity of the mRNA.

More commonly described in COVID-19 vaccines is PAGE. Most virus and protein based COVID-19 vaccines undergo (SDS-)(PAGE) at some point during their development. Different modes can be used to analyse proteins. Native, non-reducing to assess non-covalent protein interactions and apparent size based on protein folding or sodium dodecyl sulfate treated and chemically reduced PAGE, assessing molecular weight of individual proteins. Western blotting using SDS-PAGE and detection with antigen-specific antibodies can be used to confirm the identity of separated proteins, like the SARS-CoV-2 S-protein and RBD structures used in subunits protein vaccines (Dai et al., 2020b; Liang et al., 2021; Tian et al., 2021). In DNA/RNA vaccines it can also be used to verify the expression (in vitro, as a quality control (QC) test) of the desired antigens, such as the SARS-CoV-2 RBD (Vogel et al., 2021). In vector vaccine development western blotting is also used to confirm the expression of desired antigens. To do so, in vitro, cells are infected with the vector. Subsequently, cells are lysed, proteins are separated on gel and using labelled antigen-specific antibodies, mRNA gene product is detected (Capone et al., 2021; Q. Guo et al., 2018; Mercado et al., 2020). Finally, western blotting can also be used in inactivated vaccines to identify epitopes such as S1 and S2, RBD and N proteins (Ganneru et al., 2020; Gao et al., 2020). Scanning densitometry can be used to measure the density of electrophoresis bands and therefore serves, in this case, as a sequential step to electrophoresis to obtain semi-quantitative data. It was used once in the identified literature, to determine the purity of the S-protein in a protein subunit vaccine (Tian et al., 2021).

### Chromatography

Chromatographic techniques, such as size exclusion chromatography (SEC-HPLC) and ion exchange chromatography, are commonly used in the production (purification) of vaccines

and were regularly reported in the literature. Because these methods rely on size- and charge based separation respectively, they are also regularly used in combination. Such tools can also be used in QC to verify the purity, but this application was scarce in the identified literature. SEC-HPLC was the only chromatographic method that was used for the characterisation of the COVID-19 vaccines. SEC-HPLC can be used to study the active pharmaceutical ingredient, but also particular delivery systems for the API such as lipid nanoparticles (LNPs). SEC-HPLC can be used to determine the purity, integrity, and stability of the product. By analysing the fraction of proteins at specific molecular weights, it is possible to determine the relative amount of protein in a vaccine (Cao et al., 2021; Vogel et al., 2021). This is only useful for simple protein mixtures because SEC-HPLC lacks specificity for more complex protein mixtures. Apart from analysing physical integrity of proteins, RNA/DNA, or delivery systems, using SEC-HPLC, the complete protein composition of the vaccine can be detected and quantified. This includes for example specifically cleaved S-proteins in a subunit vaccine (Liang et al., 2021). Liang et al. motivated the choice of their S-protein subunit vaccine candidate by demonstrating it was cleaved at the S1/2 junction, which is similar to the cleaving of wild type SARS-CoV-2 S-Trimer. S1/S2 cleavage is necessary to prepare the S-protein for membrane fusion. This is the only example from the identified literature of this application of SEC-HPLC.

### *Spectroscopy*

The field of spectroscopy covers a broad range of techniques that are important in determining protein and nucleic acid concentration, protein higher order structure (UV, fluorescence, circular dichroism). This is important since the recognition sites of antibodies (B-cell epitopes) often depend on conformation of protein antigens. Moreover, techniques such as light scattering techniques (DLS, MALS, UV/vis) and imaging techniques (EM) give information on size, number and structure of nanoparticles such as virus-like particles, lipid nanoparticles as well as detection and quantification of unwanted (protein) aggregates which may form during manufacturing or storage. Spectroscopic methods and cryo-EM can confirm the structure of proteins in candidate vaccines, which is an important step in vaccine characterisation as well as in batch verification.

### *UV absorbance spectroscopy*

UV absorbance spectroscopy is a quantitative technique that is used to determine protein concentration, especially in protein subunit vaccines (Guirakhoo et al., 2020; Sanyal et al., 2021). Today, direct particle counting techniques, such as nanoparticle tracking analysis (NTA) based on light scattering, are available (Filipe et al., 2010), but were not reported yet in the identified literature. UV Absorbance spectroscopy can be used to measure protein concentration at 280 nm and RNA at 260 nm. Absorbance spectroscopy at wavelengths above 300 nm (UV/Vis), in contrast, can be applied to detect protein aggregates. UV/Vis was used once, to measure the total number of viral particles in an adenovirus-vectored vaccine (S. Wu et al., 2020). The total number of viral particles can be calculated from the UV absorbance assay using the method described by Maizel et al. (1968), who determined that, for adenoviruses, there are  $1.1 \times 10^{12}$  particles per OD<sub>260</sub> unit.

### *Electron microscopy (EM) based techniques*

Cryogenic EM (c-EM) has proven to be a valuable tool in early SARS-CoV-2 research, since it was used to determine the structure of the full trimeric S-protein in detail. Current cryo-EM technology and imaging software enables the assessment of the structure of proteins as



detailed as more conventional X-ray diffraction, but without the need to produce crystals, which is more complicated and potentially introduces artefacts. Using Cryo-EM, Wrapp et al. gathered crucial information on SARS-CoV-2's differences with other corona viruses and the conformation of its RBD, providing a promising starting point for the rapid development and evaluation of medical countermeasures against the virus (Wrapp et al., 2020). c-EM gives detailed information on the conformation of, for example, the S-protein and its RBD trimers. The S-protein exists in different conformations: a prefusion and postfusion state. This refers to the membrane fusion that is necessary for the virus to enter the host cell. Furthermore, in the prefusion conformation the monomers (three per intact S-protein) can have an 'open' or 'closed' conformation in which the receptor is in accessible or inaccessible states, respectively. For vaccines, a closed prefusion state must be maintained (Xiong et al., 2020). Hence, c-EM can validate the shape, size and integrity of inactivated vaccines (Gao et al., 2020) and subunit vaccines. Additionally, by determining the structure of antigen/antibody complexes, useful information on the binding process and epitope availability can be obtained, which is important in understanding the impact of novel SARS-CoV-2 strains on for instance vaccine efficacy (Cao et al., 2021). Lastly, this method can be used to determine the morphology of lipid nanoparticles and confirm the presence of RNA based on this morphology (N. N. Zhang et al., 2020).

Like c-EM, negative-stain transmission electron microscopy (TEM) can be used to verify the size and shape of viral particles and identify its spikes in subunit and inactivated vaccine candidates (Ganneru et al., 2020; Meyer et al., 2020; Vogel et al., 2021; Wang et al., 2020). Moreover, visualisation of receptor and antibody binding and structural analyses can confirm if antigens in vaccine candidates are as accessible as in live virus (Liang et al., 2021; Vogel et al., 2021). This is crucial information because the visualisations of S-protein, associated (or not) with inactivated virus or virus like particles can guide predictions on stability and immunogenicity. Other methods to assess structural elements in SARS-CoV-2 vaccines that were described in the identified literature included atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) (Hanifehnezhad et al., 2020).

#### *Dynamic Light scattering*

Dynamic light scattering (DLS) is a technique that measures the fluctuations in scattered light by molecules or particles between 1 and 1000 nm in size, as determined by their Brownian (random) motion. Subsequently, the nanoparticle diffusion coefficient is calculated which can be used to determine the hydrodynamic diameters of the particles (Caputo et al., 2019). In COVID-19 vaccines it is mainly used to define the size of nanoparticles (<1000 nm) or proteins (N. N. Zhang et al., 2020). Moreover, based on the polydispersity index, the distribution of size between proteins (Tian et al., 2021) and nanoparticles can be compared. Also, light scattering techniques can be used to monitor non-specific protein aggregation in VLPs (Sanyal et al., 2021).

Furthermore, the application of DLS is important in mRNA vaccines because mRNA is delivered via LNPs. The size is a critical parameter because it can have impact on the in vivo processing and as a result on immunogenicity (Hassett et al., 2019; Sanyal et al., 2021). Furthermore, most vaccines are subject to a 0.2 µm sterile filtration step and a mean particle size of above 150 nm can be detrimental to product recovery. An advantage of DLS is that it requires no accurate knowledge of the sample concentration, but only values of the solvent viscosity and

temperature (Wyatt Technology Corporation, n.d.). While DLS is also relatively inexpensive and simple in use, it should not be used as the only method for characterisation of complex products, because it has a relatively low resolution. An important disadvantage is its inability to distinguish between small aggregates and large proteins and it cannot produce reliable measurements in the presence of plasma proteins (Caputo et al., 2019). These problems can be overcome by using other sizing techniques such as Nano Tracking Analysis or first separating the suspension based on size, such as SEC-HPLC or Asymmetrical flow field-flow fractionation (AF4).

#### *Other spectroscopic methods*

Circular dichroism is a method that can be used to study protein conformation (Michiels et al., 2020; Sanyal et al., 2021). In the identified literature on COVID-19 vaccines, however, no application of circular dichroism was found. Similarly, fluorescence spectroscopy, that can be used to study protein folding and higher order structures, was not found in the identified literature. Nuclear magnetic resonance & infrared were also not reported.

#### *Analytical ultracentrifugation*

Analytical ultracentrifugation (AUC) is a technique for the quantitative analyses of macromolecules and particles in a solution. AUC is not often applied because of the cost of the equipment and expertise that is necessary to conduct these analyses. It works well on heterogeneous samples and characterises solutions in their biologically relevant conditions. The technique has two distinct applications: sedimentation velocity, which gives information on the size and shape of molecules and particles, and sedimentation equilibrium, which gives for example information on solution stoichiometries (relationship between the quantities of reactants and products in reactions) and association constants between macromolecules, such as antigen and antibodies (Cole et al., 2008). In COVID-19 research, AUC was used to determine and compare the weights of stabilized (tandem repeat single chain) RBD dimer of MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV-2 (Dai et al., 2020b). Dai et al. used this in their strategy to design vaccines against COVID-19 and SARS.

#### *Immunochemical assays for antigen characterisation*

##### *ELISA*

Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) is an immunochemical technique that can be widely applied, e.g., for analysis of antigens as well as measuring antibody responses in serum (see section 1.2). In the context of vaccine development, it is in the first place used to determine antigen concentrations, binding specificity, and for epitope identification (Liang et al., 2021; Richmond et al., 2021). In protein subunit and inactivated vaccine candidates for example, the reactivity and specificity of S-protein and RBD based subunit vaccines to hACE2 were tested using ELISA (Cao et al., 2021; Tian et al., 2021). These analyses showed that the vaccine proteins bound specifically to hACE2 with higher affinity than wild type SARS-CoV-2. In mRNA vaccines, RBD expression in vitro can be determined by ELISA (N. N. Zhang et al., 2020).

##### *Biosensors*

Biosensor analyses can give more insight in the binding kinetics between virus particles or viral antigens and receptors or antibodies to determine epitope integrity. Biosensors are also used to measure antigen concentration as an alternative for ELISA type of antigenicity assays.

Biolayer interferometry (BLI) is one example of a biosensor analysis. It is a label-free technology for measuring biomolecular interactions. It consists of a protein coated biolayer surface to which analytes bind, becoming immobilised. The interference pattern of light reflected from these two layers is analysed in real time, allowing accurate measurement of binding specificity, rates of association and dissociation, or concentration with precision and accuracy.

BLI was an important tool in early SARS-CoV-2 research. It was used to compare the binding affinities of SARS-CoV-2 and SARS-CoV viral structures to the hACE2 receptor and helped identify the most important binding sites of the SARS-CoV-2 Spike protein (Casalino et al., 2020; Walls et al., 2020). Walls et al. assessed if the most important binding sites from the SARS-CoV (F. Li et al., 2005) were conserved in SARS-CoV-2. This way, they found eight positions that are key for S/ACE2 binding that were strictly conserved between the two viruses. Casalino et al. used BLI to identify important sites that are essential for the recognition of the ACE2 receptor by SARS-CoV-2 (Casalino et al., 2020). They compared the binding kinetics of the wild-type SARS-CoV-2 with a recombinant virus where glycans were deleted at 2 positions. BLI confirmed that the deletion of the glycans resulted in a decrease in ACE2-binding. Similarly, BLI was used to determine the binding affinity of vaccine candidate S-proteins, S-Trimers and RBDs to hACE2 (Liang et al., 2021; Robbiani et al., 2020; Tian et al., 2021; N. N. Zhang et al., 2020). These papers mention higher or similar affinity when compared to wild type viral proteins.

Surface plasmon resonance (SPR) is another label-free biosensor analysis that is similar to BLI but uses refractive index changes at the binding surface to study antigen binding to surface-immobilized antibodies at the sensor surface. Because the refractive index change depends on the mass that is bound to the sensor, SPR is especially useful for the analysis of proteins and high-abundance samples (Singhal et al., 2010). An advantage of the SPR technology is the ability to screen several proteins in parallel because the sensor contains four flow cells (Navratilova & Hopkins, 2010). SPR has been used to determine the binding kinetics between antibodies and SARS-CoV-2 RBD (Dai et al., 2020b; Du et al., 2020; Vogel et al., 2021). SPR results showed that the RDB-sc dimer of Dai et al. had comparable but slightly higher binding affinity to its receptor than the RBD monomer. SPR is a highly sensitive method, but changes in the refractive index caused by solution flowing over the sensor, make it susceptible to interference. The risk of interference is lower for BLI, but compared to SPR, it is not as sensitive (Shah & Duncan, 2014).

### Other methods

Mass spectrometry is a technique that measures the charge-to-mass-ratio of ions. Liquid-chromatography/mass spectrometry (LC-MS) is a related method that combines separation (by LC) with mass spectrometry. It allows for unambiguous protein identification and quantification of molecules. Hence, it was used to determine the N-terminus of the S-protein in a vector vaccine (Bos et al., 2020) and the quantification of lipids in an mRNA vaccine (Hassett et al., 2019).

Peptide sequencing via Edman degradation is a method to sequence peptides by breaking it down, one amino acid at a time. It was described only once in the identified literature and was used to confirm the desired S1/S2 cleavage in a protein subunit vaccine (Liang et al., 2021).

Flow cytometry is a conventional technique that can be used for a wide variety of applications. For a vector vaccine, it was used to assess transgene antigenicity of the Ad26 vector with five DNA constructs (Bos et al., 2020). Patel et al. conducted a flow cytometry-based assay to study the ACE2 receptor binding of the SARS-CoV-2 Spike protein (2020). Apart from T-cell response, Vogel et al. also used flow cytometry to confirm RBD expression by transfected cells and for vaccine antigen detection (2021).

## 1.2. Characterisation of the immune response

An essential step in vaccine development is demonstrating its potency. In some cases, e.g., live concepts such as attenuated vaccines and vector vaccines, the potency correlates with the amount of viable virus. In the development phase this is often not yet clear and in vivo dose-response studies are needed. Also, in vivo studies are still needed to analyse the immune mechanism in detail with respect to innate, antibody and T-cell responses. Ideally, also the protection against the pathogen is measured. Since this is rather difficult, there are numerous other methods to measure the immune response as induced by a vaccine. These assays include serological assays to measure antibodies as well cell-based assays. Proper use of these assays is highly important both in the context of animal studies in vaccine development as well as in clinical trials. To develop and select only the most relevant and appropriate assays is important in order to minimize expensive and time consuming animal studies (NC3Rs, 2020). Here, we discuss the most important techniques and assays to characterise the immune response. An overview of the assays used per vaccine is provided in **Table 2. Overview of assays used to characterise the immune response against SARS-CoV-2 virus, by vaccine group and vaccine.** This table represents the assays that were reported. If an assay was not reported – for any reason – this does not mean that it was not done.

### Antibody ELISA

As previously mentioned, ELISA is an important tool in the characterisation of vaccine, but in vaccine development ELISA is equally important for serological analysis. It is frequently used for the detection of antigen-specific (SARS-CoV-2 S-protein or RBD) antibodies after immunisation with the experimental vaccines or in SARS-CoV2 infected patients (Amanat et al., 2020). In early phases, usually, the sera of vaccinated mice or non-human primates and convalescent patients are used for these experiments (Gary et al., 2021; Liang et al., 2021; Yadav, Ella, et al., 2021). In later phases, the same principle is applied using human sera from (early) clinical trials (Cao et al., 2021; Stephenson et al., 2021; Yang et al., 2021; Y. Zhang et al., 2021).

Other studies demonstrated the potential of an ELISA based neutralisation assay as an additional assay to determine the immune status of COVID-19 infected or vaccinated individuals (Meyer et al., 2020). This is a serological assay to detect immunodominant neutralizing antibodies that target the SARS-CoV-2 S-protein. The principle of the test is based on antibody-mediated blockage of the ACE2/RBD interaction that takes place in an ELISA plate well (Tan et al., 2020). In such a surrogate neutralisation assay, no live SARS-CoV-2 is needed, which is an important advantage compared to regular neutralisation assays.

### Chemiluminescence immunoassay

Chemiluminescence immunoassay (CLIA) is a highly specific technique to measure antibody binding. It has a wide dynamic range, high degree of automation and the ability to run many antibody tests, including different isotypes. The addition of enhancers like ferrocyanide leads to exceptional analytical sensitivity which is superior to methods like ELISA (Cinquanta et al., 2017). CLIA was used for one vaccine candidate, where it was used in clinical studies to measure IgG binding to S1-S2 (Lanini et al., 2021).

### Bead-based (multiplex) immunoassays

Luminex multiplex assays can simultaneously detect and quantitate multiple proteins, such as antibodies with different antigen specificities, cytokines and growth factors, or expressed genes. This high-throughput technology produces results comparable to conventional assays such as ELISA and qPCR, but potentially with greater efficiency and throughput (Thermo Fisher Scientific, 2021). Also, less material is needed, and assay variability is reduced because many analytes (e.g., cytokines) are measured in one sample using mixtures of beads functionalized with different ligands (e.g., anti-cytokines). The Luminex assay was used to detect relative quantity of antigen-specific antibody titres in pre-clinical studies for a vector vaccine candidate (Mercado et al., 2020; Tostanoski et al., 2020). Secreted cytokines from

**Table 2. Overview of assays used to characterise the immune response against SARS-CoV2 virus, by vaccine group and vaccine.** Assays that were applied in both clinical and animal studies are marked <sup>1</sup>, those only in clinical studies are marked <sup>2</sup> and those that were only used in animal studies are marked <sup>3</sup>.

	ID	Antibody assays		Cellular response		Histology	References
		ELISA	NA	ELISpot	ICS		
<b>Protein subunit</b>	8	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>3</sup>	(Guebre-Xabier et al., 2020; Madhi et al., 2021; Tian et al., 2021)
	11	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>3</sup>	(An et al., 2021; Dai et al., 2020b; Yang et al., 2021; N. N. Zhang et al., 2020)
	21	X <sup>2</sup>	X <sup>2</sup>		X <sup>2</sup>		(Goepfert et al., 2021)
	28	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>	(Liang et al., 2021; Richmond et al., 2021)
<b>DNA &amp; RNA</b>	15	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>	(Gooch et al., 2021; Patel et al., 2020; T. Smith et al., 2020; Tebas et al., 2021)
	39	X <sup>3</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>3</sup>		X <sup>3</sup>	(N. N. Zhang et al., 2020)
	9	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>		X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	(Chu et al., 2021; Corbett, Flynn, et al., 2020; Jackson et al., 2020)
	10	X <sup>3</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	(Frenck et al., 2021; Sahin et al., 2020; Vogel et al., 2021; Walsh et al., 2020)
<b>Vector</b>	25	X <sup>3</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>	X <sup>3</sup>	(Agrati et al., 2021; Capone et al., 2021; Lanini et al., 2021)
	7	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	(Mercado et al., 2020; Sadoff, Le Gars, et al., 2021; Stephenson et al., 2021; Tostanoski et al., 2020)
	4	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	X <sup>3</sup>	(Folegatti et al., 2020; Marsh et al., 2021; van Doremalen et al., 2020; Voysey et al., 2021)
	5	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>		(S. Wu et al., 2020; Zhu, Guan, et al., 2020; Zhu, Li, et al., 2020)
<b>Inactivated</b>	1	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>2</sup>		X <sup>3</sup>	(Cao et al., 2021; Gao et al., 2020; Y. Zhang et al., 2021)
	2	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>				(Al Kaabi et al., 2021; Duan et al., 2020; Fischinger et al., 2019; W. Guo et al., 2021)
	3		X <sup>1</sup>			X <sup>3</sup>	(Al Kaabi et al., 2021; Wang et al., 2020)
	19	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>3</sup>	(Ganneru et al., 2020; Mohandas et al., 2021; Yadav, Ella, et al., 2021)

Note. Vaccine ID corresponds with the ID numbers from table 1 and are derived from the WHO Vaccine Tracker (WHO, 2021b). Abbreviations: ELISA = Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay; NA = neutralisation assay; ELISpot = enzyme-linked immune absorbent spot; ICS = intracellular cytokine staining.

mice vaccinated with an mRNA vaccine were also measured and analysed using the multiplex bead-based Luminex assay (Corbett, Edwards, et al., 2020). Another multiplex assay by the same producer was used to measure concentrations of cytokines is the ProcartaPlex multiplex immunoassay, which was also used in a preclinical study (Vogel et al., 2021).

Using the Cytometric Bead Array (CBA), cytokines as a function of innate immunity activation by inactivated antigens and adjuvants were measured (Yadav, Ella, et al., 2021). CBA allows, for example, for the identification of the critical role of IFN $\alpha$  in both the antiviral and proinflammatory cytokine functions and linking the innate immunity to the adaptive immunity (Ganneru et al., 2020). These types of assays increase our understanding of the mechanism of action of vaccines. This is mandatory for regulatory approval. These assays only need small sample quantities and usually produce many high-quality data. This results in better understanding of the immune mechanism of vaccines, which allows for a more informed decision to move to clinical development. In addition, small blood samples are needed which makes it possible to use these analytics in clinical studies enabling better comparison with results from preclinical studies.

### Neutralisation assays

Although immunoassays like antibody ELISAs are important to assess the immunogenicity of a vaccine, they do not provide information about the functionality of the antibodies. To further investigate this, their ability to neutralize the virus can be determined in vitro using a virus neutralisation assay. The advantage of this approach is that there is no need to challenge susceptible animals with infectious virus. Moreover, these assays can be used in experimental animals that are not susceptible to the virus, but nevertheless will produce an antibody response when in contact with the virus.

A conventional type of neutralisation assay is based on the cytopathic effect (CPE). CPE can be studied using replication competent virus or using pseudoviruses. Replication competent virus yields better and more easily reproducible results but using live SARS-CoV-2 requires biosafety level 3 laboratories. The practical limitations of these laboratories can be partially overcome using pseudoviruses in biosafety level 2 laboratories (Riepler et al., 2021). To assess the potency of a vaccine candidate, sera from vaccinated animals or humans are diluted and incubated with SARS-CoV-2 or pseudovirus (Chen and Zhang Int J Biol Sci 2021). Subsequently, Vero E6 cells are added and incubated. Virus replication will result in CPE (Tian et al., 2021). CPE was also used to verify the inactivation process in inactivated vaccine candidates, since the absence of CPE proves the absence of live virus (Ganneru et al., 2021). While CPE can be used to gather information on various important characteristics, the method is inherently slow. It can take up to a week to produce definitive indications of CPE (Sanyal et al., 2021).

Another method for detecting neutralising antibodies is the plaque reduction neutralisation assay (PRNT). In this assay, virus-antibody interaction occurs on a microtiter plate after which the antibody effect on viral infectivity is measured. The destruction of cells that are infected by the virus leads to visible a plaque (absence of cells) that can be detected in a variety of ways. The plaques are counted and the reduction of these plaques due to antibody presence can be used as a measure of neutralisation. A disadvantage of the all virus neutralisation assays is that they are labour intensive and takes time to conduct, making it less suitable for high throughput research (the Department of Immunization Vaccines and Biologicals, 2014).



