

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 07 september 2015  
**KENMERK** CGM/150907-04  
**ONDERWERP** Advies 'Klinische malariavaccinatie studie met genetisch gemodificeerde Plasmodium falciparum en muggen (Radboud UMC)'

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 15-009 met de titel 'Exposure of human test subjects to live genetically attenuated *Pf*Δb9Δslarp malaria parasites' van het Radboud Universitair Medisch Centrum te Nijmegen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase I en II vaccinatie studie met genetisch gemodificeerde (gg-) parasieten. Het betreft een dubbele deletiemutant van *Plasmodium falciparum* ('*Pf*Δb9Δslarp'). Vaccinaties zullen plaatsvinden door middel van injecties of beten van muggen die met de gg-parasieten geïnfecteerd zijn.

*P. falciparum* veroorzaakt malaria en is alleen pathogeen voor de mens. Besmetting en overdracht vinden plaats door muggen van het geslacht *Anopheles*. De enige in Nederland voorkomende mug die de parasiet kan overdragen, is *A. plumbeus*. Gedurende de koelere wintermaanden zijn de muggen van *A. plumbeus* niet in Nederland aanwezig.

In '*Pf*Δb9Δslarp' zijn de *b9* en *slarp* genen verwijderd waardoor de parasiet zijn levenscyclus in de lever niet kan voltooien en het bloedstadium niet kan bereiken. De COGEM is daarom van mening dat '*Pf*Δb9Δslarp' biologisch ingeperkt en hoogst waarschijnlijk niet pathogeen is.

In het theoretische geval dat een proefpersoon een infectie met '*Pf*Δb9Δslarp' door zou maken, acht de COGEM de kans dat de parasiet zich kan verspreiden verwaarloosbaar klein, omdat gedurende de studie een deugdelijke monitoring van de proefpersonen plaatsvindt en bij gebleken infectie de parasiet goed met geneesmiddelen te behandelen is. Daarnaast kan '*Pf*Δb9Δslarp' zich niet blijvend in Nederland handhaven omdat de muggen van de in Nederland voorkomende vector *A. plumbeus* alleen in de zomermaanden aanwezig zijn.

Concluderend is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan de hierboven genoemde klinische fase I en II studies met '*Pf*Δb9Δslarp', verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

# Klinische malariavaccinatie studie met muggen en een deletiemutant van *Plasmodium falciparum*

## COGEM advies CGM/150907-04

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een vergunningaanvraag betreffende fase I en fase II vaccinatie studies met de levende geattenueerde malariaparasiët *Plasmodium falciparum*. De studies hebben als doel de veiligheid en effectiviteit van het vaccin te testen, en zullen uitgevoerd worden in het Radboud Universitair Medisch Centrum te Nijmegen (Radboud UMC).

Een soortgelijke aanvraag is ook gedaan door het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC). Beide aanvragen betreffen hetzelfde genetisch gemodificeerde organisme (ggo) en kennen nagenoeg dezelfde studie-opzet. Het enige verschil bestaat uit het feit dat in het Radboud UMC naast vaccinatie door middel van parenterale injecties, tevens vaccinatie door middel van muggenbeten zal plaatsvinden. De COGEM is door Bureau GGO gevraagd om voor elke vergunningaanvraag een apart advies uit te brengen. Het onderhavige advies betreft de studie in het Radboud UMC.

#### 1.1 Parasieten

Parasieten zijn eukaryotische organismen die zich voor het volbrengen van hun ontwikkelingscyclus voeden ten koste van een ander organisme én zich daarbij tijdelijk of permanent in of op hun gastheer vestigen. Een parasiet doorloopt een aantal fasen in zijn ontwikkeling voordat hij het volwassen stadium bereikt. Deze ontwikkelingsstadia worden gekenmerkt door gedaantewisselingen (metamorfosen).<sup>1</sup>

Er bestaan parasieten die maar één gastheersoort parasiteren en parasieten die van gastheersoort wisselen. In geval van gastheerwisseling vinden de verschillende stadia in de levenscyclus van de parasiet plaats in verschillende gastheersoorten: in de tussengastheer vindt ongeslachtelijke vermenigvuldiging plaats en in de eindgastheer ontwikkelt de parasiet zich tot een volwassen organisme. Beide gastheersoorten zijn noodzakelijk om de levenscyclus van de parasiet te voltooien en in stand te houden.<sup>1</sup>