Nonetheless, it yields valuable information, hence PRNT was broadly used in the preclinical and clinical phases of COVID-19 vaccine research. In all types of vaccine candidates, it was described at least once in the identified literature, in most cases to assess the neutralisation capacity of the vaccine and to measure the neutralising antibody titres (Gooch et al., 2021; T. Smith et al., 2020; S. Wu et al., 2020; Yadav, Ella, et al., 2021). In several cases, complementary to PRNT for the detection of neutralizing antibodies, ELISA was used to detect binding antibodies (W. Guo et al., 2021; Tebas et al., 2021). Lanini et al. also reported using the PRNT to detect neutralising antibodies and found that this technique was considerably more sensitive than a microneutralization assay based on CPE. Moreover, they conclude that the lack of standardised assays for vaccine performance complicates the comparison between COVID-19 vaccines that are in development (Lanini et al., 2021). This was also reported by Yang et al. (2021).

There is a variety of similar (micro)neutralisation assays that are comparable to PRNT. Folegatti et al. used PRNT and a microneutralisation assay to assess the reduction of microplaques after immunizing humans with the ChAdOx1 nCoV-19 vector vaccine (2020). This method was also used for the detection of neutralising antibodies in the development of a subunit vaccine and a DNA vaccine in non-human primates and ferrets (Liang et al., 2021; Riddell et al., 2021). To increase throughput as well as assay robustness, the microneutralisation assays was also performed by measuring the optical density in stained Vero E6 cells (S. Wu et al., 2020). The alternative to virus assays, pseudovirus neutralisation assays, were also often reported. This entails assays in which a replication incompetent pseudovirus is created (Nie et al., 2020). This can be done using, for example, the full SARS-CoV-2 spike protein in lentiviruses or other viruses (Capone et al., 2021; Gary et al., 2021; S. Wu et al., 2020). Often, live SARS-CoV-2 and pseudovirus neutralization assays were conducted complementary to each other, for example to determine the 50% and 90% neutralising titre (Dai et al., 2020b).

While developing an mRNA vaccine, Jackson et al. found a strong correlation between live virus and pseudovirus neutralisation assay, suggesting that – when sufficiently validated – a pseudovirus neutralisation assay has the potential to serve as a surrogate for live virus neutralisation assays (Jackson et al., 2020). These neutralisation assays give important information on the performance of a vaccine candidate. Interestingly, Amanat et al. found a strong correlation between these assays and ELISA binding results (2020).

### ELISpot

In the animal studies as well as clinical phases of vaccine development the enzyme-linked immune absorbent spot assay (ELISpot), plays an important role because it provides information on cellular responses (including B-cell responses). For ELISpot analyses, usually splenocytes are used in animal models and peripheral mononuclear cells (PBMCs) in clinical studies. It is mostly used to study the T-cell response and cytokine production in vaccinated animals or humans (Gooch et al., 2021; van Doremalen et al., 2020; Vogel et al., 2021). This method is often accompanied by intracellular cytokine staining, using flow cytometry for identification and quantification.

### Flow cytometry

A widely used assay to assess T-cell immune response is intracellular cytokine staining (ICS) followed by flow cytometry. Usually done with peripheral blood mononuclear cells from clinical studies or blood, spleen or lymph nodes from animal studies, ICS can detect immunological biomarkers in the form of expressed cytokines. An advantage of ICS over ELISpot is the ability to detect subsets of responder cells such as CD4 and CD8 T-cells and associated markers of differentiation (S. G. Smith, Smits, Joosten, Meijgaarden, et al., 2015). The method was used in all vaccine types to measure the T-cell response (Dai et al., 2020b; Ganneru et al., 2021; Gary et al., 2021; Mercado et al., 2020).

FC was used for intracellular cytokine staining analysis in numerous studies, but also to measure the SARS-CoV-2 specific cytokine production and T-cell responses (Corbett, Flynn, et al., 2020; Tebas et al., 2021; Yadav, Ella, et al., 2021; N. N. Zhang et al., 2020; Zhu, Guan, et al., 2020). Moreover, it was used to quantify INF $\gamma$  and B-cells (Corbett, Flynn, et al., 2020; Gary et al., 2021). In one study, it was used to quantify the lymphocyte percentage and blood lymphocyte subset distribution (Fischinger et al., 2019; Wang et al., 2020).

### Signs of infection and disease after challenge; histopathology

In animal studies involving challenge, a number of assays were used to measure protection. For challenge studies in non-human primates these can include body temperature and viral load from nose and rectal swabs by titration while alive (Wang et al., 2020). After euthanasia as well as for challenge studies in smaller experimental animals such as mice (using mouse adapted challenge strains), histology of the lungs was often done to detect pneumonia on tissue level (Wang et al., 2020) and in some cases to detect virus or viral RNA (N. N. Zhang et al., 2020). Since symptoms of disease are relatively mild in most experimental animals, histopathology is a relevant ex vivo assay to determine protection against disease.

### 1.3. Essential assays per vaccine type

An important aspect for implementing the 3R principle is the availability of quality indicating in vitro assays. In vitro characterisation, using a fingerprint approach, can potentially demonstrate batch consistency with no or limited use of animal studies, even in the development phase. Given the fact that during COVID-19 vaccine development, a lot of clinical studies were performed simultaneously with or before animal studies, perhaps the need for animal studies is not as evident as it used to be with more traditional vaccine and less advanced assays. In an attempt to explore this, all assays that were reported in the identified literature have been documented and can be compared between vaccine groups. Table 3 provides an overview of assays that were used for each vaccine (category). It is, however, important to note that the (lack of) reporting of assays in the literature does not mean that those were the only, or best, assays to be used.

#### Universal techniques

When looking at Table 3, two techniques can be identified as universal for the characterisation of all vaccine groups: ELISA and PAGE. These are conventional assays and give important information about the antigen concentrations, binding specificity, and the identity of epitopes and separated proteins. While the information gathered with these applications can be different for vaccine groups – Western blotting using SDS-PAGE was for example used to confirm the identity of separated proteins in subunit protein vaccines and to verify the expression of antigens in DNA/RNA vaccines – they are universally applied and would be a very good standard candidate for fingerprint sets of assays.

It is notable that very few studies in the identified literature described the use of chromatography. Since chromatographic assays are generally widely used, the absence of them in the literature might be attributed to lack of reporting, rather than a lack of application.

#### Protein subunit

In subunit protein vaccines, the target antigen and adjuvants are key attributes of vaccine quality. Hence, antigen characterisation is specifically important. This includes (SDS-)PAGE, but also immunoassays with antigen specific (preferably monoclonal) antibodies to determine antigenicity. These assays include ELISA, BLI or SPR. A correlation between antigen ELISA (antigenicity) and in vivo production of antibodies (immunogenicity) has been reported for other vaccines but needs to be established on a case-by-case basis. Apart from antigen characterisation, the adjuvant content and interaction between antigen and adjuvant, if any, are essential information. This is unique compared to the other vaccine types. In the identified literature, effects of the adjuvants were mainly assessed by in vivo comparing adjuvanted vaccine with unadjuvanted vaccine, for example by measuring ACE2 competitive titres and neutralising antibody titres (Liang et al., 2021). The adjuvant/vaccine production processes were occasionally described, but because most adjuvants are commercially available, production and characterisation of the adjuvant alone was not. In Figure 1, the key aspects of quality control for subunit protein vaccines and mRNA vaccines are shown. It shows the unique attributes of both vaccines and highlights the need to not only identify and study the final product, but also the target antigen, adjuvant, mRNA bulk and nanoparticle carrier.

**Table 3. Overview of assays used to characterise the candidate vaccine, by vaccine group and vaccine.**

	Chromatography			Immunochemical				Spectroscopy				Electroph.		FC	MS	DSC	References	
	ID	Rph	IEx	SEC	BLI	ELISA	IB	IFA	CD	TEM	cEM	FM	DLS					UV
<b>Protein subunit</b>	8				X	X				X			X		X		X	(Tian et al., 2021)
	11					X					X				X			(Dai et al., 2020b; Du et al., 2020)
	21																	-
	28			X	X					X					X		EDM	(Liang et al., 2021)
<b>DNA &amp; RNA</b>	15																	-
	39					X	X	X			X	X	X		X			(N. N. Zhang et al., 2020)
	9					X							X					(Hassett et al., 2019)
	10			X	X			X		X	X	X			X	X	X	(Vogel et al., 2021)
<b>Vector</b>	25																	-
	7				X	X									X	X	X	(Bos et al., 2020)
	4																	-
	5																	-
<b>Inactivated</b>	1			X		X												(Cao et al., 2021)
	2																	-
	3								X						X			(Wang et al., 2020)
	19								X						X			(Ganneru et al., 2021)

Note. Vaccine ID corresponds with the ID numbers from table 1 and are derived from the WHO Vaccine Tracker (WHO, 2021b). Abbreviations: Rph = reversed phase chromatography; IEx = ion exchange chromatography; SEC = size exclusion chromatography; BLI = biolayer interferometry; ELISA = enzyme linked immunosorbent assay; IB = immunoblotting; IFA = immunofluorescence assay; CD = circular dichroism; TEM = transmission electron microscope; cEM = cryogenic electron microscope; DLS = dynamic light scattering; UV = ultraviolet absorbance spectroscopy; CE = capillary electrophoresis; PAGE = (sodium dodecyl sulphate)-polyacrylamide gel electrophoresis; FC = flow cytometry; MS = mass spectrometry; EDM = Edman degradation; DSC = differential scanning calorimetry.

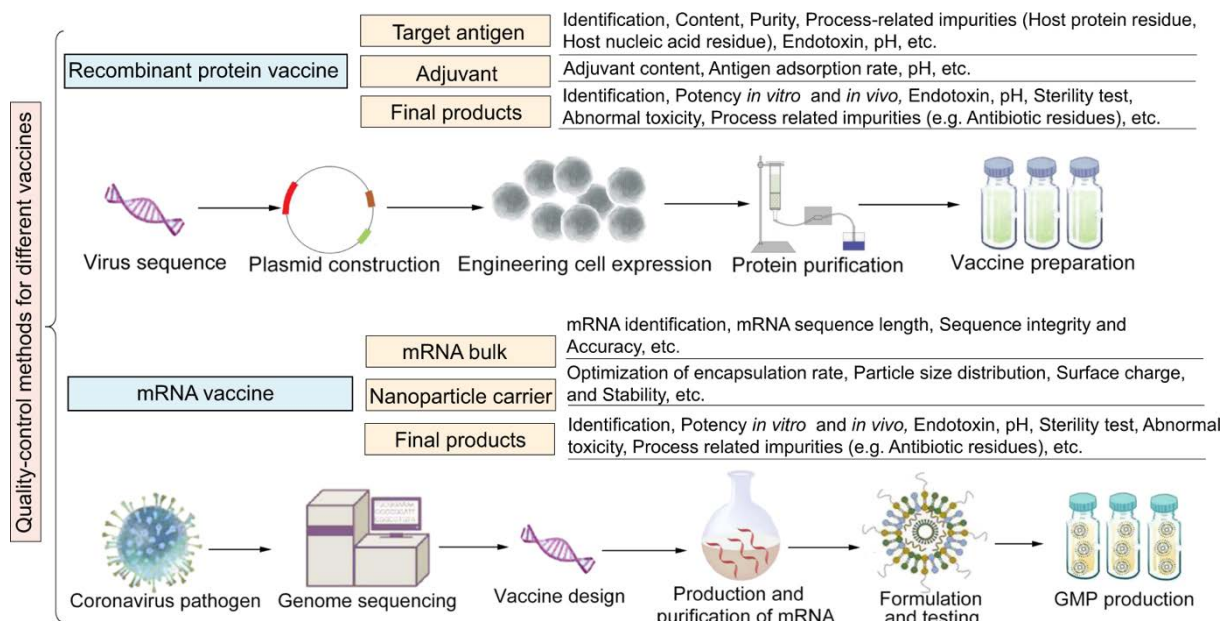


Figure 1. Reprinted from Mao et al. (2021). Key points of quality control for COVID-19 vaccines developed by different platforms.

## RNA/DNA

Because RNA/DNA vaccines are the only non-proteinaceous vaccines, their characterisation and quality control are unique. After manufacturing and formulation of mRNA into LNP, the expression of the target antigen is confirmed *in vitro*, using for example immunoblotting (N. N. Zhang et al., 2020). Subsequently, the expressed protein can be subjected to binding analyses to ensure its quality. More quality control steps include mRNA identification and verification (Mao et al., 2021). As highlighted in Figure 1, the quality of the nanoparticle carrier is also critical for the effectiveness and safety of the vaccine. In order to ensure high quality of the nanoparticles, factors like encapsulation rate, particle size distribution, surface charge, stability and immunogenicity, should be carefully considered (Mao et al., 2021). In the identified literature, researchers were often brief about these processes: “Formulations were tested for particle size, RNA encapsulation, and endotoxin. All LNPs were found to be between 50 and 142 nm in size by dynamic light scattering and with greater than 69% encapsulation and <3 EU/mL endotoxin. Lead lipids selected for further evaluation were between 66 and 107 nm, with greater than 72% encapsulation” (Hassett et al., 2019).

## Vector

Vector vaccines are dosed based on the virus titre. This makes titration especially important for this vaccine group. Moreover, the expression of the transgene is essential for vector vaccines, which can be confirmed for example by flow cytometry (Bos et al., 2020). Since most vector vaccines are replication deficient viruses, the genetic stability is especially important in this group. It is essential that the vector remains unable to replicate to ensure the safety of the vaccine. The stability is also important in ascertaining the presence of the transgene to optimise efficacy. Another unique characteristic of vector vaccines is that people (or animal models) can already have antibodies against the vector itself by natural introduction or previous vaccination with the same vector. One example of this was found in the study reported by Wu et al. in which they found a lot of participants with pre-existing immunity to

their Ad5 vector (2020). They noted that “the high pre-existing immunity did weaken the humoral and cellular immune response in some clinical trials”. With regard to the characterisation of a vaccine, this concern should be taken into account. That means that, especially with older vectors, immunogenic assays should be conducted for the vector as well as the vaccine. It is essential that neutralising antibodies against the vector do not compromise the efficacy of the vaccine.

#### Inactivated vaccines

Inactivated vaccines are produced by inactivating virulent virus. This can be done using for example heat or  $\beta$ -propiolactone (Hanifehnezhad et al., 2020; Wang et al., 2020). The verification of inactivation is of crucial importance in this vaccine group. This can be done by inoculating appropriate host cells and incubating them with the inactivated virus for several days. Absence of CPE can verify the successful inactivation of the virus. For one inactivated vaccine, it was reported that “other conventional methods were also used for characterisation of viruses required by Chinese regulatory authorities” (Meyer et al., 2020). These probably include (SDS-)PAGE, ELISA, and electron microscopy because they are important tools to verify the quality and purity of the vaccine.

## 2.1 Animal models

There are several animal models that are used in COVID-19 vaccine development. The animal model should yield sufficiently valuable and predictable data for clinical studies, hence there are some key attributes that should be considered. Firstly, in order to demonstrate protection, the animal model should exhibit relevant characteristics of the human disease after being exposed to the challenge pathogen. Also, immune markers should reflect the protective immune response that would be generated by humans and the immune response should be reflective of that in humans. Moreover, the immunological assays should be species-independent to allow for accurate predictions (Golding et al., 2018). Table 4. gives an overview of the animal models that were used for each vaccine type. In this section, these animal models will be discussed, including their advantages and disadvantages. Also, the animal models that were used as a challenge model will, if possible, be compared to other challenge models and clinical trials.

Table 4. Overview of all animal models used in the identified literature, by vaccine group and vaccine.

	ID	Rabbit	Ferret	Hamster	GP	Rat	Mouse	NHP	References
<b>Protein subunit</b>	8						X	X	(Guebre-Xabier et al., 2020; Tian et al., 2021)
	11			X			X	X	(An et al., 2021; Du et al., 2020)
	21								-
	28						X	X	(Liang et al., 2021)
<b>DNA &amp; RNA</b>	15		X		X		X	X	(Patel et al., 2020; Riddell et al., 2021; T. Smith et al., 2020)
	39						X	X	(N. N. Zhang et al., 2020)
	9					X	X	X	(Corbett, Flynn, et al., 2020; Hassett et al., 2019)
	10						X	X	(Vogel et al., 2021)
<b>Vector</b>	25						X	X	(Capone et al., 2021)
	7			X			X	X	(Bos et al., 2020; Mercado et al., 2020; Tostanoski et al., 2020)
	4						X	X	(Marsh et al., 2021; van Doremalen et al., 2020)
	5		X				X		(Q. Guo et al., 2018; S. Wu et al., 2020)
<b>Inactivated</b>	1					X	X	X	(Gao et al., 2020)
	2								-
	3	X			X	X	X	X	(Wang et al., 2020)
	19	X		X		X	X	X	(Ganneru et al., 2021; Mohandas et al., 2021)

Note. Vaccine ID corresponds with the ID numbers from the WHO Vaccine Tracker (Golding et al., 2018). For vaccine #21, no animal studies have been reported to the time of writing. Abbreviations: GP = guinea pigs; NHP = non-human primates.

### Seven models

When considering the relevance of animal models, and challenge studies specifically, it is essential to look at the predictive value they have. Ideally, an animal challenge study is 100% predictive for the effect in humans, both with respect to potency and safety. Selecting the right animal studies, however, is complicated. Different pathogens require different models, and some animals have limited availability, and some are more expensive than others. Apart from comparability to human responses, availability of the animals, costs in case less expensive animal models can be used, and availability of immunological read-outs, affect the selection. In COVID-19 vaccine development, seven animal models are generally used: non-human primates (mostly rhesus macaques), (human ACE2 transgenic) mice, rats, guinea pigs, hamsters, rabbits, and ferrets. These models are selected for various reasons, and all have their advantages and disadvantages.



The most popular animal model in COVID-19 vaccine development is the mouse. Several mouse models were used, such as the hACE2 transgenic BALB-c mice that were initially developed for SARS-CoV research. Mice, including hACE2 mice, do not develop severe COVID-19 like humans do. They do however, “developed interstitial pneumonia characterised with inflammatory cell infiltration, alveolar septal thickening, and distinctive vascular system injury, which recapitulated the clinical features in most COVID-19 patients” (Sun et al., 2020).

Apart from mice, rhesus macaques and cynomolgus macaques are most frequently used in SARS-CoV-2 infection and vaccination studies. According to Salguero et al. “both macaque species authentically represent mild to moderate forms of COVID-19 observed in the majority of the human population and both species should be used to evaluate the safety and efficacy of interventions against SARS-CoV-2” (2021). In the identified literature, rhesus macaques were used 12 times, while cynomolgus macaques were used 6 times.

The use of rats was also reported in the identified literature. They were mostly used in inactivated vaccine development and once in a protein subunit vaccine. Two types of rats were reported: Sprague – Dawley (SD) rats and Wistar rats. Rats were mainly used for toxicity studies and occasionally for humoral immunogenicity (Ganneru et al., 2021; Hassett et al., 2019). Rats are equally susceptible to SARS-CoV-2 as mice, but their larger size is a minor advantage as it allows for repetitive bleeding in experiments.

Guinea pigs have been used in the development of many vaccines, including those against influenza, tuberculosis, diphtheria, but also for Ebola research (Yadav, Sapkal, et al., 2021). Guinea pigs are especially ideal to study dermal vaccination, since, “unlike other small animal models such as the mouse, the guinea pig's skin possesses a defined epidermis” (Schultheis et al., 2017). Smith et al. observed SARS-CoV-2-S binding antibody titres and the blocking of ACE2/S protein interaction in guinea pigs after dermal vaccination with a DNA vaccine (T. Smith et al., 2020).

Syrian golden hamsters are a more permissive model for SARS-CoV-2 because their ACE2 receptor is homologous to the human ACE2 receptor, transmission between animals has been reported and they show symptoms that are similar to human COVID-19 (Chan et al., 2020; Sia et al., 2020). Moreover, research has shown that old male hamsters have a higher chance of showing signs of disease, which is comparable to humans as well (Osterrieder et al., 2020). However, the lack of research tools, such as immunologic reagents, is recognised as a major drawback. To overcome this obstacle, more antibodies and microarrays need to be developed or transgenic hamsters are needed for better evaluation of this model. CRISPR/Cas9 technologies have led to more possibilities for the latter (R. Li et al., 2018).

SARS-CoV-2 is capable of interacting with the rabbit ortholog of the ACE2 receptor (L. Wu et al., 2020), but other than that there is little literature on rabbits and SARS-CoV-2. New Zealand white rabbits were used by Ganneru et al. for a repeated dose toxicity study (2021). Male chinchilla rabbits and Japanese white rabbits were used in two immunogenicity studies (Meyer et al., 2020; Wang et al., 2020).

Ferrets are commonly used as a model animal for respiratory diseases, such as influenza, and are susceptible to SARS-CoV-2 infection, but this species does not develop severe disease.

However, SARS-CoV-2 can replicate in the upper respiratory tract of ferrets for up to 8 days and transmission between ferrets has been observed (Shi et al., 2020). Hence, ferrets are useful to study the transmission of SARS-CoV-2. By assessing the level of viral shedding, the ferret model is regarded as a relevant model for testing SARS-CoV-2 vaccine candidate safety, immunogenicity, and efficacy. It most closely models asymptomatic or mild infection in humans (Marsh et al., 2021).

It is notable that while numerous scholars have reported the urgent need to identify suitable small animal models for preclinical evaluation of COVID-19 vaccines (Chan et al., 2020; Dinnon et al., 2020; Imai et al., 2020; Ryan et al., 2021; Sia et al., 2020), they have hardly been used in the identified literature, apart from mice. A possible explanation could be that the development of these vaccines was initiated early in the pandemic, when the pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in animals such as hamsters, ferrets and guinea pigs was not extensively researched yet. On the other hand, hamsters have been used as a suitable animal model in SARS-CoV research before (Roberts et al., 2008).

## 2.2 Challenge studies

### *Macaques*

Non-human primates are the most described animal challenge model in the identified literature on COVID-19 vaccine development. They were used in 13 of the 16 vaccines that were included in this search. Rhesus macaques were used 9 times, while cynomolgus macaques were used in 5 studies. In one study, both species were used; the cynomolgus macaques were used in immunogenicity and safety studies, while the rhesus macaques were used as challenge model (Wang et al., 2020). Here, we discuss the results from the challenge studies and compare them to (relevant) results from clinical studies.

#### #10: BNT162b2 (mRNA vaccine)

Vogel et al. describe the rhesus macaques challenge study for their two mRNA vaccine candidates (in a later stage, BNT162b2 was selected over BNT162b1 because of greater tolerability with comparable immunogenicity in clinical trials) (2021). Six macaques were immunised in two dose groups for each vaccine and a control group. None of the rhesus macaques that were challenged (immunized or not) showed any signs of illness. Evidently, none of the macaques died during this challenge study. Viral RNA was not detected in any of the BNT162b2 immunised and SARS-CoV-2 challenged animals, while multiple animals in the control group had detectable viral RNA in bronchoalveolar lavage fluid. In nasal, oropharyngeal, and rectal swabs, viral RNA was detected more often in the control group than the vaccine group.

In the phase III clinical study that was described by Thomas et al., COVID-19 was established in 77 vaccine recipients and 850 placebo recipients (42.094 total participants), corresponding to a vaccine efficacy of 91,3% (2015b). So, the vaccine provides high protection against virus infection in NHP as well as protection in humans. However, these numbers are hard to compare, which is also stated by Vogel et al., “the\_2–4-year-old male-macaque challenge model is primarily a model of SARS-CoV-2 infection rather than a model of COVID-19 disease” (2021). Nevertheless, it is interesting to compare the serological data of the NHP study with clinical studies, such as the phase I study reported by Walsh et al. (2020). Vogel et al. made the comparison between macaque geometric mean antibody titres with convalescent human sera. Antibody titres in vaccinated NHP were higher as compared to human convalescent sera (2021). It could also be interesting to compare the values from the macaques to those from the phase I study by Walsh et al. Despite measuring different IgG geometric means (Vogel et al. measured the RBD-binding IgG GMT, while Walsh et al. measured the S1-binding IgG GMT), a comparison between these numbers can give a general idea of the predictive value of antibody responses and VNT in macaques. These values can be found in Figure 2 and Figure 3. The data show that responses are different (antibody titres as well as VNT are higher in NHP at 30 µg dose), but also that data cannot be compared because there are too many variables. Studies in NHP give a good impression on the potency, but not more than that.

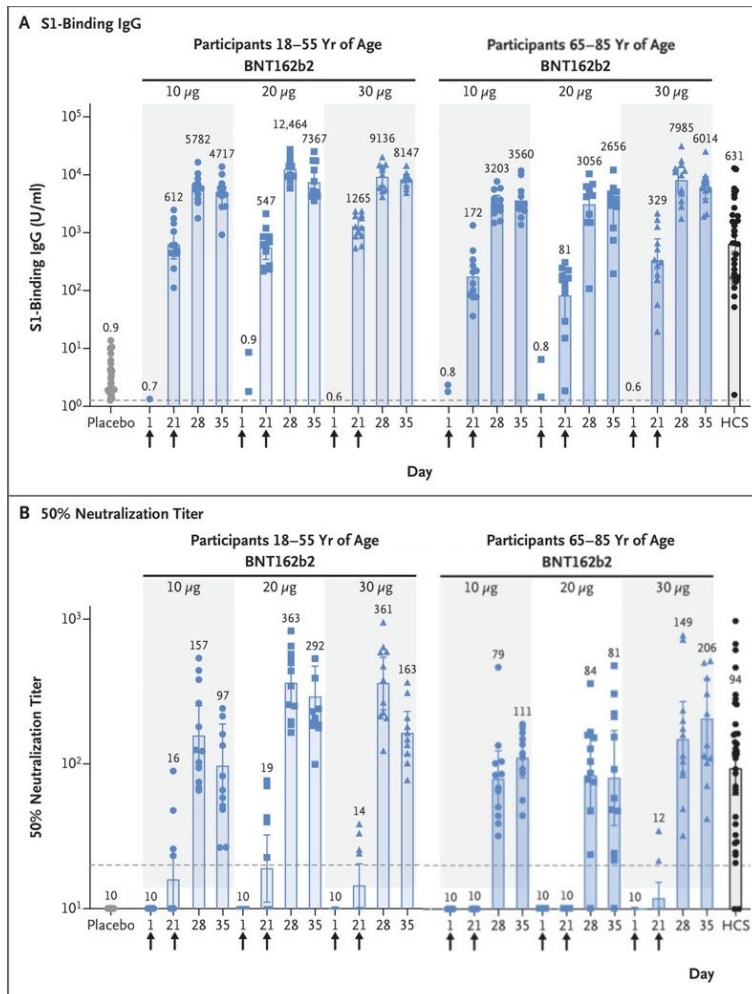


Figure 2. Immunogenicity of BNT162b2. Adapted from Walsh et al. (2020). Participants in groups of 15 received an injection with the indicated dose levels of the BNT162 vaccine candidates (12 participants) or placebo (3 participants) on days 1 and 21. Arrows indicate days of vaccination. Responses in the placebo recipients in each of the dose-level groups are combined. Serum samples were obtained before injection (on day 1) and on days 21, 28, and 35 after the first dose. The blood samples obtained on days 28 and 35 are those obtained 7 days and 14 days, respectively, after the second dose. Human coronavirus disease 2019 (Covid-19) or SARS-CoV-2 infection convalescent serum (HCS) samples were obtained from 38 donors at least 14 days after polymerase chain reaction–confirmed diagnosis and at a time when the donors were asymptomatic. Panel A shows the geometric mean concentrations of recombinant S1-binding IgG (lower limit of quantitation, 1.267; dashed line), and Panel B the 50% SARS-CoV-2–neutralizing geometric mean titres (lower limit of quantitation, 20; dashed line).

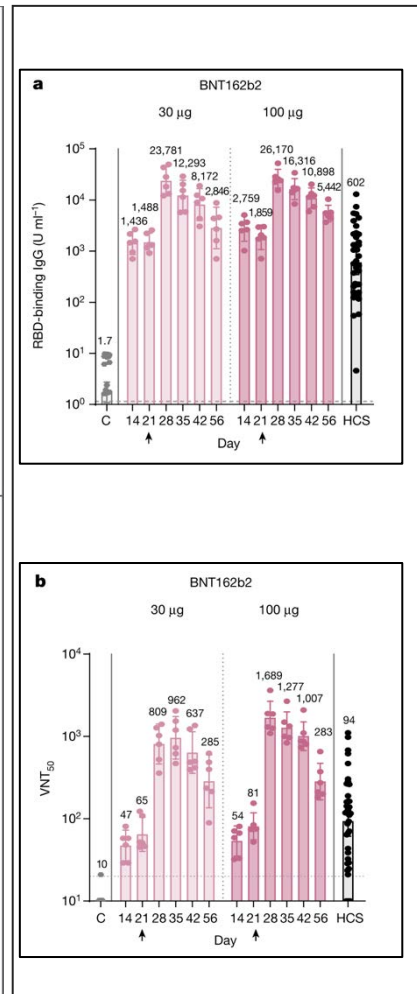


Figure 3. Macaque immunogenicity. Adapted from Vogel et al. (2021). Male macaques (2–4 years old) were injected on day 0 and day 21 (arrows below the x-axes indicate the day of second injection) with 30 µg or 100 µg BNT162b2 (n = 6 each). Additional macaques received saline (control (C), n = 9). Human convalescent sera (HCS) were obtained from patients infected with SARS-CoV-2 at least 14 d after PCR-confirmed diagnosis and at a time when acute COVID-19 symptoms had resolved (n = 38). The HCS panel is a benchmark for serology studies. a, Concentrations (in arbitrary units) of IgG that binds recombinant SARS-CoV-2 RBD (lower limit of detection (LOD) = 1.72 U ml<sup>-1</sup>). b, SARS-CoV-2 50% virus-neutralization titres (VNT<sub>50</sub>) (LOD = 20).

#### #9: mRNA-1278 (mRNA vaccine)

Rhesus macaques were also used as a challenge model for the mRNA-1278 vaccine, as reported by Corbett et al. (2020). The results are more informative about SARS-CoV-2 infection than COVID-19 disease (prevention), similar to the results that were described for the BNT162b2 vaccine.

Corbett et al. reported increased VNT (50% inhibitory dilution) between 2 weeks after first and two weeks after second vaccination (GMT 63 versus 103), but do not mention of any clinical symptoms or adverse events. Two days post challenge, one of eight macaques in the two vaccinated groups had detectable subgenomic RNA in BAL fluid, compared to all eight animals in the control group. On the same day, subgenomic RNA was detected in none of the nasal swabs from the highest dose vaccinated group and in five specimens from the lower dose. All control animals had detectable RNA in their nasal swabs. The S-specific IgG binding was 5 times higher than serum from convalescent patients, while neutralising GMT saw a 15-fold increase compared to the convalescent serum (2020). So, similar to study #10, vaccinated NHP developed higher humoral responses than infected humans.

Peak anti-SARS-CoV-2-spike binding antibodies GMT in a phase II study increased to a maximum of 239 µg/mL, while the peak level in convalescent COVID-19 patients was 48 µg/mL (Chu et al., 2021). The vaccine efficacy was 92.3% for preventing SARS-CoV-2 infection. Vaccine efficacy in preventing severe Covid-19, a key secondary end point, was 98.2% (El Sahly et al., 2021). Corbett et al. reported no evidence of viral RNA or viral antigen in the vaccinated group at day 8 after challenge (2020).

#### *Hamsters*

Non-human primates were by far the most used challenge model in COVID-19 vaccine research. However, several other models are available, and some may be better suitable. The golden Syrian hamster, for example, can be very well used as a challenge model. Unlike macaques, hamsters do develop severe COVID-19.

#### #7: Ad26.COV2.S (Vector vaccine)

The Ad26.COV2.S vector vaccine was tested in multiple animal species. Apart from mouse studies, two challenge models were used: rhesus macaques and hamsters (Mercado et al., 2020; Tostanoski et al., 2020). When comparing the results from these two challenge models, it is evident that, unlike the macaques, hamsters do develop clinical signs after challenge. Tostanoski et al. report (severe) weight loss and (partial) mortality (2020). This shows that hamsters are a better challenge model to study the protection against (severe) illness and mortality. Moreover, they found no mortality in the vaccinated group and vaccinated hamsters showed less weight loss, indicating protection against severe clinical disease as well as mortality. Vaccinated animals did lose some weight, indicating a lesser degree of protection against mild disease.

On the contrary, but in line with other research, Mercado et al. reported “minimal clinical disease” in macaques, vaccinated or not (2020). This, once again, highlights the main disadvantage of this animal model. They did, however, find no detectable virus in lung lavages in the vaccinated macaque group, whereas the control group were infected and had viral RNA in their lungs. Finally, Mercado et al. reported no increase in T-cell response after challenge in

the vaccinated group and a high increase after challenge in control animals, which “suggests minimal to no virus replication” in the vaccinated group (2020). These data are not comparable to the hamster model, as the T-cell response in hamster was not assessed. In a phase II clinical study, the majority of vaccinated participants did show an increase in T-cell activity (Sadoff, Le Gars, et al., 2021).

In the phase III clinical study, the overall efficacy of the vaccine was determined at 85.4% against severe/critical COVID-19 (Sadoff, Gray, et al., 2021). There were three deaths in the vaccine group, but none of these was COVID-19 related. So, the vaccine was safe and induced high protection against disease both in hamsters as well as in humans.

#### #19: BBV152 (Inactivated vaccine)

Mohandas et al. also reported the use of hamsters as a challenge model (2021). They observed significant weight loss in vaccinated as well as placebo groups. However, contradictory to the previously discussed hamster challenge model, Mohandas et al. did not observe any other clinical signs and no hamster met the Institutional Animal Care and Use Committee humane euthanasia criteria. SARS-CoV-2 viral genomic RNA was significantly higher in the control group than in the vaccinated group, indicating protection against infection. Mohandas et al. conclude: “Lower viral load, absence of lung pathology, and high titres of neutralizing antibodies post-infection demonstrate the protective efficacy” (2021).

The BBV152 vaccine was studied by Yadav et al. in a rhesus macaque challenge model (2021). They concluded that the vaccine has protective efficacy in the non-human primate because of “the presence of subgenomic RNA in the BAL fluid and lung tissue (at necropsy) of animals from placebo group I at 7 days post challenge and absence in the vaccinated animals”. Moreover, four out of five animals of the placebo group had detectable gRNA and sgRNA in the lungs, while all animals from the vaccinated groups had none. In the control group, Yadav et al. report clinical signs but not in the vaccinated group. The antigen specific IgG levels and neutralising antibody titres after challenge were of comparable levels between the hamster and macaque study.

The vaccine’s overall efficacy in a phase III clinical study with 24,419 participants was 77.8% and the efficacy against severe COVID-19 was 93.4% (Ella et al., 2021). Unsolicited adverse events were reported in 1.7% of the vaccinated group and 1.8% in the control group, hence “no safety concerns were raised”.

#### *Ferrets*

##### #5: Ad5-nCov (Vector vaccine)

Since ferrets do not develop severe COVID-19 like disease, they are regarded as a good way to model asymptomatic or mild infections in humans. It is known that SARS-CoV-2 can replicate effectively in the upper respiratory tract of ferrets, but not in the lungs. Wu et al. used a ferret challenge model and evaluated the protective efficacy of the Ad5-nCov vaccine in the upper respiratory tract (S. Wu et al., 2020). All vaccinated animals produced systemic S-specific IgG and virus neutralising antibodies, while control animals did not. The vaccinated group had no virus in the nose washes, in contrast to the control group. Wu et al. did not

investigate transmission between the ferrets. They did find a significant increase in T-cell activity in the vaccinated group, as compared to the control group.

In a phase II clinical trial reported by Zhu et al., a high neutralising antibody titre was found in the vaccinated cohort after 28 days (2020). 52% of the participants had pre-existing antibodies to the Ad5 vector. These participants had RBD-specific ELISA antibody and neutralising antibody levels that were approximately two-times lower than those without pre-existing immunity. The phase 3 study has not been reported yet, so vaccine efficacy is not yet known.

#### #4 ChAdOx1 nCoV-19 (Vector vaccine)

Marsh et al. report another ferret challenge study (2021). Vaccination with half the human dose led to a sharp increase in neutralising antibody levels in all animals 7 days after the second vaccination, which declined prior to the challenge. Administering a booster dose led to another sharp increase in neutralising antibodies. The vaccinated and challenged animals showed lower levels of virus shedding in nasal-wash and oral swabs than the control group. This indicates that the vaccine does not induce sterilising immunity, which is consistent with observations in humans.

Marsh et al. (2021) observed no clinical symptoms in immunised ferrets. None of the ferrets developed fever or weight loss and all animals remained alert and responsive throughout the study. Immediately following the virus challenge, two control animals that received placebo vaccination were euthanised due to a severe unexpected reaction. Moreover, several animals in the vaccinated group had acute unexpected reactions of which one was reason to euthanise. Histopathological assessment of tissues suggested an allergic reaction resulting in respiratory distress. After the first vaccination, animal in the intramuscular administration group had reliable neutralising antibody titres, while the animals in the intranasal group did not. A second vaccination led to sharp increases in neutralising antibodies for both groups. No antibodies were detected in the control group (2021).

A phase I/II study by Folegatti et al. conclude that unsolicited adverse events that were possibly related to the vaccine were mild and moderate in nature and resolved within the follow-up period (2020). In a phase III study, Voysey et al. reported two deaths in the vaccinated group, but these were considered unrelated to vaccination. The overall efficacy of the vaccine against symptomatic COVID-19 was 70.4% (2021).



## Conclusions and future perspectives

This report provides an overview of the analytics of COVID-19 vaccine concepts, published in scientific literature. Also, a brief overview of the used animal models for immunogenicity measurements is given. Given the enormous volume of studies published it is not a systematic review. Besides, it is likely that not all techniques and studies were reported because they were considered of minor importance in comparison to the overall objective of the study. Every vaccine type (e.g., mRNA, vector, subunit, inactivated, live inactivated) was and is used for SARS-CoV-2 vaccine development. Each category has its critical quality attributes and, as a result, a different set of assays is used for each vaccine type. However, substantial overlap between the groups was observed. Nonetheless, there are many valuable assays that yield a vast amount of data on stability, identity, safety, and efficacy.

The objective of the report was to address the following questions:

- Which analytical methods are used in vaccine development and what potential and limitations do these methods have in replacement of animal models?
- What was the role of these methods in SARS-CoV-2 vaccine development and did these methods contribute to reduction or replacement of animal use?
- In the coming years, what developments in analytical characterisation are expected that may affect animal use?

The first two questions were addressed simultaneously. Analytical development is progressing continuously, but it seems that the analytical toolkit used for SARS-CoV-2 vaccines is not more extensive than or as advanced as in other vaccine development projects. Perhaps it is even more conservative. This may have to do with the time pressure, leading to the use of proven technology. Even vaccines based on mRNA and viral vectors were already in development for years and have been tested in the clinic before the COVID-19 pandemic. As a result, the analytical toolbox for these vaccines was ready to use. This toolbox consisted for a considerable part of analytics which also has been used for other vaccines. For instance, chromatography, electrophoresis and particle size analysis for mRNA vaccines and virus titration for vector vaccines.

The number of animal studies performed to test SARS-CoV-2 vaccines is probably lower than for other vaccines, simply because time was lacking to perform more. In fact, in some cases animal studies were done overlapping with clinical studies. Apparently, the vaccine developers and ethical committees granting permission for clinical studies were sufficiently confident that these early clinical studies could be done with safe and potent vaccine concepts. Indeed, the animal studies that have been published, all showed that the tested vaccines were immunogenic and adverse effects were not reported. There seemed to be no need to optimise the vaccine concepts in an iterative manner; it was mostly “first time right”. We think that this is because the platforms had already been shown to be safe and often efficacious in clinical trials for other infectious diseases. The characterisation of these vaccines was excellent, but not better or different than other vaccine concepts that took longer to develop.

So, in short, the use of true vaccine platforms has led to a fast progression to clinical trials and eventually (emergency) licensing. That said, the many SARS-CoV-2 vaccine concepts that are not yet licensed may have encountered problems, such as lack of immunogenicity, production problems or stability issues. This may result in additional characterisation, both in vitro as well as in vivo. These negative results are usually not reported and probably never will be. Many

of these vaccines are not developed via a platform (except perhaps DNA vaccines) with ready-to-use and/or modular production steps but using trial-and-error approaches and may thus encounter the same problems as any other classical vaccine.

The third question was about the expected developments in the short term and long term. The SARS-CoV-2 vaccine development did not lead to extensive use of new analytics or new characterisation technology. There was no time to do so and using the existing set of analytical techniques allowed the swift development of several safe and effective vaccines. It is expected that the mRNA and vector platforms will be exploited further in a high pace. Improved, variant adapted SARS-CoV-2 vaccines are already in the clinic and many other vaccines based on these platforms are under development. The coming years, it will become clear whether SARS-CoV-2 was an easy target, and we were just lucky, or that mRNA and vector vaccines are indeed generally applicable. The analytical development will follow suit. It is expected that in the short run, the analytical toolbox will not change dramatically or replace animal studies. However, it may be possible to reduce animal testing in the case of product improvement. A thermostable mRNA formulation (e.g., lyophilized) – although this is a major change in the production process – may not need in vivo testing in animals, but a small bridging clinical trial may be sufficient. Robust in vitro characterisation, providing analytical fingerprints of vaccine batches, can guarantee product quality without the need for animal testing. An adaptation of the antigen to achieve a better match with circulating viral strains may even be possible without animal studies. For routine batch release, mRNA vaccines are a prime candidate for release procedures without the use of animals because the assays are available and the product and production process are relatively well defined.

For preclinical studies with new platform-based vaccines (such as influenza), the use of animals will depend on the type of vaccine or pathogen that is targeted. In situations less urgent than the COVID-19 pandemic, it is likely or even mandatory to do the preclinical assessment before phase I studies will start. The use of transgenic animals to have a better comparator with humans with regard to adaptive immune responses will likely increase. When safe and effective platforms are available, the focus will be on the effects of the antigen. It may be possible to assess innate immune activation with *in vitro* cell-based functional tests, but adaptive immunity can – for the time being - only be measured in intact immune systems of animals and humans because the frequency of naive B- and T-cells of a certain antigen specificity is very low and the immune system consists of many cells and molecules which interact at many different sites of the body.

On the long term, the combination of platform technology, highly reproducible manufacturing methods, extensive in vitro characterisation and *in vitro* functional assays may allow animal free development of vaccines, but this is a long way off. However, it is possible and also recommended by NGOs to do batch release on the basis of *in vitro* potency assays (Sanyal et al., 2021; WHO, 2021c). For mRNA vaccines this could be the amount of mRNA combined with an *in vitro* translation assay. For vector vaccines this could be a virus titration for viable virus and a cell based assay for the transgene expression. With respect to animal use during the development phase more is expected from better use of the employed animals or humans as model. Improved analysis of the immune response, using systems vaccinology (i.e. using transcriptomics, proteomics and network analysis to analyse wanted and unwanted vaccine responses), can provide more valuable information from less animals. Human challenge

models would allow to measure protection under controlled conditions. These developments are possible because product quality can be guaranteed using robust analytics to monitor both product and production process.

## References

- Agrati, C., Capone, S., Castilletti, C., Cimini, E., Matusali, G., Meschi, S., Tartaglia, E., Camerini, R., Lanini, S., Milleri, S., Colloca, S., Vitelli, A., & Folgori, A. (2021). Strong immunogenicity of heterologous prime-boost immunizations with the experimental vaccine GRAd-COV2 and BNT162b2 or ChAdOx1-nCoV19. *Npj Vaccines*, 6(1), 1–4. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00394-5>
- Al Kaabi, N., Zhang, Y., Xia, S., Yang, Y., Al Qahtani, M. M., Abdulrazzaq, N., Al Nusair, M., Hassany, M., Jawad, J. S., Abdalla, J., Hussein, S. E., Al Mazrouei, S. K., Al Karam, M., Li, X., Yang, X., Wang, W., Lai, B., Chen, W., Huang, S., ... Yang, X. (2021). Effect of 2 Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines on Symptomatic COVID-19 Infection in Adults: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 326(1), 35–45. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.8565>
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., Jiang, K., Arunkumar, G. A., Jurczyszak, D., Polanco, J., Bermudez-Gonzalez, M., Kleiner, G., Aydilto, T., Miorin, L., Fierer, D. S., Lugo, L. A., Kojic, E. M., Stoeber, J., Liu, S. T. H., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*, 26(7), 1033–1036. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>
- An, Y., Li, S., Jin, X., Han, J., Xu, K., Xu, S., Han, Y., Liu, C., Zheng, T., Liu, M., Yang, M., Song, T., Huang, B., Zhao, L., Wang, W., Ruhan, A., Cheng, Y., Wu, C., Huang, E., ... Gao, G. F. (2021). A tandem-repeat dimeric RBD protein-based COVID-19 vaccine ZF2001 protects mice and nonhuman primates. *BioRxiv*, 2021.03.11.434928. <https://doi.org/10.1101/2021.03.11.434928>
- Bos, R., Rutten, L., van der Lubbe, J. E. M., Bakkers, M. J. G., Hardenberg, G., Wegmann, F., Zuijdsgeest, D., de Wilde, A. H., Koornneef, A., Verwilligen, A., van Manen, D., Kwaks, T., Vogels, R., Dalebout, T. J., Myeni, S. K., Kikkert, M., Snijder, E. J., Li, Z., Barouch, D. H., ... Schuitemaker, H. (2020). Ad26 vector-based COVID-19 vaccine encoding a prefusion-stabilized SARS-CoV-2 Spike immunogen induces potent humoral and cellular immune responses. *Npj Vaccines*, 5(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-00243-x>
- Cao, Y., Yisimayi, A., Bai, Y., Huang, W., Li, X., Zhang, Z., Yuan, T., An, R., Wang, J., Xiao, T., Du, S., Ma, W., Song, L., Li, Y., Li, X., Song, W., Wu, J., Liu, S., Li, X., ... Xie, X. S. (2021). Humoral immune response to circulating SARS-CoV-2 variants elicited by inactivated and RBD-subunit vaccines. *Cell Research*, 31(7), 732–741. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00514-9>
- Capone, S., Raggioli, A., Gentile, M., Battella, S., Lahm, A., Sommella, A., Contino, A. M., Urbanowicz, R. A., Scala, R., Barra, F., Leuzzi, A., Lilli, E., Miselli, G., Noto, A., Ferraiuolo, M., Talotta, F., Tsoleridis, T., Castilletti, C., Matusali, G., ... A, V. (2021). Immunogenicity of a new gorilla adenovirus vaccine candidate for COVID-19. *Molecular Therapy*, 29(8), 2412–2423. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.022>
- Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rösslein, M., & Prina-Mello, A. (2019). Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 299, pp. 31–43). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.030>
- Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J. A., Hjorth, C. K., Dommer, A. C., Harbison, A. M., Fogarty, C. A., Barros, E. P., Taylor, B. C., McLellan, J. S., Fadda, E., & Amaro, R. E. (2020). Beyond shielding: The roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Central Science*,