#### 1.2 Malaria

Malaria wordt veroorzaakt door de parasiet *Plasmodium*. De infectieziekte bij de mens gaat aanvankelijk gepaard met griepachtige verschijnselen zoals (hoge) koorts, hoofdpijn, spierpijn en misselijkheid. Afhankelijk van welke plasmodiumsoort de infectie veroorzaakt, kan malaria uiteindelijk leiden tot lever-, nier- en hersenbeschadiging met, indien niet tijdig behandeld, een dodelijke afloop ('malaria tropica').<sup>1,2</sup>

Malaria komt voor in de tropische, subtropische en gematigde klimaatgebieden.<sup>2,3</sup> Gemiddeld worden jaarlijks meer dan 200 miljoen ziektegevallen gerapporteerd.<sup>4</sup> Mits tijdig gediagnosticeerd is malaria goed te behandelen, hoewel in endemische gebieden resistentie tegen de gangbaar gebruikte middelen voorkomt.<sup>2,4</sup>

Voor malaria geldt in Nederland een meldingsplicht.<sup>5</sup> De laatste 2 jaar bedraagt de meldingsfrequentie ongeveer 180 ziektegevallen per jaar.<sup>6</sup> Tot 1961 was malaria inheems in Nederland en werd de ziekte veroorzaakt door *Plasmodium vivax* en *Plasmodium malariae*. Door middel van een intensieve surveillance en bestrijding van de parasiet en hun vectoren, is malaria in Nederland thans verdwenen, en is Nederland in 1970 door de WHO officieel malariavrij verklaard.<sup>7</sup> Sindsdien betreffen malariameldingen doorgaans importgevallen van reizigers die enige tijd in een malariarisicogebied hebben doorgebracht.

Het is bekend dat in de buurt van luchthavens incidenteel gevallen van malaria zijn waargenomen bij mensen die nooit in de tropen zijn geweest.<sup>7,8,9</sup> Deze infecties worden toegeschreven aan de onbedoelde import van geïnfecteerde muggen, en komen voornamelijk voor gedurende de warme zomermaanden.<sup>10</sup>

### 1.3 *Plasmodium spp.*

*Plasmodium* is een ééncellige intracellulaire parasiet.<sup>1</sup> Als tussengastheer kunnen verschillende diersoorten optreden zoals zoogdieren (waaronder de mens), vogels en reptielen.<sup>11</sup> De parasiet is alleen pathogeen voor zijn tussengastheer. *P. falciparum* en *P. vivax* zijn de belangrijkste humane malariaverwekkers.<sup>1,2</sup>

De eindgastheer en transmissievector van *Plasmodium* zijn muggen (*Anopheles spp.*, *Aedes spp.* en *Culex spp.*), waarbij elke plasmodiumsoort gerelateerd is aan een specifieke steekmuggensoort.<sup>1</sup> Plasmodiumsoorten die pathogeen zijn voor de mens en aapachtigen worden overgedragen door *Anopheles* muggensoorten.<sup>1,2,3,12</sup>

De levenscyclus van *Plasmodium* is complex. De parasiet doorloopt een groot aantal stadia, deels in zijn eindgastheer, deels in zijn tussengastheer. De infectie in de tussengastheer start met de beet van een met *Plasmodium* geïnfecteerde mug. Op het moment dat de mug een bloedmaal tot zich neemt, worden de parasieten in de vorm van sporozoieten in de bloedbaan geïnjecteerd. Deze sporozoieten verplaatsen zich via de bloedbaan naar de lever waar zij hepatocyten infecteren, zich verder ontwikkelen tot merozoïet, en zich aseksueel vermenigvuldigen. Na verloop van tijd lyseren de hepatocyten en komen de merozoïeten vrij in de bloedbaan. Zij infecteren vervolgens de erythrocyten (de rode bloedcellen) waarin verdere aseksuele vermenigvuldiging plaatsvindt. Een klein deel van de parasieten (1%) ontwikkelt zich in de erythrocyt tot vrouwelijke of mannelijke gametocyten (geslachtscellen).<sup>13</sup> Tot aan deze fase verloopt de malaria-infectie asymptomatisch.