- 6(10), 1722–1734. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>
- Chan, J. F. W., Zhang, A. J., Yuan, S., Poon, V. K. M., Chan, C. C. S., Lee, A. C. Y., Chan, W. M., Fan, Z., Tsoi, H. W., Wen, L., Liang, R., Cao, J., Chen, Y., Tang, K., Luo, C., Cai, J. P., Kok, K. H., Chu, H., Chan, K. H., ... Yuen, K. Y. (2020). Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9), 2428–2446. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA325>
- Chu, L., McPhee, R., Huang, W., Bennett, H., Pajon, R., Nestorova, B., & Leav, B. (2021). A preliminary report of a randomized controlled phase 2 trial of the safety and immunogenicity of mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *Vaccine*, 39(20), 2791–2799. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.007>
- Cinquanta, L., Fontana, D. E., & Bizzaro, N. (2017). Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>
- Cole, J. L., Lary, J. W., P. Moody, T., & Laue, T. M. (2008). Analytical Ultracentrifugation: Sedimentation Velocity and Sedimentation Equilibrium. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 84, pp. 143–179). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84006-4](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84006-4)
- Corbett, K. S., Edwards, D. K., Leist, S. R., Abiona, O. M., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R. A., Himansu, S., Schäfer, A., Ziwawo, C. T., DiPiazza, A. T., Dinnon, K. H., Elbashir, S. M., Shaw, C. A., Woods, A., Fritch, E. J., Martinez, D. R., Bock, K. W., Minai, M., Nagata, B. M., ... Graham, B. S. (2020). SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature*, 586(7830), 567–571. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2622-0>
- Corbett, K. S., Flynn, B., Foulds, K. E., Francica, J. R., Boyoglu-Barnum, S., Werner, A. P., Flach, B., O'Connell, S., Bock, K. W., Minai, M., Nagata, B. M., Andersen, H., Martinez, D. R., Noe, A. T., Douek, N., Donaldson, M. M., Nji, N. N., Alvarado, G. S., Edwards, D. K., ... Graham, B. S. (2020). Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *New England Journal of Medicine*, 383(16), 1544–1555. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2024671>
- Dai, L., Zheng, T., Xu, K., Han, Y., Xu, L., Huang, E., An, Y., Cheng, Y., Li, S., Liu, M., Yang, M., Li, Y., Cheng, H., Yuan, Y., Zhang, W., Ke, C., Wong, G., Qi, J., Qin, C., ... Gao, G. F. (2020a). A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 182(3), 722–733.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035>
- Dai, L., Zheng, T., Xu, K., Han, Y., Xu, L., Huang, E., An, Y., Cheng, Y., Li, S., Liu, M., Yang, M., Li, Y., Cheng, H., Yuan, Y., Zhang, W., Ke, C., Wong, G., Qi, J., Qin, C., ... Gao, G. F. (2020b). A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 182(3), 722–733.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.035>
- Dinnon, K. H., Leist, S. R., Schäfer, A., Edwards, C. E., Martinez, D. R., Montgomery, S. A., West, A., Yount, B. L., Hou, Y. J., Adams, L. E., Gully, K. L., Brown, A. J., Huang, E., Bryant, M. D., Choong, I. C., Glenn, J. S., Gralinski, L. E., Sheahan, T. P., & Baric, R. S. (2020). A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures. *Nature*, 586(7830), 560–566. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2708-8>
- Du, S., Cao, Y., Zhu, Q., Yu, P., Qi, F., Wang, G., Du, X., Bao, L., Deng, W., Zhu, H., Liu, J., Nie, J., Zheng, Y., Liang, H., Liu, R., Gong, S., Xu, H., Yisimayi, A., Lv, Q., ... Qin, C. (2020). Structurally Resolved SARS-CoV-2 Antibody Shows High Efficacy in Severely Infected Hamsters and Provides a Potent Cocktail Pairing Strategy. *Cell*, 183(4), 1013–1023.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.035>

- Duan, K., Liu, B., Li, C., Zhang, H., Yu, T., Qu, J., Zhou, M., Chen, L., Meng, S., Hu, Y., Peng, C., Yuan, M., Huang, J., Wang, Z., Yu, J., Gao, X., Wang, D., Yu, X., Li, L., ... Yang, X. (2020). Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(17), 9490–9496. <https://doi.org/10.1073/pnas.2004168117>
- El Sahly, H. M., Baden, L. R., Essink, B., Doblecki-Lewis, S., Martin, J. M., Anderson, E. J., Campbell, T. B., Clark, J., Jackson, L. A., Fichtenbaum, C. J., Zervos, M., Rankin, B., Eder, F., Feldman, G., Kennelly, C., Han-Conrad, L., Levin, M., Neuzil, K. M., Corey, L., ... Miller, J. (2021). Efficacy of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine at Completion of Blinded Phase. *New England Journal of Medicine*, 385(19), 1774–1785. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2113017>
- Ella, R., Reddy, S., Blackwelder, W., Potdar, V., Yadav, P., Sarangi, V., Aileni, V. K., Kanungo, S., Rai, S., Reddy, P., Verma, S., Singh, C., Redkar, S., Mohapatra, S., Pandey, A., Ranganadin, P., Gumashta, R., Multani, M., Mohammad, S., ... Vadrevu, K. M. (2021). Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial. *The Lancet*, 0(0). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02000-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02000-6)
- European Medicines Agency (EMA). (2020). *COVID-19 vaccines: development, evaluation, approval and monitoring* | European Medicines Agency. EMA Website. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-development-evaluation-approval-monitoring>
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27(5), 796–810. <https://doi.org/10.1007/S11095-010-0073-2>
- Fischinger, S., Fallon, J. K., Michell, A. R., Broge, T., Suscovich, T. J., Streeck, H., & Alter, G. (2019). A high-throughput, bead-based, antigen-specific assay to assess the ability of antibodies to induce complement activation. *Journal of Immunological Methods*, 473(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.07.002>
- Folegatti, P. M., Ewer, K. J., Aley, P. K., Angus, B., Becker, S., Belij-Rammerstorfer, S., Bellamy, D., Bibi, S., Bittaye, M., Clutterbuck, E. A., Dold, C., Faust, S. N., Finn, A., Flaxman, A. L., Hallis, B., Heath, P., Jenkin, D., Lazarus, R., Makinson, R., ... Yau, Y. (2020). Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*, 396(10249), 467–478. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
- Frenck, R. W., Klein, N. P., Kitchin, N., Gurtman, A., Absalon, J., Lockhart, S., Perez, J. L., Walter, E. B., Senders, S., Bailey, R., Swanson, K. A., Ma, H., Xu, X., Koury, K., Kalina, W. V., Cooper, D., Jennings, T., Brandon, D. M., Thomas, S. J., ... Gruber, W. C. (2021). Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine in Adolescents. *New England Journal of Medicine*, 385(3), 239–250. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2107456>
- Ganneru, B., Jogdand, H., Daram, V. K., Das, D., Molugu, N. R., Prasad, S. D., Kannappa, S. V., Ella, K. M., Ravikrishnan, R., Awasthi, A., Jose, J., Rao, P., Kumar, D., Ella, R., Abraham, P., Yadav, P. D., Sapkal, G. N., Shete-Aich, A., Desphande, G., ... Vadrevu, K. M. (2021). Th1 skewed immune response of whole virion inactivated SARS CoV 2 vaccine and its safety evaluation. *IScience*, 24(4), 102298. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2021.102298>
- Ganneru, B., Jogdand, H., Dharam, V. K., Molugu, N. R., Prasad, S. D., Vellimudu, S., Ella, K.

- M., Ravikrishnan, R., Awasthi, A., Jose, J., Rao, P., Kumar, D., Ella, R., Abraham, P., Yadav, P., Sapkal, G. N., Shete, A., Desphande, G. R., Mohandas, S., ... Vadrevu, K. M. (2020). Evaluation of Safety and Immunogenicity of an Adjuvanted, TH-1 Skewed, Whole Virion Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine - BBV152. *IScience*, 2020.09.09.285445. <https://doi.org/10.1101/2020.09.09.285445>
- Gao, Q., Bao, L., Mao, H., Wang, L., Xu, K., Yang, M., Li, Y., Zhu, L., Wang, N., Lv, Z., Gao, H., Ge, X., Kan, B., Hu, Y., Liu, J., Cai, F., Jiang, D., Yin, Y., Qin, C., ... Qin, C. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, 369(6499), 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
- Gary, E. N., Warner, B. M., Parzych, E. M., Griffin, B. D., Zhu, X., Tailor, N., Tursi, N. J., Chan, M., Purwar, M., Vendramelli, R., Choi, J., Frost, K. L., Reeder, S., Liaw, K., Tello, E., Ali, A. R., Yun, K., Pei, Y., Thomas, S. P., ... Kobasa, D. (2021). A novel mouse AAV6 hACE2 transduction model of wild-type SARS-CoV-2 infection studied using synDNA immunogens. *IScience*, 24(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102699>
- Goepfert, P. A., Fu, B., Chabanon, A. L., Bonaparte, M. I., Davis, M. G., Essink, B. J., Frank, I., Haney, O., Janoszyk, H., Keefer, M. C., Koutsoukos, M., Kimmel, M. A., Masotti, R., Savarino, S. J., Schuerman, L., Schwartz, H., Sher, L. D., Smith, J., Tavares-Da-Silva, F., ... de Bruyn, G. (2021). Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine formulations in healthy adults: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1–2, dose-ranging study. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(9), 1257–1270. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00147-X)
- Golding, H., Khurana, S., & Zaitseva, M. (2018). What is the predictive value of animal models for vaccine efficacy in humans? The importance of bridging studies and species-independent correlates of protection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028902>
- Gooch, K. E., Smith, T. R. F., Salguero, F. J., Fotheringham, S. A., Watson, R. J., Dennis, M. J., Handley, A., Humphries, H. E., Longet, S., Tipton, T., Sarfas, C., Sibley, L., Slack, G. S., Rayner, E., Ryan, K. A., Schultheis, K., Ramos, S. J., White, A., Charlton, S., ... Carroll, M. W. (2021). One or two dose regimen of the SARS-CoV-2 synthetic DNA vaccine INO-4800 protects against respiratory tract disease burden in nonhuman primate challenge model. *Vaccine*, 39(34), 4885–4894.
- Guebre-Xabier, M., Patel, N., Tian, J. H., Zhou, B., Maciejewski, S., Lam, K., Portnoff, A. D., Massare, M. J., Frieman, M. B., Piedra, P. A., Ellingsworth, L., Glenn, G., & Smith, G. (2020). NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge. *Vaccine*, 38(50), 7892–7896. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.10.064>
- Guirakhoo, F., Kuo, L., Peng, J., Huang, J. H., Kuo, B., Lin, F., Liu, K., Liu, Z., Wu, G., Ding, S., Hou, L.-L., Cheng, J., Yang, V., Jiang, H., Wang, J., Chen, T., Xia, W., Lin, E., Ho Hung, C., ... Wang, C. Y. (2020). A Novel SARS-CoV-2 Multitope Protein/Peptide Vaccine Candidate is Highly Immunogenic and Prevents Lung Infection in an Adeno Associated Virus Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (AAV hACE2) Mouse Model. *BioRxiv*, 2020.11.30.399154. <https://doi.org/10.1101/2020.11.30.399154>
- Guo, Q., Chan, J. F. W., Poon, V. K. M., Wu, S., Chan, C. C. S., Hou, L., Yip, C. C. Y., Ren, C., Cai, J. P., Zhao, M., Zhang, A. J., Song, X., Chan, K. H., Wang, B., Kok, K. H., Wen, Y., Yuen, K. Y., & Chen, W. (2018). Immunization with a novel human type 5 adenovirus-vectored vaccine expressing the pre-membrane and envelope proteins of zika virus provides consistent and sterilizing protection in multiple immunocompetent and



- immunocompromised animal models. *Journal of Infectious Diseases*, 218(3), 365–377. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy187>
- Guo, W., Duan, K., Zhang, Y., Yuan, Z., Zhang, Y. B., Wang, Z., Zhao, D., Zhang, H., Xie, Z., Li, X., Peng, C., Zhang, W., Yang, Y., Chen, W., Gao, X., You, W., Wang, X. W., Shi, Z., Wang, Y., ... Yang, X. (2021). Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial. *EClinicalMedicine*, 38, 101010. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101010>
- Hanifehnezhad, A., Kehribar, E. Ş., Öztıp, S., Sheraz, A., Kasırğa, S., Ergünay, K., Önder, S., Yılmaz, E., Engin, D., Oğuzoğlu, T. Ç., Şeker, U. Ö. Ş., Yılmaz, E., & Özkul, A. (2020). Characterization of local SARS-CoV-2 isolates and pathogenicity in IFNAR<sup>-/-</sup> mice. *Heliyon*, 6(9), e05116. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05116>
- Hassett, K. J., Benenato, K. E., Jacquinet, E., Lee, A., Woods, A., Yuzhakov, O., Himansu, S., Deterling, J., Geilich, B. M., Ketova, T., Mihai, C., Lynn, A., McFadyen, I., Moore, M. J., Senn, J. J., Stanton, M. G., Almarsson, Ö., Ciaramella, G., & Brito, L. A. (2019). Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 15, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>
- Imai, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Hatta, M., Loeber, S., Halfmann, P. J., Nakajima, N., Watanabe, T., Ujie, M., Takahashi, K., Ito, M., Yamada, S., Fan, S., Chiba, S., Kuroda, M., Guan, L., Takada, K., Armbrust, T., Balogh, A., Furusawa, Y., ... Kawaoka, Y. (2020). Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), 16587–16595. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
- Jackson, L. A., Anderson, E. J., Roupheal, N. G., Roberts, P. C., Makhene, M., Coler, R. N., McCullough, M. P., Chappell, J. D., Denison, M. R., Stevens, L. J., Pruijssers, A. J., McDermott, A., Flach, B., Doria-Rose, N. A., Corbett, K. S., Morabito, K. M., O'Dell, S., Schmidt, S. D., Swanson, P. A., ... Beigel, J. H. (2020). An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 — Preliminary Report. *New England Journal of Medicine*, 383(20), 1920–1931. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2022483>
- Lanini, S., Capone, S., Antinori, A., Milleri, S., Nicastri, E., Camerini, R., Agrati, C., Castilletti, C., Mori, F., Sacchi, A., Matusali, G., Gagliardini, R., Ammendola, V., Cimini, E., Grazioli, F., Scorzolini, L., Napolitano, F., Plazzi, M. M., Soriani, M., ... Mazzaferri, F. (2021). GRAD-COV2, a gorilla adenovirus-based candidate vaccine against COVID-19, is safe and immunogenic in younger and older adults. *Science Translational Medicine*, 2021.04.10.21255202. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABJ1996>
- Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S. C. (2005). Structural biology: Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*, 309(5742), 1864–1868. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1116480>
- Li, R., Miao, J., Fan, Z., Song, S., Kong, I. K., Wang, Y., & Wang, Z. (2018). Production of genetically engineered golden syrian hamsters by pronuclear injection of the CRISPR/Cas9 complex. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(131). <https://doi.org/10.3791/56263>
- Liang, J. G., Su, D., Song, T. Z., Zeng, Y., Huang, W., Wu, J., Xu, R., Luo, P., Yang, X., Zhang, X., Luo, S., Liang, Y., Li, X., Huang, J., Wang, Q., Huang, X., Xu, Q., Luo, M., Huang, A., ... Liang, P. (2021). S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. *Nature Communications*, 12(1), 1–12.

- <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21634-1>
- Madhi, S. A., Baillie, V., Cutland, C. L., Voysey, M., Koen, A. L., Fairlie, L., Padayachee, S. D., Dheda, K., Barnabas, S. L., Bhorat, Q. E., Briner, C., Kwatra, G., Ahmed, K., Aley, P., Bhikha, S., Bhiman, J. N., Bhorat, A. E., du Plessis, J., Esmail, A., ... Izu, A. (2021). Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *New England Journal of Medicine*, *384*(20), 1885–1898. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2102214>
- Maizel, J. V., White, D. O., & Scharff, M. D. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology*, *36*(1), 115–125. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90121-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(68)90121-9)
- Mao, Q., Xu, M., He, Q., Li, C., Meng, S., Wang, Y., Cui, B., Liang, Z., & Wang, J. (2021). COVID-19 vaccines: progress and understanding on quality control and evaluation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* *2021 6:1*, *6*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00621-4>
- Marsh, G. A., McAuley, A. J., Au, G. G., Riddell, S., Layton, D., Singanallur, N. B., Layton, R., Payne, J., Durr, P. A., Bender, H., Barr, J. A., Bingham, J., Boyd, V., Brown, S., Bruce, M. P., Burkett, K., Eastwood, T., Edwards, S., Gough, T., ... Vasan, S. S. (2021). ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine candidate significantly reduces SARS-CoV-2 shedding in ferrets. *Npj Vaccines*, *6*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00315-6>
- Mercado, N. B., Zahn, R., Wegmann, F., Loos, C., Chandrashekar, A., Yu, J., Liu, J., Peter, L., McMahan, K., Tostanoski, L. H., He, X., Martinez, D. R., Rutten, L., Bos, R., van Manen, D., Vellinga, J., Custers, J., Langedijk, J. P., Kwaks, T., ... Barouch, D. H. (2020). Single-shot Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Nature*, *586*(7830), 583–588. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2607-z>
- Metz, B., Van Dobbelen, G. Den, Van Els, C., Van Gun, J. Der, Levels, L., Van Pol, L. Der, Rots, N., & Kersten, G. (2009). Quality-control issues and approaches in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, *8*(2), 227–238. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.2.227>
- Meyer, B., Reimerink, J., Torriani, G., Brouwer, F., Godeke, G.-J., Yerly, S., Hoogerwerf, M., Vuilleumier, N., Kaiser, L., Eckerle, I., & Reusken, C. (2020). Validation and clinical evaluation of a SARS-CoV-2 surrogate virus neutralisation test (sVNT). *Emerging Microbes & Infections*, *9*(1), 2394–2403. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1835448>
- Michiels, T. J. M., Tilstra, W., Hamzink, M. R. J., de Ridder, J. W., Danial, M., Meiring, H. D., Kersten, G. F. A., Jiskoot, W., & Metz, B. (2020). Degradomics-based analysis of tetanus toxoids as a quality control assay. *Vaccines*, *8*(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040712>
- Mohandas, S., Yadav, P. D., Shete-Aich, A., Abraham, P., Vadrevu, K. M., Sapkal, G., Mote, C., Nyayanit, D., Gupta, N., Srinivas, V. K., Kadam, M., Kumar, A., Majumdar, T., Jain, R., Deshpande, G., Patil, S., Sarkale, P., Patil, D., Ella, R., ... Bhargava, B. (2021). Immunogenicity and protective efficacy of BBV152, whole virion inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidates in the Syrian hamster model. *IScience*, *24*(2), 102054. <http://www.cell.com/article/S2589004221000225/fulltext>
- Navratilova, I., & Hopkins, A. L. (2010). Fragment screening by surface plasmon resonance. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *1*(1), 44–48. <https://doi.org/10.1021/ml900002k>
- NC3Rs. (2020). *The 3Rs | NC3Rs*. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. <https://nc3rs.org.uk/the-3rs>
- Nie, J., Li, Q., Wu, J., Zhao, C., Hao, H., Liu, H., Zhang, L., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li,

- X., Sun, Q., Liu, J., Fan, C., Huang, W., Xu, M., & Wang, Y. (2020). Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. *Nature Protocols*, *15*(11), 3699–3715. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0394-5>
- Osterrieder, N., Bertzbach, L. D., Dietert, K., Abdelgawad, A., Vladimirova, D., Kunec, D., Hoffmann, D., Beer, M., Gruber, A. D., & Trimpert, J. (2020). Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in syrian hamsters. *Viruses*, *12*(7), 779. <https://doi.org/10.3390/v12070779>
- Patel, A., Walters, J., Reuschel, E. L., Schultheis, K., Parzych, E., Gary, E. N., Maricic, I., Purwar, M., Eblimit, Z., Walker, S. N., Guimet, D., Bhojnagarwala, P., Doan, A., Xu, Z., Elwood, D., Reeder, S. M., Pessaint, L., Kim, K. Y., Cook, A., ... Broderick, K. E. (2020). Intradermal-delivered DNA vaccine provides anamnestic protection in a rhesus macaque SARS-CoV-2 challenge model. *Cell Reports*, 2020.07.28.225649. <https://doi.org/10.1101/2020.07.28.225649>
- Richmond, P., Hatchuel, L., Dong, M., Ma, B., Hu, B., Smolenov, I., Li, P., Liang, P., Han, H. H., Liang, J., & Clemens, R. (2021). Safety and immunogenicity of S-Trimer (SCB-2019), a protein subunit vaccine candidate for COVID-19 in healthy adults: a phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet*, *397*(10275), 682–694. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00241-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00241-5)
- Riddell, S., Goldie, S., McAuley, A. J., Kuiper, M. J., Durr, P. A., Blasdel, K., Tachedjian, M., Druce, J. D., Smith, T. R. F., Broderick, K. E., & Vasan, S. S. (2021). Live Virus Neutralisation of the 501Y.V1 and 501Y.V2 SARS-CoV-2 Variants following INO-4800 Vaccination of Ferrets. *Frontiers in Immunology*, *12*, 2021.04.17.440246. <https://doi.org/10.1101/2021.04.17.440246>
- Riepler, L., Rössler, A., Falch, A., Volland, A., Borena, W., Kimpel, J., & von Laer, D. (2021). Comparison of four SARS-CoV-2 neutralization assays. *Vaccines*, *9*(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010013>
- Robbiani, D. F., Gaebler, C., Muecksch, F., Lorenzi, J. C. C., Wang, Z., Cho, A., Agudelo, M., Barnes, C. O., Gazumyan, A., Finkin, S., Hägglöf, T., Oliveira, T. Y., Viant, C., Hurley, A., Hoffmann, H. H., Millard, K. G., Kost, R. G., Cipolla, M., Gordon, K., ... Nussenzweig, M. C. (2020). Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*, *584*(7821), 437–442. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
- Roberts, A., Lamirande, E. W., Vogel, L., Jackson, J. P., Paddock, C. D., Guarner, J., Zaki, S. R., Sheahan, T., Baric, R., & Subbarao, K. (2008). Animal models and vaccines for SARS-CoV infection. *Virus Research*, *133*(1), 20–32. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2007.03.025>
- Ryan, K. A., Bewley, K. R., Fotheringham, S. A., Slack, G. S., Brown, P., Hall, Y., Wand, N. I., Marriott, A. C., Cavell, B. E., Tree, J. A., Allen, L., Aram, M. J., Bean, T. J., Brunt, E., Buttigieg, K. R., Carter, D. P., Cobb, R., Coombes, N. S., Findlay-Wilson, S. J., ... Carroll, M. W. (2021). Dose-dependent response to infection with SARS-CoV-2 in the ferret model and evidence of protective immunity. *Nature Communications* 2021 12:1, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20439-y>
- Sadoff, J., Gray, G., Vandebosch, A., Cárdenas, V., Shukarev, G., Grinsztejn, B., Goepfert, P. A., Truyers, C., Fennema, H., Spiessens, B., Offergeld, K., Scheper, G., Taylor, K. L., Robb, M. L., Treanor, J., Barouch, D. H., Stoddard, J., Ryser, M. F., Marovich, M. A., ... Douoguih, M. (2021). Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *New England Journal of Medicine*, *384*(23), 2187–2201. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2101544>

- Sadoff, J., Le Gars, M., Shukarev, G., Heerwegh, D., Truyers, C., de Groot, A. M., Stoop, J., Tete, S., Van Damme, W., Leroux-Roels, I., Berghmans, P.-J., Kimmel, M., Van Damme, P., de Hoon, J., Smith, W., Stephenson, K. E., De Rosa, S. C., Cohen, K. W., McElrath, M. J., ... Schuitemaker, H. (2021). Interim Results of a Phase 1–2a Trial of Ad26.COVS.2.S Covid-19 Vaccine. *New England Journal of Medicine*, *384*(19), 1824–1835. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034201>
- Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E., Vogler, I., Kranz, L. M., Vormehr, M., Baum, A., Pascal, K., Quandt, J., Maurus, D., Brachtendorf, S., Lörks, V., Sikorski, J., Hilker, R., Becker, D., Eller, A. K., Grützner, J., Boesler, C., Rosenbaum, C., ... Türeci, Ö. (2020). COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, *586*(7830), 594–599. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2814-7>
- Salguero, F. J., White, A. D., Slack, G. S., Fotheringham, S. A., Bewley, K. R., Gooch, K. E., Longet, S., Humphries, H. E., Watson, R. J., Hunter, L., Ryan, K. A., Hall, Y., Sibley, L., Sarfas, C., Allen, L., Aram, M., Brunt, E., Brown, P., Buttigieg, K. R., ... Carroll, M. W. (2021). Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nature Communications*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21389-9>
- Sanyal, G., Särnefält, A., & Kumar, A. (2021). Considerations for bioanalytical characterization and batch release of COVID-19 vaccines. In *npj Vaccines* (Vol. 6, Issue 1, pp. 1–9). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00317-4>
- Schultheis, K., Schaefer, H., Yung, B. S., Oh, J., Muthumani, K., Humeau, L., Broderick, K. E., & Smith, T. R. F. (2017). Characterization of guinea pig T cell responses elicited after EP-assisted delivery of DNA vaccines to the skin. *Vaccine*, *35*(1), 61. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.052>
- Shah, N. B., & Duncan, T. M. (2014). Bio-layer interferometry for measuring kinetics of protein-protein interactions and allosteric ligand effects. *Journal of Visualized Experiments*, *84*(84), 51383. <https://doi.org/10.3791/51383>
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, *368*(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Sia, S. F., Yan, L. M., Chin, A. W. H., Fung, K., Choy, K. T., Wong, A. Y. L., Kaewpreedee, P., Perera, R. A. P. M., Poon, L. L. M., Nicholls, J. M., Peiris, M., & Yen, H. L. (2020). Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*, *583*(7818), 834–838. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
- Singhal, A., Haynes, C. A., & Hansen, C. L. (2010). Microfluidic measurement of antibody-antigen binding kinetics from low-abundance samples and single cells. *Analytical Chemistry*, *82*(20), 8671–8679. <https://doi.org/10.1021/ac101956e>
- Smith, S. G., Smits, K., Joosten, S. A., Meijgaarden, K. E. van, Satti, I., Fletcher, H. A., Caccamo, N., Dieli, F., Mascart, F., McShane, H., Dockrell, H. M., Ottenhoff, T. H. M., & Group, T. T. B. W. (2015). Intracellular Cytokine Staining and Flow Cytometry: Considerations for Application in Clinical Trials of Novel Tuberculosis Vaccines. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0138042>
- Smith, S. G., Smits, K., Joosten, S. A., Van Meijgaarden, K. E., Satti, I., Fletcher, H. A., Caccamo, N., Dieli, F., Mascart, F., McShane, H., Dockrell, H. M., Ottenhoff, T. H. M., Haks, M., Stenger, S., Kaufmann, S., Maertzdorf, J., Gicquel, B., Tailleux, L., & Sallusto, F.