Na een aantal dagen lyseren de merozoïet geïnfecteerde erythrocyten en komen deze vrij in de bloedbaan waarna zij opnieuw erythrocyten infecteren. Deze fase van de infectie openbaart zich aan de hand van de kenmerkende malariaziekteverschijnselen.

Indien een mug een bloedmaal neemt van een met *Plasmodium* besmette tussengastheer, zullen de merozoïeten en gametocyten opgenomen worden. Bij een ontvankelijke muggensoort ontwikkelen de gametocyten zich tot gameten. In het maagdkanaal van de mug vindt kruisbevruchting plaats en versmelten de gameten tot zygoten. Deze zygoten ontwikkelen zich tot sporozoiet en vermenigvuldigen zich. Vervolgens verspreiden de sporozoieten zich naar de speekselklieren van de mug waarna de levenscyclus van de parasiet zich kan herhalen.<sup>1,2</sup>

#### 1.4 *P. falciparum*

*P. falciparum* is de verwekker van malaria tropica. Malaria tropica is de ernstigste malariavorm.<sup>1,2</sup> *P. falciparum* is alleen pathogeen voor de mens. De enige in Nederland voorkomende *Anopheles* muggensoort die *P. falciparum* kan overbrengen is *Anopheles plumbeus*.<sup>14,15</sup> Van oktober tot april komen de muggen niet in Nederland voor vanwege de omgevingstemperatuur.<sup>16</sup> *A. plumbeus* overleeft de winter als larve of ei.<sup>17</sup> In Nederland is éénmaal een besmetting met *P. falciparum* beschreven van iemand die nooit in de tropen is geweest.<sup>8,9</sup> De infectie werd toegeschreven aan de onbedoelde import van geïnfecteerde muggen uit West-Afrika.<sup>18</sup> *P. falciparum* heeft zich nooit blijvend in Nederland gevestigd.<sup>10</sup>

De levenscyclus van *P. falciparum* duurt onder natuurlijke omstandigheden 15 tot 42 dagen. De in de mens plaatsvindende migratie van de sporozoiët naar de lever en rijping tot merozoïët in de hepatocyt bedraagt 6 tot 10 dagen. De aseksuele vermenigvuldiging van de merozoïëten in de erythrocyten en de ontwikkeling tot mannelijke en vrouwelijke gametocyten (het bloedstadium), duurt ongeveer 2 dagen. De ontwikkeling van gametocyten tot gameten in de mug, de versmelting tot zygote, en de ontwikkeling tot sporozoiët duurt onder een optimale omgevingstemperatuur (30 tot 32°C) 7 dagen en kan bij lagere temperaturen uitlopen (20°C) tot 30 dagen.<sup>19,20,21,22</sup> Daarbij dient de kanttekening geplaatst te worden dat de levensduur van een mug ongeveer 4 weken bedraagt.

De ontwikkeling van gameten tot een sporozoiët kan alleen *in vivo* (in de mug) plaatsvinden.<sup>23</sup> De ontwikkeling van een *P. falciparum* sporozoiët tot gametocyt kan onder optimale laboratoriumomstandigheden ook *in vitro* plaatsvinden, zonder de tussenkomst van de mens als tussengastheer.<sup>8,24</sup>

## 2. Beschrijving van het ggo

### 2.1 Ouderorganisme *P. falciparum* NF54 en kloon 3D7

Het ggo 'PfΔb9Δslarp' waarmee de proefpersonen tijdens de klinische studie gevaccineerd zullen worden, is een dubbele deletiemutant van kloon 3D7 van de *P. falciparum* stam NF54. Het ouderorganisme *P. falciparum* NF54 is in 1979 geïsoleerd bij een Nederlandse patiënt die in de buurt van Schiphol malaria had opgelopen. De patiënt was nog nooit buiten Nederland geweest.<sup>8,9</sup> De gekloneerde lijn 3D7 is verkregen door kweekcultures van stam PfNF54 stapsgewijs te verdunnen.<sup>25</sup> Het genoom van 3D7 is gesequenced en geannoteerd, en is 23 Mbp en 14 chromosomen groot.<sup>26</sup>

De stam en kloon zijn toegepast in 'Controlled Human Malaria Infection' (CHMI) studies waarbij proefpersonen door middel van injecties of de beet van geïnfecteerde muggen werden blootgesteld aan levende *P. falciparum*. Gedurende deze studies worden verschillende veiligheidsprocedures in acht genomen. Inmiddels hebben meer dan 3.000 proefpersonen aan dergelijke studies deelgenomen. Tot nu toe zijn daarbij geen blijvende schadelijk effecten gerapporteerd.<sup>27,28</sup> Klinische verschijnselen zoals koorts, rillingen, vermoeidheid, hoofdpijn en spierpijn waren van voorbijgaande aard.

Malaria opgelopen door stam PfNF54 kan goed met de antimalariamiddelen atovaquone/proguanil (Malarone<sup>®</sup>), arthemeter/lumefantrine en chloroquine bestreden worden.<sup>29</sup>

## 2.2 Deletiemutant 'PfΔb9Δslarp'

De dubbele deletiemutant 'PfΔb9Δslarp' is geconstrueerd door uit het genoom van PfNF54 kloon 3D7 de *b9* en *slarp* genen te verwijderen. Het *slarp* gen codeert voor het 'Sporozoite and Liver stage Asparagine-Rich Protein' (SLARP) en is betrokken bij de regulatie van transcriptie op het moment dat de sporozoieten zich in de speekselklieren van de mug bevinden. Door verwijdering van het *slarp* gen kunnen de sporozoieten zich, als zij de hepatocyten binnengedrongen zijn, niet verder ontwikkelen.<sup>30,31,32</sup> Het door het *b9* gen gecodeerde eiwit is noodzakelijk voor de vorming van de 'parasitophorous vacuole' die de parasiet tijdens de ontwikkeling van sporozooïet naar merozoïet in de hepatocyt omringt. Indien deze vacuole niet aanwezig is, stopt de ontwikkeling van de parasiet.<sup>32,33</sup>

De aanvrager geeft aan dat de antimalariamiddelen atovaquone/proguanil (Malarone<sup>®</sup>), arthemeter/lumefantrine en chloroquine niet aangrijpen op de verwijderde *b9* en *slarp* genen, en laat zien dat 'PfΔb9Δslarp' gevoelig is voor deze geneesmiddelen.

## 3. Opzet van de klinische studie

### 3.1 De verschillende fases

De studie zal uit twee fases bestaan. Gedurende fase I zullen maximaal 40 proefpersonen worden geïncludeerd. Proefpersonen zullen éénmaal worden gevaccineerd door middel van parenterale injectie (intraveneus, intramusculair, intradermaal of subcutaan), of door middel van muggenbeten.

De dosis bij de vaccinatie door middel van injectie zal bestaan uit  $1,35 \times 10^5$  of  $9,0 \times 10^5$  sporozoieten per proefpersoon. Bij de vaccinatie door middel van muggenbeten geeft de aanvrager aan dat het aantal geïnjecteerde sporozoieten niet exact bekend zal zijn. Het aantal beten zal variëren van 5 tot 75. Op basis van experimenten met muggenbeten met malariaparasieten op knaagdieren, schat de aanvrager het maximale aantal geïnjecteerde sporozoieten op  $1,5 \times 10^5$  sporozoieten.<sup>34,35,36</sup>

Bij gebleken veiligheid van het vaccin in de fase I studie, zal de studie gedurende fase II worden voortgezet tot maximaal 300 proefpersonen. Deze zullen op dezelfde twee manieren 3 tot 6 keer gevaccineerd worden. De doses die toegediend zullen worden, zullen gebaseerd zijn op de uitkomsten van de fase I studie en de uitkomsten van andere lopende studies met door middel van bestraling geattenueerde sporozoieten. De vaccinatie door middel van injectie zal bij benadering ongeveer  $1,35 \times 10^5$  sporozoieten bevatten waarbij de vaccinaties met tussenpozen van 4 tot 10 weken zullen plaatsvinden. Bij vaccinatie door middel van muggenbeten zullen de proefpersonen per keer aan 25 tot 75 muggen blootgesteld worden. Analoog aan de schatting voor de fase I studie, zal de dosis per vaccinatie bij benadering maximaal bestaan uit  $1,5 \times 10^5$  sporozoieten.

De fase II studie zal afgesloten worden met blootstellingsexperimenten met wildtype *P. falciparum* ouderstam PfNF54.