- (2015a). Intracellular cytokine staining and flow cytometry: Considerations for application in clinical trials of novel tuberculosis vaccines. *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138042>
- Smith, S. G., Smits, K., Joosten, S. A., Van Meijgaarden, K. E., Satti, I., Fletcher, H. A., Caccamo, N., Dieli, F., Mascart, F., McShane, H., Dockrell, H. M., Ottenhoff, T. H. M., Haks, M., Stenger, S., Kaufmann, S., Maertzdorf, J., Gicquel, B., Tailleux, L., & Sallusto, F. (2015b). Intracellular cytokine staining and flow cytometry: Considerations for application in clinical trials of novel tuberculosis vaccines. *PLoS ONE*, *10*(9), 1761–1773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138042>
- Smith, T., Patel, A., Ramos, S., Elwood, D., Zhu, X., Yan, J., Gary, E. N., Walker, S. N., Schultheis, K., Purwar, M., Xu, Z., Walters, J., Bhojnagarwala, P., Yang, M., Chokkalingam, N., Pezzoli, P., Parzych, E., Reuschel, E. L., Doan, A., ... Broderick, K. E. (2020). Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nature Communications*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16505-0>
- Stephenson, K. E., Le Gars, M., Sadoff, J., De Groot, A. M., Heerwegh, D., Truysers, C., Atyeo, C., Loos, C., Chandrashekar, A., McMahan, K., Tostanoski, L. H., Yu, J., Gebre, M. S., Jacob-Dolan, C., Li, Z., Patel, S., Peter, L., Liu, J., Borducchi, E. N., ... Barouch, D. H. (2021). Immunogenicity of the Ad26.COVS.2 Vaccine for COVID-19. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *325*(15), 1535–1544. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3645>
- Sun, S. H., Chen, Q., Gu, H. J., Yang, G., Wang, Y. X., Huang, X. Y., Liu, S. S., Zhang, N. N., Li, X. F., Xiong, R., Guo, Y., Deng, Y. Q., Huang, W. J., Liu, Q., Liu, Q. M., Shen, Y. L., Zhou, Y., Yang, X., Zhao, T. Y., ... Wang, Y. C. (2020). A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host & Microbe*, *28*(1), 124-133.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
- Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., Liu, P., Chen, M. I. C., Tiu, C., Hu, Z., Chen, V. C. W., Young, B. E., Sia, W. R., Tan, Y. J., Foo, R., Yi, Y., Lye, D. C., Anderson, D. E., & Wang, L. F. (2020). A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction. *Nature Biotechnology*, *38*(9), 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0631-z>
- Tebas, P., Yang, S. P., Boyer, J. D., Reuschel, E. L., Patel, A., Christensen-Quick, A., Andrade, V. M., Morrow, M. P., Kravnyak, K., Agnes, J., Purwar, M., Sylvester, A., Pawlicki, J., Gillespie, E., Maricic, I., Zaidi, F. I., Kim, K. Y., Dia, Y., Frase, D., ... Humeau, L. M. (2021). Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, Phase 1 clinical trial. *EClinicalMedicine*, *31*, 100689.
- the Department of Immunization Vaccines and Biologicals. (2014). *Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses*. September 2011, 1–3.
- Thermo Fisher Scientific. (2021). *Luminex Assays*. <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/antibodies/immunoassays/procartaplex-assays-luminex.html>
- Tian, J. H., Patel, N., Haupt, R., Zhou, H., Weston, S., Hammond, H., Logue, J., Portnoff, A. D., Norton, J., Guebre-Xabier, M., Zhou, B., Jacobson, K., Maciejewski, S., Khatoun, R., Wisniewska, M., Moffitt, W., Kluepfel-Stahl, S., Ekechukwu, B., Papin, J., ... Smith, G. (2021). SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nature Communications*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20653-8>

- Tostanoski, L. H., Wegmann, F., Martinot, A. J., Loos, C., McMahan, K., Mercado, N. B., Yu, J., Chan, C. N., Bondoc, S., Starke, C. E., Nekorchuk, M., Busman-Sahay, K., Piedra-Mora, C., Wrijil, L. M., Ducat, S., Custers, J., Atyeo, C., Fischinger, S., Burke, J. S., ... Barouch, D. H. (2020). Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nature Medicine*, 26(11), 1694–1700. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1070-6>
- van Doremalen, N., Lambe, T., Spencer, A., Belij-Rammerstorfer, S., Purushotham, J. N., Port, J. R., Avanzato, V. A., Bushmaker, T., Flaxman, A., Ulaszewska, M., Feldmann, F., Allen, E. R., Sharpe, H., Schulz, J., Holbrook, M., Okumura, A., Meade-White, K., Pérez-Pérez, L., Edwards, N. J., ... Munster, V. J. (2020). ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature*, 586(7830), 578–582. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2608-y>
- Vogel, A. B., Kanevsky, I., Che, Y., Swanson, K. A., Muik, A., Vormehr, M., Kranz, L. M., Walzer, K. C., Hein, S., Güler, A., Loschko, J., Maddur, M. S., Ota-Setlik, A., Tompkins, K., Cole, J., Lui, B. G., Ziegenhals, T., Plaschke, A., Eisel, D., ... Sahin, U. (2021). BNT162b vaccines protect rhesus macaques from SARS-CoV-2. *Nature*, 592(7853), 283–289. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03275-y>
- Voysey, M., Clemens, S. A. C., Madhi, S. A., Weckx, L. Y., Folegatti, P. M., Aley, P. K., Angus, B., Baillie, V. L., Barnabas, S. L., Bhorat, Q. E., Bibi, S., Briner, C., Cicconi, P., Collins, A. M., Colin-Jones, R., Cutland, C. L., Darton, T. C., Dheda, K., Duncan, C. J. A., ... Zuidewind, P. (2021). Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *The Lancet*, 397(10269), 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Walsh, E. E., Frenck, R. W., Falsey, A. R., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Mulligan, M. J., Bailey, R., Swanson, K. A., Li, P., Koury, K., Kalina, W., Cooper, D., Fontes-Garfias, C., Shi, P.-Y., Türeci, Ö., Tompkins, K. R., ... Gruber, W. C. (2020). Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. *New England Journal of Medicine*, 383(25), 2439–2450. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2027906>
- Wang, H., Zhang, Y., Huang, B., Deng, W., Quan, Y., Wang, W., Xu, W., Zhao, Y., Li, N., Zhang, J., Liang, H., Bao, L., Xu, Y., Ding, L., Zhou, W., Gao, H., Liu, J., Niu, P., Zhao, L., ... Yang, X. (2020). Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2. *Cell*, 182(3), 713–721.e9. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.06.008>
- WHO. (2021a). *COVID-19 - Landscape of novel coronavirus candidate vaccine development worldwide*.
- WHO. (2021b). *COVID-19 vaccine tracker and landscape*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- WHO. (2021c). *WHO/BS/2021.2402. Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations*. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/call-for-comments/bs.2021.bs2402\\_who-regulatory-considerations-for-mrna-vaccines\\_final.pdf?sfvrsn=c8623b32\\_5](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/call-for-comments/bs.2021.bs2402_who-regulatory-considerations-for-mrna-vaccines_final.pdf?sfvrsn=c8623b32_5)

- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, *367*(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Wu, L., Chen, Q., Liu, K., Wang, J., Han, P., Zhang, Y., Hu, Y., Meng, Y., Pan, X., Qiao, C., Tian, S., Du, P., Song, H., Shi, W., Qi, J., Wang, H. W., Yan, J., Gao, G. F., & Wang, Q. (2020). Broad host range of SARS-CoV-2 and the molecular basis for SARS-CoV-2 binding to cat ACE2. *Cell Discovery*, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-00210-9>
- Wu, S., Zhong, G., Zhang, J., Shuai, L., Zhang, Z., Wen, Z., Wang, B., Zhao, Z., Song, X., Chen, Y., Liu, R., Fu, L., Zhang, J., Guo, Q., Wang, C., Yang, Y., Fang, T., Lv, P., Wang, J., ... Chen, W. (2020). A single dose of an adenovirus-vectored vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nature Communications*, *11*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17972-1>
- Wyatt Technology Corporation. (n.d.). *Nanoparticle and macromolecular size by light scattering*. Retrieved October 26, 2021, from <https://www.wyatt.com/solutions/properties/nanoparticle-and-macromolecular-size-by-light-scattering.html>
- Xiong, X., Qu, K., Ciazynska, K. A., Hosmillo, M., Carter, A. P., Ebrahimi, S., Ke, Z., Scheres, S. H. W., Bergamaschi, L., Grice, G. L., Zhang, Y., Bradley, J., Lyons, P. A., Smith, K. G. C., Toshner, M., Elmer, A., Ribeiro, C., Kourampa, J., Jose, S., ... Briggs, J. A. G. (2020). A thermostable, closed SARS-CoV-2 spike protein trimer. *Nature Structural and Molecular Biology*, *27*(10), 934–941. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0478-5>
- Yadav, P. D., Ella, R., Kumar, S., Patil, D. R., Mohandas, S., Shete, A. M., Vadrevu, K. M., Bhati, G., Sapkal, G., Kaushal, H., Patil, S., Jain, R., Deshpande, G., Gupta, N., Agarwal, K., Gokhale, M., Mathapati, B., Metkari, S., Mote, C., ... Bhargava, B. (2021). Immunogenicity and protective efficacy of inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidate, BBV152 in rhesus macaques. *Nature Communications*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21639-w>
- Yadav, P. D., Sapkal, G. N., Ella, R., Sahay, R. R., Nyayanit, D. A., Patil, D. Y., Deshpande, G., Shete, A. M., Gupta, N., Mohan, V. K., Abraham, P., Panda, S., & Bhargava, B. (2021). Neutralization of Beta and Delta variant with sera of COVID-19 recovered cases and vaccinees of inactivated COVID-19 vaccine BBV152/Covaxin. *Journal of Travel Medicine*, *28*(7), 1314–1323. <https://doi.org/10.1093/jtm/taab104>
- Yang, S., Li, Y., Dai, L., Wang, J., He, P., Li, C., Fang, X., Wang, C., Zhao, X., Huang, E., Wu, C., Zhong, Z., Wang, F., Duan, X., Tian, S., Wu, L., Liu, Y., Luo, Y., Chen, Z., ... Gao, G. F. (2021). Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials. *The Lancet Infectious Diseases*, *21*(8), 1107–1119. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00127-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00127-4)
- Zhang, N. N., Li, X. F., Deng, Y. Q., Zhao, H., Huang, Y. J., Yang, G., Huang, W. J., Gao, P., Zhou, C., Zhang, R. R., Guo, Y., Sun, S. H., Fan, H., Zu, S. L., Chen, Q., He, Q., Cao, T. S., Huang, X. Y., Qiu, H. Y., ... Qin, C. F. (2020). A Thermostable mRNA Vaccine against COVID-19. *Cell*, *182*(5), 1271-1283.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.024>
- Zhang, Y., Zeng, G., Pan, H., Li, C., Hu, Y., Chu, K., Han, W., Chen, Z., Tang, R., Yin, W., Chen, X., Hu, Y., Liu, X., Jiang, C., Li, J., Yang, M., Song, Y., Wang, X., Gao, Q., & Zhu, F. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2



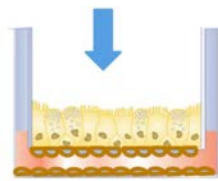
clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(2), 181–192.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)

Zhu, F. C., Guan, X. H., Li, Y. H., Huang, J. Y., Jiang, T., Hou, L. H., Li, J. X., Yang, B. F., Wang, L., Wang, W. J., Wu, S. P., Wang, Z., Wu, X. H., Xu, J. J., Zhang, Z., Jia, S. Y., Wang, B. Sen, Hu, Y., Liu, J. J., ... Chen, W. (2020). Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, 396(10249), 479–488. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)

Zhu, F. C., Li, Y. H., Guan, X. H., Hou, L. H., Wang, W. J., Li, J. X., Wu, S. P., Wang, B. Sen, Wang, Z., Wang, L., Jia, S. Y., Jiang, H. D., Wang, L., Jiang, T., Hu, Y., Gou, J. B., Xu, S. B., Xu, J. J., Wang, X. W., ... Chen, W. (2020). Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *The Lancet*, 395(10240), 1845–1854. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31208-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31208-3)

# Learning from COVID-19 SARS-CoV-2 and Organoid technology



January 2022

## Table of Contents

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>3</b>
<b>PROJECT</b> .....	<b>4</b>
<b>METHODS</b> .....	<b>5</b>
TOTAL NUMBER AND PROPORTIONS OF MODELS USED IN SARS-CoV-2 RESEARCH .....	6
SARS-CoV-2 PATHOLOGY STUDIES, RESEARCH QUESTIONS AND MODELS USED (RQ2) .....	6
SARS-CoV-2 ANTIVIRAL THERAPY STUDIES, DRUGS INVESTIGATED, AND MODELS USED (RQ3).....	6
<b>RESULTS</b> .....	<b>7</b>
TOTAL NUMBER AND PROPORTIONS OF MODELS USED IN SARS-CoV-2 RESEARCH.....	7
SARS-CoV-2, RESEARCH QUESTIONS AND MODELS USED FOR AIRWAY PATHOLOGY STUDIES.....	9
SARS-CoV-2 ANTIVIRAL THERAPY STUDIES, DRUGS INVESTIGATED, AND ORGANOID MODELS USED. ....	11
<b>CONCLUSION AND DISCUSSION</b> .....	<b>12</b>
<b>IMPORTANCE</b> .....	<b>13</b>
<b>RECOMMENDATIONS</b> .....	<b>14</b>
ENCOURAGING TPI IN VIROLOGY: CREATING A MIND-SHIFT .....	14
USING EXISTING DATA TO HELP IMPROVE THE IMPLEMENTATION OF ANIMAL-FREE INNOVATIONS.....	14
DEVELOPMENT OF COMPLEX HUMAN MODELS.....	14
RECOMMENDED FOLLOW-UP .....	15
<b>REFERENCES</b> .....	<b>16</b>
<b>APPENDIX</b> .....	<b>18</b>
1) REGEX SEARCH TERMS .....	18
2) RESEARCH QUESTION 1, 2 & 3 ARTICLE LIST (ORGANOID MODELS).....	19
3) RESEARCH QUESTION 2B ARTICLE LIST (ANIMAL MODELS) .....	23
4) RESEARCH QUESTION 3 OVERVIEW ORGANOID TYPES AND EFFECTS FOR DRUGS SCREENED .....	26

## Abstract

The severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) pandemic has generated a large amount of research into SARS-CoV-2 and its effects, to find answers and save lives. This is a unique opportunity to take advantage of the huge progress made in science over the last decades. Innovations have been made that were unimaginable over 70 years ago, when animal models became a golden standard for medical research, such as Organs on a Chip and Organoid models. Use of animal models in research is becoming less self-evident, not only because of public concern for animal and human welfare, but increasingly from a scientific point of view as well, emphasizing the importance of innovation and implementation of non-animal methods to improve biomedical research. With the current volume of research on SARS-CoV-2, an important question is ‘has the scientific community seized this opportunity to make more use of innovative, animal free, research methods?’. This report presents the results of a literature search to identify different research models used in SARS-CoV-2 research and to make recommendations on how the proportion of innovative non-animal models can be improved, specifically in virological research.

## Introduction

SARS-CoV-2, the cause of the COVID-19 pandemic is a zoonotic beta-coronavirus first discovered in China in 2019. Initial symptoms were acute respiratory distress syndrome (ARDS); however, it has since been discovered that the virus can cause multiple pathologies in different organs. Outcomes for patients range from none or mild symptoms, to death or chronic issues. Since the start of the pandemic research from all over the world has resulted in an enormous number of studies into the virus itself and the interaction with humans, in the quest for finding a cure and prophylaxis.<sup>[1, 2]</sup>

Animal models became a golden standard for medical research over 70 years ago, but since then it became increasingly clear that responses in animals do not fully represent disease in humans. Pathogen tropism (the preference of a pathogen for a host) and differences in pathology between humans and animals complicates translation of data from animal studies to humans. For this reason, and because animal welfare is becoming increasingly more important in society, animal use in science is under scrutiny.<sup>[3, 4, 5]</sup>

These developments emphasize the importance of innovation and implementation of non-animal methods to improve both scientific research and welfare for human and non-human animals. Over the past decades new innovative methods to study disease in humans have been developed to enable this. One of these innovations to improve translation of research outcomes to humans and to reduce and replace animal use in research, is the use of organoids as a model for human disease. Organoids are three-dimensional, organ-like structures that are grown from either adult stem cells or pluripotent stem cells. Under specific controlled conditions in culture, the stem cells can generate organ-specific cell types. These can self-organize and display functionality of the organ, albeit in a limited way, which can be used as a human model for medical research. Further progress in organoid-model techniques has resulted in the development of two-dimensional organotypic cultures in which both the basal side and the lumen of the mimicked organ are accessible by culturing differentiated stem cells in an air-liquid interface. This enables detailed research into infection dynamics and pathways by identifying receptors and reactions of the cells involved. Development of co-cultures to research different organ systems and their interactions improves representation of human in vivo processes even more. Organoid models are particularly useful in virology research, as viruses are obligate intracellular pathogens that can only replicate in living host cells. Interactions of viruses with the host cell and subsequent reactions can cause pathology and the study of these processes is therefore of great importance for both prevention and cure of viral infections.<sup>[6, 7]</sup>

## Project

The Minister of Agriculture, Nature and Food Quality has requested information on the effects of coronavirus disease of 2019 (COVID-19) on the transition to innovation without laboratory animals (NCad 2021). The main question is: "What are the proportions of models used in SARS-CoV-2 research and how can the proportion of innovative non-animal models be improved?" [8]

To answer this question, the Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes (NCad) initiated this project and our part is to take a closer look at the proportions of organoid type models used in SARS-CoV-2 research, specifically human airway models. Virological research at the OrganoVIR Labs, Department of Medical Microbiology, Amsterdam UMC, is performed with organoid and organotypic cultures, therefore this department was approached by NCad to investigate the role of organoid technology in SARS-CoV-2 research.

A preliminary study done by this department earlier this year found that most of the studies on SARS-CoV-2 with human-based organoid technology focused on pathogenesis, followed by antiviral therapy. Over 50% of the studies on pathogenesis with organoid technology used human airway models. [9]

To further investigate these results and assess the proportion of human airway models used compared to animal models and human patient data a literature search on SARS-CoV-2 studies was conducted, focusing on use and type of models, lung pathology/pathogenesis and antiviral therapy.

The project is divided into three separate research questions (RQ) to evaluate the use of *in vitro* stem cell based human airway models, such as lung organoids and Air-Liquid-Interface/Human Airway Epithelium (ALI/HAE) in SARS-CoV-2 research.

1. Investigate the proportions of Animal, *In vitro* and Clinical publications on SARS-CoV-2 research: What are the numbers and proportions of animal models versus *in vitro* human airway models used in SARS-CoV-2 research.
2. Categorize the research questions of SARS-CoV-2 lung pathology research and specify the *in vitro* human airway models used: Which areas in SARS-CoV-2 lung pathology have been researched and what were the predominantly used models to study these questions?
3. Identify drugs and organoid models used in SARS-CoV-2 antiviral therapy research: Which drugs have been investigated *in vitro* with organoids in SARS-CoV-2 antiviral therapy research and which type of models are mainly used?

The results will be presented in this report along with recommendations on how to improve implementation of this technology to accelerate moving towards non-animal research in science, particularly the use of *in vitro* human airway models in virology research.

## Methods

The three separate research questions to evaluate the use of *in vitro* stem cell based human airway models were performed in the CAMARADES COVID-19 SOLES database. This is a COVID-19 Systematic Online Living Evidence Summary (SOLES) based on primary research studies, developed by the CAMARADES research group at Edinburgh University for stakeholders in COVID-19 research.

The CAMARADES group performs a weekly search, without language restrictions, on primary research on COVID-19 disease or the SARS-CoV-2 virus in PubMed, Embase, Web of Science, the WHO database of publications on coronavirus disease (COVID-19), BioRxiv and MedRxiv. The results are added on a weekly basis to the COVID-19 SOLES database after deduplication with The Automated Systematic Search Deduplicator (ASySD) tool. Primary research is defined as original clinical, *in vivo* non-human animal, *in vitro*, and *in silico* research in which data are gathered, reported, analyzed, and interpreted in that research article and original results are presented. This includes Peer-reviewed studies, pre-prints, systematic reviews, and conference abstracts related to primary research. Secondary publications such as, narrative reviews, opinion pieces, etc., and publications not related to COVID-19 or SARS-CoV-2 are excluded. <sup>[10, 11]</sup>

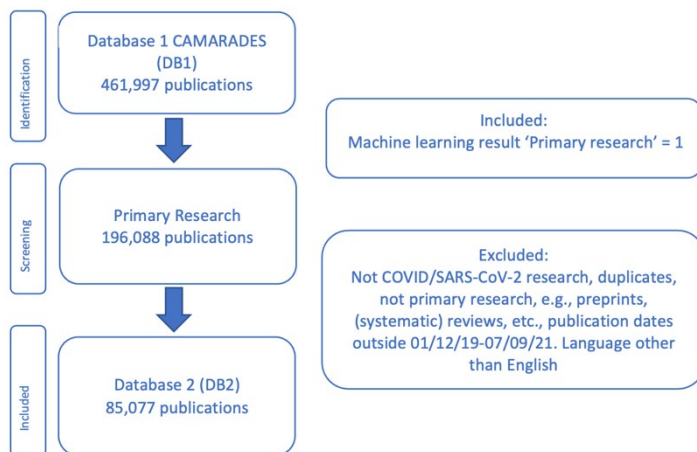


Figure 1 Overview publications screened

indicates the study was included in said categories, and '0' indicates it was excluded. The sensitivity was preset to 95%, leaving a 5% margin of error, as this was deemed to be an estimated average sensitivity of dual human screening. The Primary research algorithm includes all studies with an abstract reporting original COVID-19 research. The Animal research algorithm includes all studies using any animal species or model and the *In vitro* research algorithm includes all studies that conduct interventional experiments using any *in vitro* or *ex vivo* model. <sup>[13]</sup>

The supplied database with machine learning results (DB1 461,997 publications) was uploaded in R-Studio (R version 4.1.1 (2021-08-10) and filtered on ML primary research. This subset was subsequently further deduplicated, filtered on publication date between 2019-2021 (no relevant results in Dec 2019), and English language only, followed by removal of systematic reviews, preprints, etc., resulting in DB2 with 85,077 publications. Further in/excluding and data management was done with Rayyan and Monday.com. See figure 1 and search details and publications in appendix.

## Total number and proportions of models used in SARS-CoV-2 research

To get the numbers and proportions of models used in SARS-CoV-2 research for research question 1, subsets were created in DB2 by filtering on machine learning (ML) results for Animal research and *in vitro* research as well as publications included in both categories by ML. Searches were performed to identify Clinical studies and the proportion of organoid studies (all organs), specifically publications with Human Airway Model (airway organoid/organotypic cell cultures). Search terms were partly based on the MeSH terms used by Kroon <sup>[9]</sup>, and a check of abstracts was done to identify additional terminology. Another search in DB2 was done to find categories for the remainder of the subset, such as surveys, questionnaires, mathematical/computational models, and epidemiological studies, not taking overlap into account. Publications from the results of Kroon and publications in a subset that was not categorized as primary research by ML were checked, missing publications were added to the result. An additional search was done in DB2 for publications with animal models, as well as separate searches for studies with non-human primates (NHP), hamsters, and mice, these results were further broken down to Lung pathology research for RQ2, and treatment and vaccine research for RQ3. Finally, a search on Remdesivir and (hydroxy)chloroquine in DB2 (85,077 publications) was analyzed for number of organoid, animal and clinical studies.

## SARS-CoV-2 pathology studies, research questions and models used (RQ2)

For research question 2, which areas in SARS-CoV-2 lung pathology have been researched and what were the predominantly used models to study these questions, the organoid subset created for RQ1 (418 publications) was used for further analysis for lung pathology research questions (RQ2). The research questions of the publications found were divided into three categories: Model development, Receptor & entry, and Host (cell) & immune response. The results were also categorized by cell types used for the organoid models. Publications with non-human primates, hamsters and mice were extracted with a search done in DB2, and research questions were categorized as the organoid subset, with one additional category, (re)infection and transmission.

## SARS-CoV-2 antiviral therapy studies, drugs investigated, and models used (RQ3)

To identify drugs investigated *in vitro* with organoids, related search terms were used to find relevant publications. The results were summarized by type of organoid model and results found.



## Results

One of the positive outcomes of the Sars-CoV2 pandemic is the worldwide collaboration of researchers to obtain knowledge on this rapidly spreading virus. Many publications are published online, after rapid peer reviewing processes or as preprints, and are being shared as open data. The disadvantage is that this 'data-avalanche' makes it progressively harder to find relevant data, in the commonly searched databases such as PubMed, that is reliable and valid. Over the past two years, nearly half a million publications on Sars-CoV2 were added to the COVID-19 SOLES database by the Camarades team, with the aim to better categorize publications on Sars-CoV2. This is a record in number of publications on a topic in such a short time span. <sup>[14]</sup> The COVID-19 SOLES database is compiled of search results of four databases (PubMed, Embase, Web of Science and WHO) saving us searching multiple databases. The ML provided by the team enabled filtering on primary research, improving the data clean-up.

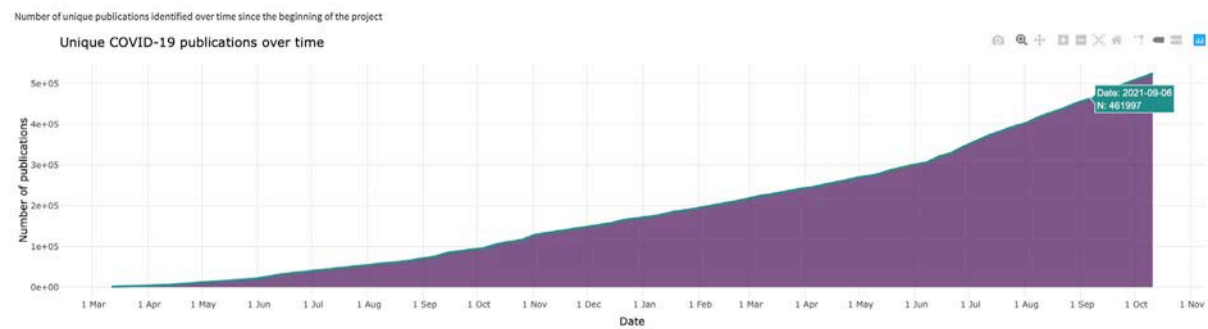


Figure 2 Number of COVID-19 publications over time from COVID-19 SOLES website

### Total number and proportions of models used in SARS-CoV-2 research

Over 460,000 papers were found in the CAMARADES COVID-19 SOLES database on Sars-CoV2 (table 1 and figure 1); Database 1 (DB1) filtered by machine learning (ML) for Primary Research resulted in 196,088 publications. After deduplication and clean-up 85,077 publications remained in subset Database 2 (DB2). ML was applied for categorizing DB2 into Animal research, *in vitro* research, and overlap of these two categories, resulting in 4,044 (4.8%), 2,673 (3.1%) and 1,193 (1.4%) publications, respectively. The search for Clinical studies with search terms resulted in 56,579 publications which comprises 66.5% of all publications in DB2, and 1,400 publications in this subset were categorized as *in vitro* research by ML as well.

A search in DB2 to find categories for the remainder of the subset resulted in 21,663 publications (25.5%) on surveys, questionnaires etc., 6,631 publications (7.8%) with mathematical/computational models and 4,186 publications (4.9%) on epidemiology, not taking overlap into account. The rest of DB2, 13,190 publications (Other, 15.5%), was not categorized further yet. Searching DB2 for research done with organoid models (all organs) resulted in 418 publications, with 119 publications using Human Airway Models (airway organoid/organotypic cell cultures). In conclusion, only 0.5% of all research publications on Sars-CoV2 in our database DB2 containing over 85,000 publications could be labeled as research with organoids, and 0.14% of the total number of publications in DB2 was performed with a human airway model.

Table 1 Categorized SARS-CoV-2 publications in CAMARADES COVID-19 SOLES DB

Database / subset	Publications	Percentage
<b>Database 1</b>	<b>461,997</b>	<b>% of 461,997</b>
Primary research (ML)	196,088	42.44%
Database 2	85,077	18.42%
<b>Database 2</b>	<b>85,077</b>	<b>% of 85,077</b>
Animal research (ML)	4,044	4.75%
In vitro research (ML)	2,673	3.14%
Overlap Animal/In vitro research (ML)	1,193	1.40%
Clinical research (search)	56,579	66.50%
Overlap Clinical/In vitro research	1,400	1.65%
Organoids (search)	418	0.49%
Human Airway Models	119	0.14%
Surveys	21,663	25.46%
Computational	6,631	7.79%
Epidemiological	4,186	4.92%
Other	13,190	15.50%

Database 2: total amount of publications on Sars-CoV2 primary research after filtering.

Categorization of DB2 by machine learning (ML) or with search terms (search)

Note that not all overlap has been analyzed in these results, the % will therefore not add up to 100%

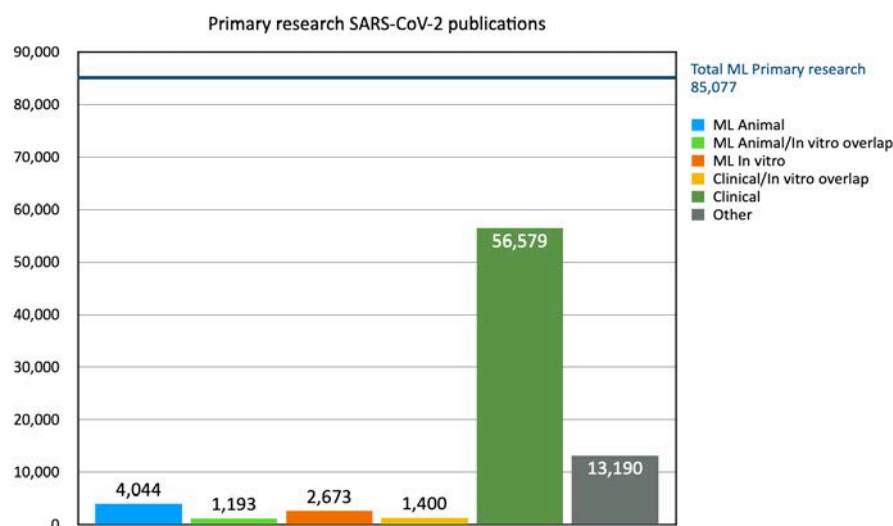


Figure 3 Numbers of SARS-CoV-2 publications in CAMARADES COVID-19 SOLES DB.

Animal & In vitro subsets were obtained with ML, Clinical and other subsets with search terms.

## SARS-CoV-2, research questions and models used for airway pathology studies

For RQ2 we performed a search to further categorize studies with animal models and organoids by three research topics: Lung Pathology, Treatment, and Vaccines. By search terms, the number of publications with animal models (1,758) was lower than found by ML in Table 1. We decided to continue with the search by terms, as for the organoid research in this database ML cannot be applied. Publications with animal models were further divided into research with non-human primates (NHP), Hamster and Mouse models as being the most used animal models as per the search results. The majority of the papers in the animal model subset was performed with mice (710 publications, 40%) followed by NHP (307, 18%). Division into research topics showed that publications with animal models were mainly on Treatment and Vaccines and less on Lung pathology. In contrast, publications in the organoid subset (418) were almost equally divided over Lung pathology and Treatment. There were no publications on vaccines found in the organoid subset.

To understand when organoid technology was applied, we studied what research questions were addressed in the organoid subset on lung pathology, which were a total of 58 publications (13.9%). These publications were assigned to one or more categories based on the main topics of the research questions mentioned in the abstracts, per year (figure 4) and per organoid type used (figure 5). Thirty-six publications (62.1%) were assigned to the Host and Immune response category (#host(cell)/\_immune\_response). These included research into how the host cells respond to the virus, like the rapid remodeling of diverse host systems found after infection with SARS-CoV-2 by Hekman et al. [15] Twenty publications (34.5%) were assigned to the category Receptor/Entry (#receptor/\_entry), studying which type of cells are most prone to infection and which receptors and pathways are important in this process, e.g., the study done by Clausen et al. identifying cellular heparan sulfate as a necessary co-factor for SARS-CoV-2 infection. [16] Twenty-two publications (37.9%) were included in the Model development category (#model\_dev/\_check). This was research done to provide evidence organoids can be infected with SARS-CoV-2 and can therefore be used as a model to study certain aspects of COVID-19 pathogenesis and pathology, like the study done by Xia et al. [17] As these processes are all intertwined, several studies were included in more than one category described above. A breakdown of the airway organoid types showed that bronchial cells were the most used (figure 5).

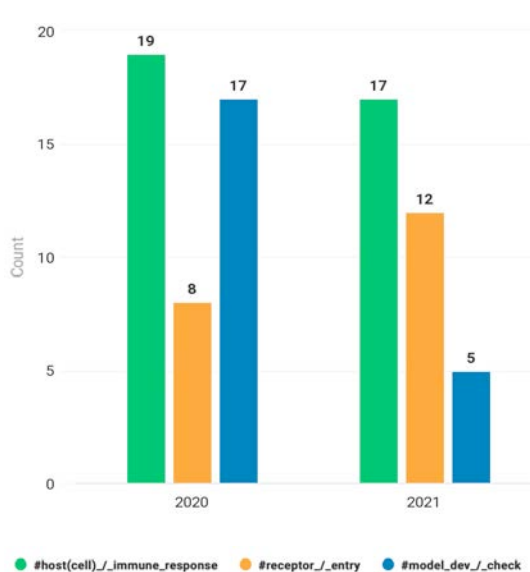


Figure 4 Organoid research question category per year

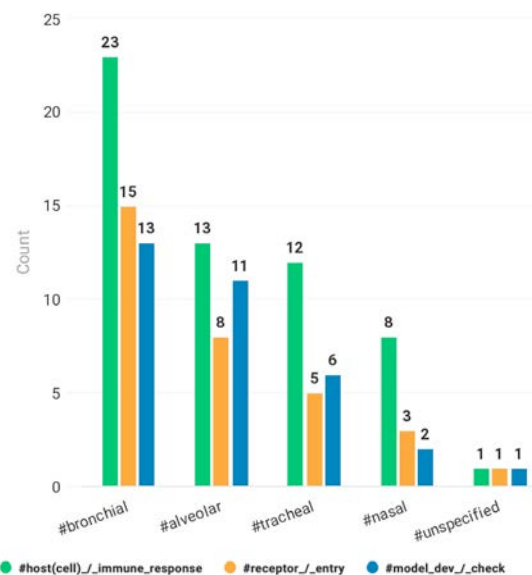


Figure 5 Organoid research question category per cell type

Next, we compared the research question categories studied in the organoid subset with the animal model search subset. Compared to the research question categories in organoids, another category was identified in the animal model studies, namely (re)infection\_/\_transmission (figure 6). [18] This category was not identified in the organoid subset. In the animal models, the topic host cell/immune response stood out as being the most frequently studied, while the topic receptor/entry was studied to a lesser extent than in the organoid subset. The topic model development was mainly found in studies with mice.

Table 2 Comparison of research topics studied in animal models and organoids in DB2

	Non human primate (NHP)	Hamster	Mouse	Total AM 1.758	Organoids 418
<b>Animal models DB2 (AM) (search terms)</b>	307	168	710	1,185 (67.4%)	
<b>Lung pathology (RQ2)</b>	25	27	46	98 (5.6%)	58 (13.9%)
<b>Treatment (RQ3)</b>	110	77	369	556 (31.6%)	47 (11.2%)
<b>Vaccines (RQ3)</b>	90	72	254	416 (23.7%)	0

Results NHP, hamster, mouse (in Animal research search subset) and Organoids for lung pathology, treatment & vaccine. Other results organoids (not analyzed): not human airway model, other pathology, comorbidities, non-antiviral treatments.

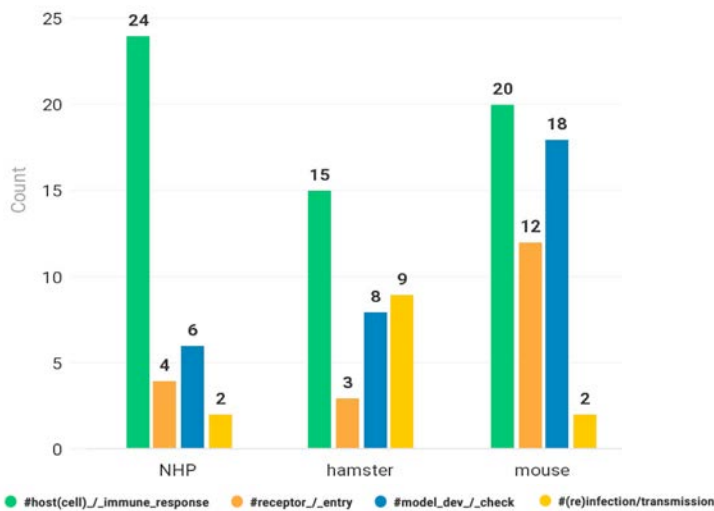


Figure 6 Research question category for NHP, hamster, mouse in lung pathology (Animal research ML)

### SARS-CoV-2 antiviral therapy studies, drugs investigated, and organoid models used.

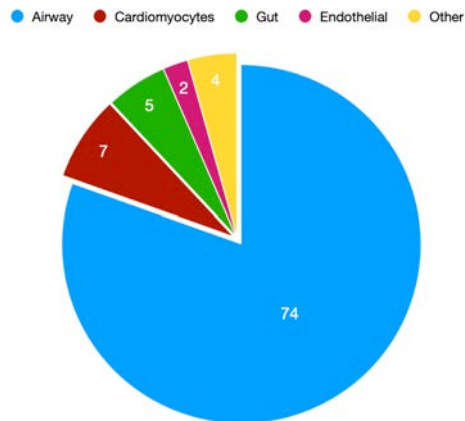
Organoid models are used in testing antiviral therapy, as shown by a search on antiviral therapy tested with organoid models that resulted in 47 publications (table 2) with 68 drugs studied (see appendix). To study the contribution of organoid models to antiviral research, we searched our database DB2 specifically for Remdesivir and (Hydroxy)Chloroquine as the most studied compounds for Sars-CoV2. As expected, most publications were from studies with patients (2,054, 83.1%), while the amount of animal studies published with these compounds was relatively low (182, 7.4%). As expected, the number of publications with organoids was lowest (37, 1.5%) (table 3).

Table 3 Publications on Remdesivir and (Hydroxy)Chloroquine

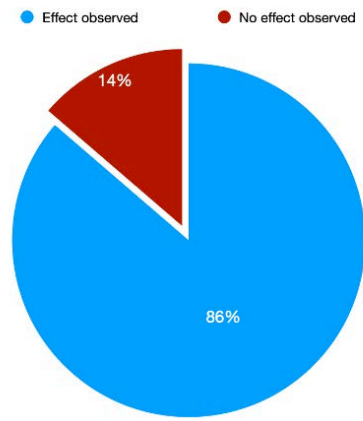
	Remdesivir	Chloroquine	Total
<b>Total hits</b>	902	1,569	2,471
<b>Organoid</b>	21 (2.3%)	16 (1.0%)	37 (1.5%)
<b>Animal</b>	90 (10.0%)	92 (5.9%)	182 (7.4%)
<b>Clinical</b>	703 (77.9%)	1,351 (86.1%)	2,054 (83.1%)

*Publications on Remdesivir and (Hydroxy)Chloroquine studied with organoid, animal, and clinical models*

Most of the antiviral drug research in human organoid models was done with airway organoid models (figure 7). In 86% of the studies, the drugs tested were successful in inhibiting Sars-CoV2 replication in the human airway models (figure 8).



*Figure 7 Number of organoid types used (Other = kidney, liver, skin, oral epithelium)*



*Figure 8 Drug effects observed in airway organoid types*

## Conclusion and Discussion

In our report we used the COVID-19 SOLES database by the Camarades team, which after filtering contained 85,077 primary research publication on Sars-CoV2, to study the proportion of clinical studies, animal models and the contribution of organoid models in SARS-CoV-2 research. Clinical research stood out with 66.5% of the publications, which is to be expected in the middle of a pandemic with large numbers of COVID-19 patients. The percentage of research publications with animal models was 4.75%, comparable to the number of publications with *in vitro* research (3.14%). In our earlier search (see Kroon et al) we reported that 60% of the COVID research was done with animal models.<sup>[9]</sup> By taking a closer look at how these figures were obtained in PubMed we found that the search filter for animal research contained the MeSH term “Primates”. As humans are categorized under this MeSH term, the original search contained clinical studies labeled as animal research. Rerunning the filter without this MeSH term resulted in 2,012 hits for the period researched by Kroon and 3,389 for the period of this study. This is more in line with the machine learning results of 4,044, and the search term results on animal models (1,758), in the COVID-10 SOLES database, which is the result of 4 database searches (PubMed, Embase, Web of Science and WHO). Running the Syrcle Animal research filter<sup>[19]</sup> in combination with the SARS-CoV-2 filter from Kroon resulted in 5,690 hits, also more in line with our results. This underlines the difficulties encountered in searching for reliable research data in the commonly used databases. Publications of Sars-CoV2 research performed with organoid models was only 0.5% of the total amount of primary research publications in our database. A reason for this could be that in case of an acute health crisis, like the current pandemic, researchers use models that are familiar and available, such as *in vitro* cell lines and animal models. Organoid and other innovative non-animal research require specific knowledge, which may also be a limiting factor for researchers to switch. However, it could be that the contribution of organoid technology to COVID research is higher than in other virology fields. Our study is the first to compare the proportion of animal models, clinical research, and *in vitro* research, and it is currently unknown if our results represent a general picture of the state of organoid use in virology. To understand how organoid technology is applied, we compared the number of publications with animal models and organoid models for lung pathology, treatment, and vaccine development. Since we did not find studies on SARS-CoV-2 vaccine development with organoids, we focused on lung pathology and treatment development to elucidate the kind of research questions where organoid technology is used compared to the kind of questions where animal models are being used. The main topics where organoid technology was used were model building, studying host(cell) response and immune response, and looking into interaction and entry of the virus with and into the cell. The proportion of studies on model development decreased, while those on receptor interaction increased from 2020 to 2021 (figure 4). For research done with animal models we could identify another category of research, namely on re-infection and transmission. Results of lung pathology research question categories for non-human primates, hamsters, and mice showed that the number of publications assigned to research question category “model development & check” was considerably higher in mouse models compared to hamsters and non-human primates. This could be explained by the fact that laboratory mice are not spontaneous animal models for SARS-CoV-2 infections, unlike e.g., hamsters, macaques, and ferrets. Genetic alteration of both the virus and the animal have been performed to increase susceptibility of mice to SARS-CoV-2.<sup>[20]</sup> Again, this could be explained by the fact that researchers stick to models that are familiar and available to them, but this would need further investigation. Hamsters were used for investigating reinfection and transmission research questions, most likely as they are spontaneous models for SARS-CoV-2 infections and easier and cheaper to use compared to non-human primates. Both non-human primates and hamster models were used to study the host response to infection.<sup>[21,22]</sup> Interestingly, a few studies did use organoids and co-cultures with immune cells to study innate immune reactions.<sup>[23, 24, 25]</sup> Adaptive immunity is harder to study *ex vivo*, however, tonsil organoids may prove useful as a model for human adaptive immune responses, and this is worth looking into further.<sup>[26, 27, 28]</sup>



One of the aims of this project was to study the contribution of organoid technology in antiviral therapy development. Antiviral therapy development is an important field where organoid technology could play a significant role in both increasing efficacy of testing as well as replacing animal models.

In this report we showed that organoid technology was applied for antiviral research. However, the overwhelming number of publications came from clinical studies. In addition, the amount of animal model studies was still higher than organoid model studies.

An additional result of this study is that finding relevant research has proven to be a huge challenge. Results of publications found not only depend on the databases and search terms used, but also heavily rely on the quality of the abstract of the publications, and on terminology used. There seems to be a lack of worldwide standardized requirements for relevant information that needs to be described in the abstract. Since title and abstract are the two main parts of a publication used for searching in the primary stages of literature research, this creates uncertainty about whether all relevant research is or can be found. The sheer numbers of COVID-19 research make it impossible to go through all the research without the help of IT-solutions. Machine learning algorithm results were useful to define primary, animal, or *in vitro* research categories, but due to lack of a specific machine learning result for publications with clinical or organoid models, these searches were done with regex search terms in R-studio. This was also used for animal models for RQ2 and 3. Searching the data in this manner has drawbacks, however it was the best way available to analyze this database, due to the fact the dataset used was comprised of search results of four different databases. This method differs from searching with MeSH terms in PubMed used by Kroon.<sup>[9]</sup> Finding the most relevant search terms to use is more difficult in regex as there are no predetermined categories, like MeSH terms in PubMed. This also means that search terms mentioned in the abstract maybe random, e.g., when searching on vaccine, the abstract may only mention that there is no vaccine yet, but the actual study may be unrelated to vaccine research. However, MeSH terms are only applicable in PubMed and have their own limitations; publications need to be assigned appropriate MeSH terms, which can take several months, and the MeSH database is updated yearly, but publications with MeSH terms already assigned are not checked if they have been affected by the database update.

The results of this study show the proportion of the different models used in primary SARS-CoV-2 research and the relatively modest contribution of organoid technology to the overall number of studies. Our study also clearly shows that organoid technology has a place in virology research. Multiple models are being used to study research questions that were previously only possible to study with *in vitro* studies or animal models. We suspect, based on the overlapping lung pathology research question categories, that more organoid technology could be implemented in this field. However, we do not have specific data to draw a final conclusion. It would be interesting to further investigate this to improve implementation of animal free techniques in virology research.