### 3.2 Vaccinatie

De vaccins die door middel van parenterale injectie toegediend zullen worden, worden extern door een biotechnologisch bedrijf bereid. Vaccinatie van de proefpersonen zal plaats vinden in het 'Clinical Research Center' van het Radboud UMC.

Vaccinatie door middel van muggenbeten vindt plaats in het speciaal ingerichte muggenkweekcentrum van de 'Central Animal Facility' van het Radboud UMC. Het kweken van de '*Pf*Δb9Δslarp' geïnfecteerde muggen valt onder vergunning IG 97-018 getiteld 'Transmissie van genetisch gemodificeerde malariaparasieten naar muggen' en maakt geen onderdeel uit van voorliggende vergunningaanvraag.

Gedurende de vaccinatie bevinden de muggen zich in speciale afgesloten plastic bakken die aan één zijde zijn afgeschermd met muskietengaas. De proefpersonen zullen beide onderarmen aan de muggen aanbieden door ze tegen het gaasgedeelte van de bak te houden. Tijdens de beet zullen de sporozoitien vanuit de speekselklieren van de mug in de arm geïnjecteerd worden. Na vaccinatie zullen de geïnfecteerde muggen afgedood worden met CO<sub>2</sub> en afgevoerd worden volgens voorschriften geldend voor ML-II inperkingsniveau.

### 3.3 Risicomanagementmaatregelen

Dertig tot 60 minuten na vaccinatie en gedurende de daarop volgende weken zal op poliklinische basis regelmatig monitoring van de proefpersonen plaatsvinden, waarbij in ieder geval 14 dagen na vaccinatie bloed zal worden afgenomen. De bloedmonsters zullen met behulp van een specifieke qPCR in een microbiologisch parasitologisch laboratorium getest worden op de aanwezigheid van parasieten. De aanvrager geeft aan dat deze qPCR zowel wildtype *P. falciparum* als '*Pf*Δb9Δslarp' kan aantonen en deze van elkaar kan onderscheiden. De analytische gevoeligheid van de qPCR bedraagt 35 parasieten per ml bloed. De aanvrager geeft aan dat klinische malariaverschijnselen optreden bij een concentratie van 10.000 tot 20.000 merozoieten per ml bloed.

Tijdens de injecties, bloedafnames en diagnostische laboratoriumhandelingen zullen standaard ziekenhuishygiënemaatregelen in acht worden genomen ten einde bloedcontact en besmetting met het ggo, en verspreiding van het ggo te voorkomen. Overige laboratoriumwerkzaamheden met bloedmonsters zullen plaatsvinden onder vergunning IG 98-156 getiteld 'Generic manipulation of rodent malaria parasites'.

De aanvrager stelt dat, indien bij proefpersonen de qPCR op bloedmonsters positief is, onmiddellijk gestart zal worden met effectieve malariatherapie in de vorm van toediening van malarone of arthemether/lumefantrine. Tevens zal de studie voortijdig afgebroken worden.

De aanvrager geeft aan dat 28 dagen na de laatste vaccinatie alle deelnemers uit voorzorg behandeld zullen worden met het antimalariamiddel malarone, ten einde het eventueel ontstaan van malaria bij de proefpersonen of verspreiding van het ggo naar het milieu te voorkomen.

Al het afval van het parenteraal toegediende vaccin en al het diagnostische materiaal dat van de proefpersonen is afgenomen, zal verwerkt worden volgens de standaard afvalstroom van besmet ziekenhuismateriaal. Dit materiaal wordt naar een destructiebedrijf vervoerd en daar verbrand.

De tijdens de studies te volgen procedures die zijn opgesteld om veiligheid voor mens en milieu te waarborgen, zijn gelijk aan de procedures die beschreven zijn voor CHMI studies met wildtype *P. falciparum*.<sup>27,28,37</sup>

#### 4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft één keer eerder geadviseerd over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) *P. falciparum*.<sup>38</sup> Het betrof een vergunning voor het uitvoeren van FACS-werkzaamheden in een ruimte zonder fysieke inperking. De COGEM was van mening dat de werkzaamheden in een dergelijke ruimte uitgevoerd konden worden onder inachtneming van aanvullende voorschriften specifiek voor werkzaamheden met *P. falciparum*. Daarbij adviseerde zij tevens om te werken met een voor antimalariamiddelen gevoelige stam, en om bij een prik- of snij-incident onmiddellijk te starten met effectieve profylactische behandeling.