## Importance

The results of our study show a small but substantial contribution of organoid technology in primary SARS-CoV-2 research. Therefore, there is still a large need to stimulate non-animal research. The current pandemic can still be an opportunity to improve the use of non-animal models. The need to go beyond the old familiar models and find ways to get results that are more translatable to humans is crucial. This still can, and needs to be emphasized and promoted, as we still have a lot to learn about SARS-CoV-2 and other viruses. Organizing how we collect data and designing solutions to find relevant data in an expedited and uncomplicated way, will not just be necessary in the current pandemic, it is also imperative for other and future research. To find missing and vital pieces in the pathogenesis and treatment of known viral disease, and equally important, to be prepared for new outbreaks. Helping researchers with this mind shift could be achieved by finding out which factors are significant in choosing a research model and addressing those factors.



## Recommendations

### Encouraging TPI in virology: creating a mind-shift

To improve implementation of non-animal solutions for biomedical research a mind shift is necessary. We need more knowledge about crucial factors involved in the researcher's decision what model to use for which research questions, so we can try to influence this. By researching the researchers, we can investigate these factors and identify more precisely what is required to improve and accelerate the transition to non-animal models. This could be done by interviewing researchers from different fields within virology.

### Using existing data to help improve the implementation of animal-free innovations

For existing data to be of value, people need to be able to find and access it. To achieve this, we must improve finding and open sharing of information and knowledge, and promote standardization of publications, especially abstracts. We can do this by creating search filters for non-animal model publications to search the main existing databases (PubMed & Embase), like the Syrcle Animal research filters <sup>[19, 29]</sup> and developing Machine Learning/algorithms for finding and categorizing non-animal model research. Other options would be, investigating available online resources and combining those where possible to build a knowledge hub to facilitate sharing knowledge and collaboration on projects. And, to create a Systematic Online Living Evidence Summary (like Camarades DB) platform with non-animal model virus research publications. Using existing data is important to help convince researchers organoid technology can render valid results. For analysis of publications to compare outcomes of studies with organoid models versus animal models or clinical data, such as drug trials. And, to evaluate if and how research questions investigated with animal models, or parts thereof, can be replaced by organoid models. Such an analysis would be especially feasible for publications on antiviral treatment, with data on efficacy of antiviral compounds from human clinical trials used as comparison. That way, it can be determined whether data from organoids perform better than from animal models in predicting antiviral responses in patients. In addition, data on the efficacy of clinically approved drugs such as chloroquine for a new application could be done without animal studies, as such drugs can be tested in clinical trials without the need for safety studies. The question remains what knowledge is gained from animal studies with approved clinical drugs that cannot be obtained by clinical trials, or maybe with organoid technology. By increasing knowledge and availability of organoid technology and investigating what factors drive the choice for a specific research model, an effort could be made to replace or seriously reduce screening and testing of drugs on animals.

### Development of complex human models

We need to identify necessary innovations in non-animal models to be able to study virus research questions that still require animal models, e.g., adaptive immune system. Today, organoid technology cannot replace animal studies on vaccine development as that would require a model where complex interactions take place of the immune system with a pathogen. However, parts of such a response could be simulated in human models that are currently becoming available. Organoids interacting with immune cells and pathogens have already been published.<sup>[30]</sup> In addition, complex model systems such as organ-on-chips, where different organs are connected by fluids simulating the blood flow, are already available.<sup>[31]</sup> Such devices could further be developed by incorporating endothelial cells and immune cells, thereby creating a more complex physiological environment to study human host-pathogen interactions. This requires intensive collaborations of researchers from both academia and industry with different backgrounds, such as on virology, immunology, vaccinology, tissue engineering, drug development, cell biology, system biology, modelling and physics. Encouraging researchers to collaborate on development of complex human models by funding of international consortia would be helpful in taking steps towards development of innovative human models for the future.

## Recommended follow-up

1. Research the factors involved in choice of research model; what does the researcher need to choose organoid models
2. Compare organoid results with animal models & clinical data; which questions in virus research can be studied with organoids
3. Investigate innovations necessary; what is the next step in organoid technology for virus research
4. Facilitate findability and accessibility with IT; what can IT do for researchers

## References

1. Trypsteen, Wim et al. "On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: A systematic review." *PLoS pathogens* vol. 16,10 e1009037. 30 Oct. 2020, doi:10.1371/journal.ppat.1009037
2. Synowiec, Aleksandra et al. "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a Systemic Infection." *Clinical microbiology reviews* vol. 34,2 e00133-20. 13 Jan. 2021, doi:10.1128/CMR.00133-20
3. Bailey, Jarrod, Balls Michael. "Recent efforts to elucidate the scientific validity of animal-based drug tests by the pharmaceutical industry, pro-testing lobby groups, and animal welfare organisations." *BMC medical ethics* vol. 20,1 16. 1 Mar. 2019, doi:10.1186/s12910-019-0352-3
4. Robinson, N Bryce et al. "The current state of animal models in research: A review." *International journal of surgery (London, England)* vol. 72 (2019): 9-13. doi:10.1016/j.ijssu.2019.10.015
5. Van Norman, Gail A. "Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?." *JACC. Basic to translational science* vol. 4,7 845-854. 25 Nov. 2019, doi:10.1016/j.jacbts.2019.10.008
6. Sridhar, Adithya et al. "A Perspective on Organoids for Virology Research." *Viruses* vol. 12,11 1341. 23 Nov. 2020, doi:10.3390/v12111341
7. Kim, Jihoon et al. "Human organoids: model systems for human biology and medicine." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 21,10 (2020): 571-584. doi:10.1038/s41580-020-0259-3
8. Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes (2021). Learning from COVID-19. An initial exploration of the landscape and the research methods used.
9. P.Z. Kroon (2021). Animal free innovations for SARS-CoV-2 research: the role of organoid technology. Master thesis.
10. Currie, Gillian L et al. "PROTOCOL FOR A "LIVING" EVIDENCE SUMMARY OF PRIMARY RESEARCH RELATED TO COVID-19." (2020).
11. the CAMARADES COVID-SOLES group 2021, ' Building a Systematic Online Living Evidence Summary of COVID-19 Research ', Journal of EAHIL, vol. 17, no. 2, pp. 21-26. <https://doi.org/10.32384/jeahil17465>
12. CAMARADES, COVID-19 SOLES, Retrieved from <https://camarades.shinyapps.io/COVID-19-SOLES/>, Sep 07, 2021
13. Bannach-Brown, Alexandra et al. "Machine learning algorithms for systematic review: reducing workload in a preclinical review of animal studies and reducing human screening error." *Systematic reviews* vol. 8,1 23. 15 Jan. 2019, doi:10.1186/s13643-019-0942-7
14. Strobl, Stephanie, Roth, Wilfried. "Internationale wissenschaftliche Publikationsaktivität zu COVID-19" [International publication activity during the COVID-19 pandemic]. *Der Pathologe* vol. 42,2 (2021): 224-230. doi:10.1007/s00292-020-00892-8
15. Hekman, Ryan M et al. "Actionable Cytopathogenic Host Responses of Human Alveolar Type 2 Cells to SARS-CoV-2." *Molecular cell* vol. 80,6 (2020): 1104-1122.e9. doi:10.1016/j.molcel.2020.11.028
16. Clausen, Thomas Mandel et al. "SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2." *Cell* vol. 183,4 (2020): 1043-1057.e15. doi:10.1016/j.cell.2020.09.033

17. Xia, Siyu et al. "Coupled CRC 2D and ALI 3D Cultures Express Receptors of Emerging Viruses and Are More Suitable for the Study of Viral Infections Compared to Conventional Cell Lines." *Stem cells international* vol. 2020 2421689. 9 Jul. 2020, doi:10.1155/2020/2421689
18. Chandrashekar, Abishek et al. "SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques." *Science (New York, N.Y.)* vol. 369,6505 (2020): 812-817. doi:10.1126/science.abc4776
19. Hooijmans, Carlijn R et al. "Enhancing search efficiency by means of a search filter for finding all studies on animal experimentation in PubMed." *Laboratory animals* vol. 44,3 (2010): 170-5. doi:10.1258/la.2010.009117
20. Zeiss, Caroline J et al. "Animal Models of COVID-19. I. Comparative Virology and Disease Pathogenesis." *ILAR journal*, ilab007. 9 Apr. 2021, doi:10.1093/ilar/ilab007
21. Cross, Robert W et al. "Intranasal exposure of African green monkeys to SARS-CoV-2 results in acute phase pneumonia with shedding and lung injury still present in the early convalescence phase." *Virology journal* vol. 17,1 125. 18 Aug. 2020, doi:10.1186/s12985-020-01396-w
22. Osterrieder, Nikolaus et al. "Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters." *Viruses* vol. 12,7 779. 20 Jul. 2020, doi:10.3390/v12070779
23. Pandolfi, Laura et al. "Neutrophil Extracellular Traps Induce the Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Post-COVID-19 Fibrosis." *Frontiers in immunology* vol. 12 663303. 14 Jun. 2021, doi:10.3389/fimmu.2021.663303
24. Cheemarla, Nagarjuna R et al. "Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics." *The Journal of experimental medicine* vol. 218,8 (2021): e20210583. doi:10.1084/jem.20210583
25. Youk, Jeonghwan et al. "Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2." *Cell stem cell* vol. 27,6 (2020): 905-919.e10. doi:10.1016/j.stem.2020.10.004
26. Wagar, Lisa E et al. "Modeling human adaptive immune responses with tonsil organoids." *Nature medicine* vol. 27,1 (2021): 125-135. doi:10.1038/s41591-020-01145-0
27. Kenter, Amy L, and Justin M Richner. "Tonsil organoids: peering down the throat of human immunity." *Trends in immunology* vol. 42,5 (2021): 367-368. doi:10.1016/j.it.2021.03.009
28. Bar-Ephraim YE, Kretzschmar K, Clevers H. Organoids in immunological research. *Nat Rev Immunol*. 2020 May;20(5):279-293. doi: 10.1038/s41577-019-0248-y. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31853049.
29. De Vries, Rob B M et al. "A search filter for increasing the retrieval of animal studies in Embase." *Laboratory animals* vol. 45,4 (2011): 268-70. doi:10.1258/la.2011.011056
30. Noel, Gaelle et al. "Enterotoxigenic Escherichia coli is phagocytosed by macrophages underlying villus-like intestinal epithelial cells: modeling ex vivo innate immune defenses of the human gut." *Gut microbes*, vol. 9,4 0. 31 Oct. 2017, doi:10.1080/19490976.2017.1398871
31. Si, Longlong et al. "A human-airway-on-a-chip for the rapid identification of candidate antiviral therapeutics and prophylactics." *Nature biomedical engineering* vol. 5,8 (2021): 815-829. doi:10.1038/s41551-021-00718-9

## Appendix

### 1) Regex search terms

Organoid model: "organoid|air-liquid|air liquid|human airway epitheli|\\bHAE\\b|\\bALI\\b|transwell|seeded|self organiz| self-organis|mesenchymal|embryonic |stem cell| pluripotent|progenitor|iPSC|human airway model| enteroid|colonosphere|colonoid |mini-gut|gastroid|pancreatoid|hepatoid|spheroid enterosphere| neurosphere"  
(Excl.) "hemopoietic|haemopoietic|transplant|limb ischemia|hereditary|acute lung injury"  
Human Airway Model: "human airway epitheli|\\bHAE\\b|\\bALI\\b|human airway model|lung organoid"

Animal models total:

"animal model|fish model|zebrafish|zebra fish|guppy|guppies|gallus|quail|poultry|chick|fowl|\\bbird\\b| chicken|\\bpig\\b|scrofa|swine|piglet|sheep|goat|camelid|llama|alpaca|\\bdog\\b|\\bdogs\\b|\\bcat\\b|\\bcats\\b|canis lupus| felis catus|\\brat\\b|\\brats\\b|ferret|\\bmink\\b|mustel|Neogale|weasel| \\bermine|guinea pig|cavia|marmoset|chinchilla|gerbil|rodent|squirrel|chipmunk|rabbit|\\bhare\\b| hamster|hamsters|Cricetinae|Mesocricetus auratus| golden syrian|transgenic|humanized|humanised|\\bmouse\\b|\\bmice\\b|murine|musculus|non-human primate|non human primate|nhp|macaque| macaca|fascicularis|mulatta| Cynomolgus|Chlorocebus| monkey|baboon"

Animal models NHP, hamster, mouse:

NHP: "non-human primate|non human primate|nhp|macaque|macaca|fascicularis|mulatta|Cynomolgus|Chlorocebus|monkey|baboon"

Hamster: "hamster|hamsters|Cricetinae|Mesocricetus auratus|golden syrian"

Mouse: "transgenic|humanized|humanised|\\bmouse\\b|\\bmice\\b|murine|musculus"

Clinical model: "case|patient|hospital|intensive care|clinical|general practitioner|general practice|family doctor|post mortem|autopsy"

Other models: "mathematic|computation|in silico|in-silico|simulate|simulation|(deep|machine) learning"; "survey|questionnaire|questionaire|cross-sectional|cross sectional|interview|mental health|depression|telemedicine|tele-medicine|telehealth|tele-health"; "epidemiol"

Pathology: "lung|airway|respiratory tract|pulmonary|alveol|acinus|bronch|pneumocyte|endothel"  
Combined with "patholog|pathogenesis|pathogenicity|pathophysiologic|comorb|autopsy|post mortem"

Antivirals: "treatment|therap|inhibit|drug"

## 2) Research question 1, 2 & 3 article list (Organoid models)

Title	Authors (year)	Organoid model
"Lung Time No See": SARS-Cov-2 Spike Protein Changes Genetic Expression in Human Primary Bronchial Epithelial Cells After Recovery	Evans N, et al. (2021)	airway
3C-like protease inhibitors block coronavirus replication in vitro and improve survival in MERS-CoV-infected mice	Rathnayake A, et al. (2020)	airway
A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19.	De Vries M, et al. (2021)	airway
A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures.	Dinnon KH, et al. (2021)	airway
A robust SARS-CoV-2 replication model in primary human epithelial cells at the air liquid interface to assess antiviral agents.	Nguyen Dan Do T, et al. (2021)	airway
A treatment that eliminates SARS-CoV-2 replication in human airway epithelial cells and is safe for inhalation as an aerosol in healthy human subjects.	Davis MD, et al. (2020)	airway
Actionable Cytopathogenic Host Responses of Human Alveolar Type 2 Cells to SARS-CoV-2.	Hekman RM, et al. (2020)	airway
Adult Stem Cell-derived Complete Lung Organoid Models Emulate Lung Disease in COVID-19.	Tindle C, et al. (2020)	airway
Alpha-1 antitrypsin inhibits TMPRSS2 protease activity and SARS-CoV-2 infection.	Wettstein L, et al. (2021)	airway
An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice.	Sheehan T, et al. (2020)	airway
An organoid-derived bronchioalveolar model for SARS-CoV-2 infection of human alveolar type II-like cells.	Lamers MM, et al. (2021)	airway
An organotypic airway culture model for studying SARS-CoV-2 infection.	Becker M, et al. (2020)	airway
Androgen Signaling Regulates SARS-CoV-2 Receptor Levels and Is Associated with Severe COVID-19 Symptoms in Men	Samuel RM, et al. (2020)	airway
Antihypertensive drug treatment and susceptibility to SARS-CoV-2 infection in human PSC-derived cardiomyocytes and primary endothelial cells	Iwanski J, et al. (2021)	endothelial, cardiomyocytes
Aprotinin Inhibits SARS-CoV-2 Replication.	Bojkova D, et al. (2021)	airway
AT-527, a double prodrug of a guanosine nucleotide analog, is a potent inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro and a promising oral antiviral for treatment of COVID-19.	Good SS, et al. (2021)	airway
Berberine and Obatoclox Inhibit SARS-Cov-2 Replication in Primary Human Nasal Epithelial Cells In Vitro.	Varghese FS, et al. (2020)	airway
C5aR inhibition of non-immune cells suppresses inflammation and maintains epithelial integrity in SARS-CoV-2-infected primary human airway epithelia.	Posch W, et al. (2021)	airway
Carrageenan containing over-the-counter nasal and oral sprays inhibit SARS-CoV-2 infection of airway epithelial cultures.	Schutz D, et al. (2021)	airway
Characterization and Treatment of SARS-CoV-2 in Nasal and Bronchial Human Airway Epithelia	Pizzorno A, et al. (2020)	airway
Characterization of the SARS-CoV-2 Host Response in Primary Human Airway Epithelial Cells from Aged Individuals.	Bharathiraja S, et al. (2021)	airway
Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits SARS-CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol.	Wang S, et al. (2020)	airway
Cigarette smoke exposure increases ace-2 expression and sars-cov-2 infection severity in human and ferret airways and induces apoptotic cell injury in vitro.	Hussain SS, et al. (2020)	airway
Cigarette Smoke Specifically Affects Small Airway Epithelial Cell Populations and Triggers the Expansion of Inflammatory and Squamous Differentiation Associated Basal Cells.	Wohnhaas C, et al. (2020)	airway
Clinical analysis and pluripotent stem cells-based model reveal possible impacts of ACE2 and lung progenitor cells on infants vulnerable to COVID-19	Zhang Z, et al. (2021)	airway
Coldzyme maintains integrity in sars-cov-2-infected airway epithelia.	Posch W, et al. (2021)	airway
Common genetic variation in humans impacts in vitro susceptibility to SARS-CoV-2 infection.	Dobrindt K, et al. (2021)	airway
Comparison of anti-SARS-CoV-2 activity and intracellular metabolism of remdesivir and its parent nucleoside	Toa S, et al. (2021)	airway

Coupled CRC 2D and ALI 3D Cultures Express Receptors of Emerging Viruses and Are More Suitable for the Study of Viral Infections Compared to Conventional Cell Lines.	Xia S, et al. (2020)	airway
Cystic fibrosis airway cells are less susceptible to sars-cov-2 infection and have altered ph regulatory protein expression.	Saunders J, et al. (2021)	airway
Development of alveolar and airway cells from human iPS cells: toward SARS-CoV-2 research and drug toxicity testing.	Tsjuji K, et al. (2020)	airway
Diesel Particulate Matter 2.5 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Upregulation of SARS-CoV-2 Receptor during Human Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoid Development.	Jung-Hyun K, et al. (2020)	airway
Direct Exposure to SARS-CoV-2 and Cigarette Smoke Increases Infection Severity and Alters the Stem Cell-Derived Airway Repair Response.	Purkayastha A, et al. (2020)	airway
Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing.	Riva L, et al. (2020)	airway
Disparate temperature-dependent virus-host dynamics for SARS-CoV-2 and SARS-CoV in the human respiratory epithelium.	Vkovski P, et al. (2021)	airway
Drug inhibition of SARS-CoV-2 replication in human pluripotent stem cell-derived intestinal organoids	Kruger J, et al. (2020)	gut
DT388-c-peptide: Novel recombinant antiviral for prevention and early treatment of SARS-CoV-2 infection.	Predella C, et al. (2021)	airway
Dynamic innate immune response determines susceptibility to SARS-CoV-2 infection and early replication kinetics.	Cheemarla, NR, et al. (2020)	airway
Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs.	Lopez J, et al. (2021)	airway
Effect of therapeutics on the modulation of ACE2 expression in airway epithelium: Implications for covid-19.	Singhera GK, et al. (2021)	airway
Effects of Asthma and Human Rhinovirus A16 on the Expression of SARS-CoV-2 Entry Factors in Human Airway Epithelium.	Murphy RC, et al. (2020)	airway
Electronic Cigarette Aerosol Is Cytotoxic and Increases ACE2 Expression on Human Airway Epithelial Cells: Implications for SARS-CoV-2 (COVID-19)	McAlinden K, et al. (2021)	airway
Ethacridine inhibits SARS-CoV-2 by inactivating viral particles.	Xiaoquan L, et al. (2020)	airway
Experimental and natural evidence of SARS-CoV-2 infection-induced activation of type I interferon responses.	Banerjee A, et al. (2021)	airway
Expression of the SARS-CoV-2 ACE2 Receptor in the Human Airway Epithelium.	Rostami ZH, et al. (2020)	airway
Fighting the storm: could novel anti-TNF $\alpha$ and anti-IL-6 C. sativa cultivars tame cytokine storm in COVID-19?	Kovalchuk A, et al. (2021)	skin
Gene expression and in situ protein profiling of candidate SARS-CoV-2 receptors in human airway epithelial cells and lung tissue.	Aguiar JA, et al. (2021)	airway
High-content screening of Thai medicinal plants reveals Boesenbergia rotunda extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents.	Kanjanasirirat P, et al. (2020)	airway
High-throughput human primary cell-based airway model for evaluating influenza, coronavirus, or other respiratory viruses in vitro.	Gard AL, et al. (2021)	airway
Host and viral determinants for efficient SARS-CoV-2 infection of the human lung.	Chu H, et al. (2021)	airway
Host metabolism dysregulation and cell tropism identification in human airway and alveolar organoids upon SARS-CoV-2 infection.	Rongjuan P, et al. (2020)	airway
Host-Pathogen Responses to Pandemic Influenza H1N1pdm09 in a Human Respiratory Airway Model	Pharo EA, et al. (2020)	airway
HTCC as a polymeric inhibitor of SARS-CoV-2 and MERS-CoV.	Milewska A, et al. (2021)	airway
Human coronaviruses 229E and OC43 replicate and induce distinct anti-viral responses in differentiated primary human bronchial epithelial cells.	Loo SL, et al. (2020)	airway
Human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte platform screens inhibitors of SARS-CoV-2 infection.	Williams TL, et al. (2021)	cardiomyocytes
Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Lung Epithelial System for SARS-CoV-2 Infection Modeling and Its Potential in Drug Repurposing.	Surendran H, et al. (2020)	airway
Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction.	Katsura H, et al. (2020)	airway
Humanized COVID-19 decoy antibody effectively blocks viral entry and prevents SARS-CoV-2 infection.	Huang KY, et al. (2020)	airway



Hydroxychloroquine use against SARS-CoV-2 infection in non-human primates	Maisonnasse P, et al. (2020)	airway
Identification of Cross-Reactive CD8+ T Cell Receptors with High Functional Avidity to a SARS-CoV-2 Immunodominant Epitope and Its Natural Mutant Variants.	Chao H, et al. (2020)	airway
Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids.	Han Y, et al. (2021)	airway
In search of preventive strategies: novel high-CBD Cannabis sativa extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues.	Wang B, et al. (2020)	airway, gut, oral epithelium
In vitro Characterisation of SARS-CoV-2 and Susceptibility of Domestic Ferrets ( <i>Mustela putorius furo</i> ).	Marsh GA, et al. (2021)	airway
In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age.	Lieberman NAP, et al. (2020)	airway
In well-differentiated primary human bronchial epithelial cells, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 induce expression of furin.	O'Sullivan MJ, et al. (2021)	airway
Inactivation of Material from SARS-CoV-2-Infected Primary Airway Epithelial Cell Cultures.	Barrow KA, et al. (2021)	airway
Infection of human Nasal Epithelial Cells with SARS-CoV-2 and a 382-nt deletion isolate lacking ORF8 reveals similar viral kinetics and host transcriptional profiles.	Gamage AM, et al. (2020)	airway
Influenza virus infection increases ACE2 expression and shedding in human small airway epithelial cells.	Schweitzer KS, et al. (2020)	airway
Inhaled corticosteroids downregulate the SARS-CoV-2 receptor ACE2 in COPD through suppression of type I interferon.	Finney LJ, et al. (2020)	airway
Inhibition of Coronavirus Entry In Vitro and Ex Vivo by a Lipid-Conjugated Peptide Derived from the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein HRC Domain.	Outlaw VK, et al. (2020)	airway
Inhibition of coronavirus infection by a synthetic STING agonist in primary human airway system.	Zhu Q, et al. (2021)	airway
Inter-subject variation in ACE2 protein expression in human airway epithelia and its relationship to SARS-CoV-2 infection.	Li K, et al. (2021)	airway
Isolation of human coronaviruses OC43, HKU1, NL63, and 229E in Yamagata, Japan, using primary human airway epithelium cells cultured by employing an air-liquid interface culture.	Komabayashi K, et al. (2021)	airway
JAK inhibitors dampen activation of interferon-stimulated transcription of ACE2 isoforms in human airway epithelial cells.	Lee HK, et al. (2021)	airway
Long-Term Modeling of SARS-CoV-2 Infection of In Vitro Cultured Polarized Human Airway Epithelium.	Hao S, et al. (2020)	airway
Lung cancer models reveal SARS-CoV-2-induced EMT contributes to COVID-19 pathophysiology.	Stewart CA, et al. (2020)	airway
Mechanism of baricitinib supports artificialintelligence-predicted testing in COVID-19 patients	Stebbing J, et al. (2020)	liver
Morphogenesis and cytopathic effect of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelial cells	Zhu N, et al. (2020)	airway
Morphological Cell Profiling of SARS-CoV-2 Infection Identifies Drug Repurposing Candidates for COVID-19.	Mirabelli C, et al. (2020)	airway
Neutrophil Extracellular Traps Induce the Epithelial-Mesenchymal Transition: Implications in Post-COVID-19 Fibrosis.	Pandolfi L, et al. (2020)	airway
Neutrophils significantly enhance pro-inflammatory cytokine release from airway epithelial cells in response to sars-COV-2 infection.	Calvert BA, et al. (2020)	airway
Off-target In Vitro Profiling Demonstrates that Remdesivir Is a Highly Selective Antiviral Agent.	Xu Y, et al. (2021)	airway
Polyphenylene carboxymethylene (PPCM) microbicide repurposed as antiviral against SARS-CoV-2. Proof of concept in primary human undifferentiated epithelial cells.	Escaffre O, et al. (2021)	airway
Preclinical evaluation of Imatinib does not support its use as an antiviral drug against SARS-CoV-2.	Touret F, et al. (2021)	airway
Progenitor identification and SARS-CoV-2 infection in long-term human distal lung organoid cultures.	Salahudeen AA, et al. (2020)	airway
Protease Inhibitors: Candidate Drugs to Inhibit Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication	Yamaya M, et al. (2020)	airway
Remdesivir Inhibits SARS-CoV-2 in Human Lung Cells and Chimeric SARS-CoV Expressing the SARS-CoV-2 RNA Polymerase in Mice	Pruijssers AJ, et al. (2020)	airway
Replication of SARS-CoV-2 in human respiratory epithelium.	Milewska A, et al. (2020)	airway

Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Human Respiratory Epithelium.	Milewska A, et al. (2020)	airway
Resveratrol and Pterostilbene Inhibit SARS-CoV-2 Replication in Air-Liquid Interface Cultured Human Primary Bronchial Epithelial Cells.	Ter Ellen BM, et al. (2021)	airway
Rethinking Remdesivir: Synthesis, Antiviral Activity and Pharmacokinetics of Oral Lipid Prodrugs.	Schooley RT, et al. (2020)	airway
Revealing Tissue-Specific SARS-CoV-2 Infection and Host Responses using Human Stem Cell-Derived Lung and Cerebral Organoids	Tiwari SK, et al. (2021)	airway
Role of Cigarette Smoke on Angiotensin-Converting Enzyme-2 Protein Membrane Expression in Bronchial Epithelial Cells Using an Air-Liquid Interface Model.	Caruso M, et al. (2021)	airway
SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor	Hoffmann M, et al. (2020)	airway
SARS-CoV-2 D614G variant exhibits efficient replication ex vivo and transmission in vivo.	Hou YJ, et al. (2020)	airway
SARS-CoV-2 entry into human airway organoids is serine protease-mediated and facilitated by the multibasic cleavage site.	Mykytyn AZ, et al. (2021)	airway
SARS-CoV-2 induces double-stranded RNA-mediated innate immune responses in respiratory epithelial derived cells and cardiomyocytes.	Li Y, et al. (2020)	airway
SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2.	Clausen TM, et al. (2020)	airway
SARS-CoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response.	Huang J, et al. (2020)	airway
SARS-CoV-2 infection of primary human lung epithelium for COVID-19 modeling and drug discovery.	Mulay A, et al. (2021)	airway
SARS-CoV-2 infection rewires host cell metabolism and is potentially susceptible to mTORC1 inhibition.	Mullen PJ, et al. (2021)	airway
SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes.	Lamers MM, et al. (2020)	airway
SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues.	Ziegler CGK, et al. (2021)	airway
SARS-CoV-2 triggers an MDA-5-dependent interferon response which is unable to control replication in lung epithelial cells.	Rebendenne A, et al. (2021)	airway
SARS-CoV-2-mediated dysregulation of metabolism and autophagy uncovers host-targeting antivirals.	Gassen NC, et al. (2020)	airway, gut
Single cell resolution of SARS-CoV-2 tropism, antiviral responses, and susceptibility to therapies in primary human airway epithelium.	Fiege JK, et al. (2021)	airway
Single-cell longitudinal analysis of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelium identifies target cells, alterations in gene expression, and cell state changes.	Ravindra NG, et al. (2021)	airway
Structure-based phylogeny identifies avoralstat as a TMPRSS2 inhibitor that prevents SARS-CoV-2 infection in mice.	Sun YJ, et al. (2021)	airway
Suramin inhibits SARS-CoV-2 infection in cell culture by interfering with early steps of the replication cycle	Da Silva CS, et al. (2020)	airway
The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets.	Peacock TP, et al. (2021)	airway
The New Generation hDHODH Inhibitor MEDS433 Hinders the In Vitro Replication of SARS-CoV-2 and Other Human Coronaviruses.	Calistri A, et al. (2021)	kidney
The potential involvement of JAK-STAT signaling pathway in the COVID-19 infection assisted by ACE2.	Luo J, et al. (2020)	airway
The rocaglate CR-31-B (-) inhibits SARS-CoV-2 replication at non-cytotoxic, low nanomolar concentrations in vitro and ex vivo.	Muller C, et al. (2020)	airway
The SARS-CoV-2 Cytopathic Effect Is Blocked by Lysosome Alkalinizing Small Molecules.	Gorshkov K, et al. (2020)	airway
The SARS-CoV-2 Transcriptome and the Dynamics of the S Gene Furin Cleavage Site in Primary Human Airway Epithelia.	Zou W, et al. (2021)	airway
Three-Dimensional Human Alveolar Stem Cell Culture Models Reveal Infection Response to SARS-CoV-2.	Youk J, et al. (2020)	airway
TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells	Bestle D, et al. (2020)	airway
Transcriptional Profiling of Immune and Inflammatory Responses in the Context of SARS-CoV-2 Fungal Superinfection in a Human Airway Epithelial Model.	Nicolas de Lamballerie C, et al. (2020)	airway

Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant.	Deng X, et al. (2020)	airway
Type 2 inflammation modulates ACE2 and TMPRSS2 in airway epithelial cells.	Kimura H, et al. (2020)	airway
Type 2 inflammation reduces ACE2 protein in bronchial and nasal epithelial cells	Kimura H, et al. (2021)	airway
Type I and Type III IFN Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures	Vanderheiden A, et al. (2020)	airway
Type I interferon susceptibility distinguishes SARS-CoV-2 from SARS-CoV.	Lokugamage KG, et al. (2020)	airway
Virucidal and antiviral activity of astodimer sodium against SARS-CoV-2 in vitro.	Paull JRA, et al. (2021)	airway
Visualization of SARS-CoV-2 using Immuno RNA-Fluorescence in Situ Hybridization.	Kula-Pacurar A, et al. (2020)	airway

### 3) Research question 2b article list (Animal models)

Title	Authors	Year	Animal model
A Human-Immune-System mouse model for COVID-19 research (DRAGA mouse: HLA-A2.HLA-DR4.Rag1KO.IL-2Rc KO.NOD)	Brumeanu T, et al.	2020	mouse
A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis	Sun S, et al.	2020	mouse
A mouse-adapted model of SARS-CoV-2 to test COVID-19 countermeasures	Dinnon K, et al.	2020	mouse
A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies	Hassan A, et al.	2020	mouse
Age-Dependent Progression of SARS-CoV-2 Infection in Syrian Hamsters	Osterrieder N, et al.	2020	hamster
Age-determined expression of priming protease TMPRSS2 and localization of SARS-CoV-2 in lung epithelium.	Schuler B, et al.	2020	mouse
Cell-Type Apoptosis in Lung during SARS-CoV-2 Infection.	Liu Y, et al.	2021	NHP
Cellular events of acute, resolving or progressive COVID-19 in SARS-CoV-2 infected non-human primates.	Fahlberg M, et al.	2020	NHP
Cellular tropism of SARS-CoV-2 in the respiratory tract of Syrian hamsters and B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prln/J transgenic mice.	Yen H, et al.	2021	hamster, mouse
Characterization of an attenuated SARS-CoV-2 variant with a deletion at the S1/S2 junction of the spike protein.	Wang P, et al.	2021	hamster, mouse
Characterization of Virus Replication, Pathogenesis, and Cytokine Responses in Syrian Hamsters Inoculated with SARS-CoV-2.	Yang S, et al.	2021	hamster
Co-infection by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and influenza A(H1N1) pdm09 virus enhances the severity of pneumonia in golden Syrian hamsters.	Zhang A, et al.	2020	hamster, mouse
Comparative analysis of ACE2 protein expression in rodent, non-human primate, and human respiratory tract at baseline and after injury: A conundrum for COVID-19 pathogenesis.	Soni S, et al.	2021	NHP, mouse
Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19.	Salguero F, et al.	2021	NHP
Comparison of SARS-CoV-2 Variants of Concern 202012/01 (U.K. Variant) and D614G Variant Transmission by Different Routes in Syrian Hamsters.	Mohandas S, et al.	2021	hamster
Contribution of SARS-CoV-2 Accessory Proteins to Viral Pathogenicity in K18 Human ACE2 Transgenic Mice.	Silvas J, et al.	2021	mouse
Disruption of Adaptive Immunity Enhances Disease in SARS-CoV-2 Infected Syrian Hamsters.	Brocato R, et al.	2020	hamster
Effects of cigarette smoking on SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression in the respiratory epithelium?	Heijnk I, et al.	2020	mouse
Endothelial cell damage is the central part of COVID-19 and a mouse model induced by injection of the S1 subunit of the spike protein.	Nuovo G, et al.	2020	mouse
Endothelial cell infection and dysfunction, immune activation in severe COVID-19.	Qin Z, et al.	2021	NHP, mouse

Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection.	Woolsey C, et al.	2020	NHP
Expressions and significances of the angiotensin-converting enzyme 2 gene the receptor of SARS-CoV-2 for COVID-19	Zhou F, et al.	2020	mouse
Gender associates with both susceptibility to infection and pathogenesis of SARS-CoV-2 in Syrian hamster.	Yuan L, et al.	2021	hamster
Generation of a Broadly Useful Model for COVID-19 Pathogenesis Vaccination and Treatment	Zhuang S, et al.	2020	mouse
H1N1 exposure during the convalescent stage of SARS-CoV-2 infection results in enhanced lung pathologic damage in hACE2 transgenic mice.	Li H, et al.	2021	mouse
Hamster and ferret experimental infection with intranasal low dose of a single strain of SARS-CoV-2.	MonchatreLeroy E, et al.	2021	hamster
High levels of soluble CD25 in COVID-19 severity suggest a divergence between antiviral and pro-inflammatory T-cell responses.	Xie M, et al.	2021	mouse
High-Fat High-Sucrose Diet Increases ACE2 Receptor Expression in Lung and Pancreatic Islets in SIV-Infected Rhesus Macaques: Implications for Increased Risk for SARS-CoV-2 Infection	Levitt D, et al.	2021	NHP
Highly susceptible SARS-CoV-2 model in CAG promoter-driven hACE2 transgenic mice.	Asaka M, et al.	2021	mouse
Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease	Golden J, et al.	2020	mouse
Hypoxia induces expression of angiotensin-converting enzyme II in alveolar epithelial cells: Implications for the pathogenesis of acute lung injury in COVID-19.	Sturrock A, et al.	2021	mouse
IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection.	Rosa B, et al.	2021	NHP
Induction of Pro-Inflammatory Cytokines TNF, IL-6, and HMGB1 by SARS-CoV-2 Spike Proteins in Mice and in Murine Macrophage Cultures	Sam G, et al.	2021	mouse
Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques	Shan C, et al.	2020	NHP
Infectious Clones Produce SARS-CoV-2 That Causes Severe Pulmonary Disease in Infected K18-Human ACE2 Mice.	Liu X, et al.	2021	mouse
Intranasal exposure of African green monkeys to SARS-CoV-2 results in acute phase pneumonia with shedding and lung injury still present in the early convalescence phase	Cross R, et al.	2020	NHP
Is Cross-Reactive Immunity Triggering COVID-19 Immunopathogenesis?	Beretta A, et al.	2020	NHP
K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19.	Yinda C, et al.	2021	mouse
Lung expression of human angiotensin-converting enzyme 2 sensitizes the mouse to SARS-CoV-2 infection.	Han K, et al.	2021	mouse
Mice with induced pulmonary morbidities display severe lung inflammation and mortality following exposure to SARS-CoV-2.	Ralach R, et al.	2021	mouse
Multi-organ histopathological changes in a mouse hepatitis virus model of COVID-19.	Paidas M, et al.	2021	mouse
Myeloid cell interferon responses correlate with clearance of SARS-CoV-2.	Singh D, et al.	2021	NHP
Neuroinvasion and Encephalitis Following Intranasal Inoculation of SARS-CoV-2 in K18-hACE2 Mice.	Kumari P, et al.	2021	mouse
Oral SARS-CoV-2 inoculation establishes subclinical respiratory infection with virus shedding in golden Syrian hamsters.	Lee A, et al.	2020	hamster
Overexpression of the SARS-CoV-2 receptor ACE2 is induced by cigarette smoke in bronchial and alveolar epithelia.	Liu A, et al.	2020	mouse
Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters.	Sia S, et al.	2020	hamster
Pathogenesis of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice Expressing Human Angiotensin-Converting Enzyme 2	Jiang R, et al.	2020	mouse
Predictive Value of Precision-Cut Lung Slices for the Susceptibility of Three Animal Species for SARS-CoV-2 and Validation in a Refined Hamster Model.	Gerhards N, et al.	2021	hamster
Prior aerosol infection with lineage A SARS-CoV-2 variant protects hamsters from disease, but not reinfection with B.1.351 SARS-CoV-2 variant.	Yinda C, et al.	2021	hamster
Pro-inflammatory microenvironment and systemic accumulation of CXCR3+ cell exacerbate lung pathology of old rhesus macaques infected with SARS-CoV-2.	Zheng H, et al.	2021	NHP

Protection against reinfection with D614- or G614-SARS-CoV-2 isolates in golden Syrian hamster.	Brustolin M, et al.	2021	hamster
Pulmonary fibroproliferative response in old mice that survive acute lung injury by mouse-adapted sars-cov-2.	Montgomery S, et al.	2021	mouse
Q493K and Q498H substitutions in Spike promote adaptation of SARS-CoV-2 in mice.	Huang K, et al.	2021	mouse
Quantitative proteomics of hamster lung tissues infected with SARS-CoV-2 reveal host factors having implication in the disease pathogenesis and severity.	Suresh V, et al.	2021	hamster
Rescue of SARS-CoV-2 from a Single Bacterial Artificial Chromosome	Ye C, et al.	2020	hamster
Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2	Munster V, et al.	2020	NHP
Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets.	Singh D, et al.	2021	NHP
Role of the neutrophil chemoattractant CXCL5 in the SARS-CoV-2 infection-induced lung inflammatory innate immune response determined using an in vivo hACE2 transfection mouse model.	Liang Y, et al.	2020	mouse
SARS-CoV-2 B.1.1.7 Infection of Syrian Hamster Does Not Cause More Severe Disease, and Naturally Acquired Immunity Confers Protection	Nuñez I, et al.	2021	hamster
SARS-CoV-2 Bearing a Mutation at the S1/S2 Cleavage Site Exhibits Attenuated Virulence and Confers Protective Immunity.	Sasaki M, et al.	2021	hamster
SARS-CoV-2 Causes a Systemically Multiple Organs Damages and Dissemination in Hamsters.	Song Z, et al.	2020	hamster
SARS-CoV-2 envelope protein causes acute respiratory distress syndrome (ARDS)-like pathological damages and constitutes an antiviral target.	Xia B, et al.	2021	mouse
SARS-CoV-2 infection aggravates chronic comorbidities of cardiovascular diseases and diabetes in mice.	Ma Y, et al.	2021	mouse
SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys	Speranza E, et al.	2020	NHP
SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques.	Chandrashekar A, et al.	2020	NHP
SARS-CoV-2 infection, neuropathogenesis and transmission among deer mice: Implications for spillback to New World rodents.	Fagre A, et al.	2021	mouse
SARS-CoV-2 Infects Endothelial Cells In Vivo and In Vitro.	Liu F, et al.	2021	NHP, mouse
SARS-CoV-2 rapidly adapts in aged BALB/c mice and induces typical pneumonia.	Zhang Y, et al.	2021	mouse
SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues	Ziegler C, et al.	2020	NHP
SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues	Ziegler C, et al.	2020	mouse
Sex Differences in Lung Imaging and SARS-CoV-2 Antibody Responses in a COVID-19 Golden Syrian Hamster Model.	Dhakal S, et al.	2021	hamster
Single intratracheal exposure to SARS-CoV-2 S1 spike protein induces acute lung injury in K18-hACE2 transgenic mice	Pavel S, et al.	2021	mouse
Single-cell RNA analysis on ACE2 expression provides insights into SARS-CoV-2 potential entry into the bloodstream and heart injury	Wei G, et al.	2020	mouse
Single-cell RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys.	Speranza E, et al.	2021	NHP
Single-cell transcriptomic atlas of primate cardiopulmonary aging.	Ma S, et al.	2020	NHP
Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness and neutralization susceptibility	Shi P, et al.	2020	hamster
Spike protein of SARS-CoV-2 activates macrophages and contributes to induction of acute lung inflammation in male mice.	Cao X, et al.	2021	mouse
Spike Protein of SARS-CoV-2 Activates Macrophages and Contributes to Induction of Acute Lung Inflammations in Mice	Cao X, et al.	2021	mouse
STAT2 signaling restricts viral dissemination but drives severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters.	Boudewijns R, et al.	2020	hamster, mouse
Surgical mask partition reduces the risk of non-contact transmission in a golden Syrian hamster model for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)	Chan J, et al.	2020	hamster

Synergism of TNF- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes.	Karki R, et al.	2020	mouse
Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development	Iwatsuki I, et al.	2020	hamster
The expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and CD147, and protease TMPRSS2 in human and mouse brain cells and mouse brain tissues.	Qiao J, et al.	2020	mouse
The G614 pandemic SARS-CoV-2 variant is not more pathogenic than the original D614 form in adult Syrian hamsters.	Stauff C, et al.	2021	hamster
The gastrointestinal tract is an alternative route for SARS-CoV-2 infection in a nonhuman primate model.	Jiao L, et al.	2020	NHP
The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice.	Deng B, et al.	2020	mouse
The Post-Acute Phase of SARS-CoV-2 Infection in Two Macaque Species Is Associated with Signs of Ongoing Virus Replication and Pathology in Pulmonary and Extrapulmonary Tissues.	Böszörményi K, et al.	2021	NHP
Tissue Distribution of ACE2 Protein in Syrian Golden Hamster ( <i>Mesocricetus auratus</i> ) and Its Possible Implications in SARS-CoV-2 Related Studies.	Suresh V, et al.	2020	hamster
Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques	Aid M, et al.	2020	NHP
Vasculitis and Neutrophil Extracellular Traps in Lungs of Golden Syrian Hamsters With SARS-CoV-2.	Becker K, et al.	2021	hamster
Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques: A nonhuman primate model of COVID-19 progression.	Zheng H, et al.	2020	NHP

#### 4) Research question 3 overview Organoid types and effects for drugs screened

Drug	Action	Organoid model used
3C-like protease inhibitors	Protease inhibitor	airway
ACE2 antibody	ACE2 antibody	cardiomyocytes
ACE2-Fc fusion protein	ACE2 antibody	airway
Alpha-1 antitrypsin	Protease inhibitor	airway
Amiodarone (hydrochloride)	K & Ca Channel inhibitor	airway
Apilimod	Immunomodulatory	airway
Aprotinin	Protease inhibitor	airway
Astodimer sodium	Virucidal	airway
AT-511 (free base form of AT-527)	Guanine analog	airway
AT-527	Guanine analog	airway
Avoralstat	Protease inhibitor	airway
Baricitinib	Kinase inhibitor	liver
Benzotropine	Dopamine inhibitor	cardiomyocytes
Berberine	Phytoalexin	airway
Boesenbergia rotunda extract	Anti-inflammatory	airway
Bosutinib	Kinase inhibitor	airway
Bovine lactoferrin	Dopamine inhibitor	airway
Camostat	Protease inhibitor	cardiomyocytes

Cannabis sativa extracts	Cannabinoid	airway, gut, oral epithelium
Cannabis sativa extracts	Cannabinoid	skin
Carrageenan	Cell entry blocker	airway
Chloroquine	Immunomodulatory	airway
Cholesterol-25-hydroxylase (CH25H)	Cell entry blocker	airway
Clofazimine	Bacterial inhibitor	airway
Clomipramine	Immunomodulatory	airway
Coldzyme	Blocks viral binding	airway
Corticosteroids	Immunomodulatory	airway
CR-31-B	RNA helicase inhibitor	airway
dimeric amidobenzimidazole (diABZI)	STING receptor agonist	airway
Domperidone	Dopamine inhibitor	airway
DX600	ACE2 blocker	cardiomyocytes
E64d	Protease inhibitor	cardiomyocytes
EIDD-1931 (nucleoside molnupiravir)	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Entecavir (hydrate)	Transcription inhibitor	airway
Ethacridine	Antiseptic	airway
Famotidine	Histamine blocker	gut
Fedratinib	Kinase inhibitor	airway
Gilteritinib	Kinase inhibitor	airway
HTCC	Cell entry blocker	airway
Hycanthon	Immunomodulatory	airway
Hydrochloroquine	Immunomodulatory	airway
Hydroxychloroquine	Immunomodulatory	airway
Hydroxychloroquine	Immunomodulatory	airway
IFN ( $\beta$ 1 and $\lambda$ 1)	Immunomodulatory	airway
IFNB1	Immunomodulatory	airway
Imatinib	Kinase inhibitor	airway
Imatinib	Kinase inhibitor	airway
Interferon- $\lambda$ 1a (IFN- $\lambda$ 1a)	Immunomodulatory	airway
Ipratropium bromide	Muscarinic receptor agonist	airway
Lipid-Conjugated Peptide	Cell entry blocker	airway
Lisinopril	ACE2 blocker	endothelial, cardiomyocytes
Lomitapide	Kinase inhibitor	airway



Losartan	Angiotensin receptor blocker	endothelial, cardiomyocytes
Lufotrelvir	Protease inhibitor	airway
MDL 28170	Cathepsin inhibitor	airway
MEDS433	hDHODH inhibitor	kidney
Metoclopramide	Dopamine inhibitor	airway
MK-2206	Kinase inhibitor	airway, gut
Molnupravir (NHC/EIDD-2801)	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Mycophenolic acid (MPA)	IMPDH inhibitor	airway
Niclosamide	Antiparasitic	airway, gut
Obatoclox	Bcl2 inhibitor	airway
ONO 5334	Cathepsin inhibitor	airway
Optate	Blocks viral replication	airway
Polyphenylene carboxymethylene	Virucidal	airway
Pterostilbene	Phytoalexin	airway
Quinacrine dihydrochloride	Immunomodulatory	airway
Rapamycin	mTor inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	gut
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Remdesivir (nucleosides)	viral RNA polymerase inhibitor	airway
Resveratrol	Phytoalexin	airway
ROC-325	Immunomodulatory	airway
S1RA	Sigma-1 receptor antagonist	airway
SERPINA1/alpha-1 antitrypsin	Protease inhibitor	airway
Suramin	Antiparasitic	airway
Thioguanine	Guanine analog	airway
Verteporfin	Immunomodulatory	airway
Z-FA-FMK	Protease inhibitor	airway