Op de lijst van ‘Pathogene micro-organismen en agentia’ die als Appendix A was toegevoegd aan de ‘Regeling genetisch gemodificeerde organismen’ en ‘Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling’ uit 1998, was *P. falciparum* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. In 2012 heeft de COGEM geadviseerd *P. falciparum* in te delen in pathogeniteitsklasse 3 omdat tegenwoordig steeds meer resistentie tegen de gangbare medicatie tegen malaria voorkomt, en infecties met *P. falciparum* onbehandeld binnen enkele dagen een fataal beloop kunnen hebben.<sup>39</sup>

#### 5. Overweging en advies

Bij de introductie in het milieu van ggo's zijn voor de milieurisicoanalyse verschillende aspecten van belang zoals de karakterisering, de pathogeniteit, de uitscheiding door de gastheer en de eventuele overleving en verspreiding van het ggo in het milieu.

Onderhavige aanvraag bestaat uit een klinische fase I en fase II studie, waarbij proefpersonen gevaccineerd zullen worden met verschillende doses van een dubbele deletiemutant van *P. falciparum* ('*PfΔb9Δslarp*'). De hierbij van belang zijnde milieu-risicoaspecten worden hieronder puntsgewijs besproken.

##### 5.1 Moleculaire karakterisering

De genomsequentie van uitgangsgenoom PfnF54 kloon 3D7 is bekend. Om deletiemutant '*PfΔb9Δslarp*' moleculair in kaart te brengen, heeft de aanvrager Southern blot analyses uitgevoerd, en de sequenties van de gemodificeerde sites inclusief flankerende sequenties in kaart gebracht. De analyses laten zien dat de voor de modificatie gebruikte selectiemarker en plasmide DNA afwezig zijn, en dat de *b9* en *slarp* genen zijn verwijderd. RT-PCR analyse op sporozoieten geïsoleerd uit speekselklieren van muggen laat zien dat er geen *b9* en *slarp* transcripten aanwezig zijn. Verder zijn er twee identieke heterologe 'flippase recognition site' sequenties (FRT) van 34 nucleotiden geïnsereerd, die nodig waren voor het modificatieproces.

De COGEM is van mening dat de in PfnF54 kloon 3D7 aangebrachte modificaties overeenkomen met de beoogde modificaties en dat de aanwezigheid van de FRT sequenties niet zal leiden tot de



expressie van een functioneel eiwit. Samengevat acht zij ‘*PfΔb9Δslarp*’ voldoende moleculair gekarakteriseerd.

### 5.2 Recombinatie

De aanvrager geeft aan dat in de literatuur nooit is gerapporteerd dat overdracht van genetische elementen tussen verschillende plasmodiumsoorten onderling of naar andere organismen plaatsvindt.<sup>40</sup> Daarnaast stelt de aanvrager dat het uitwisselen van genetische elementen tussen verschillende *P. falciparum* lijnen alleen kan plaatsvinden gedurende de seksuele vermenigvuldiging in de mug. Aangezien *P. falciparum* niet in Nederlandse muggen voorkomt, is de aanvrager van mening dat recombinatie tussen *P. falciparum* in Nederland niet kan plaatsvinden.

Op basis van het hierboven genoemde acht de COGEM de kans dat recombinatie optreedt en ‘*PfΔb9Δslarp*’ terug muteert naar wildtype *P. falciparum* (‘gain of function’), verwaarloosbaar klein.

### 5.3 Pathogeniteit ggo

Ouderorganisme *P. falciparum* is alleen pathogeen voor zijn tussengastheer de mens. De typerende ziekteverschijnselen van malaria treden op als *P. falciparum* zich in de bloedbaanfase van het merozoïetstadium bevindt en zich aseksueel vermeerdert. De aanvrager geeft aan dat door de dubbele deletie in ‘*PfΔb9Δslarp*’ de ontwikkeling van sporozoiët tot merozoïët in de lever wordt afgebroken. Omdat het merozoïetstadium niet wordt bereikt, zal na infectie met het ggo de invasie van de erythrocyten door de merozoïët niet optreden en zullen er geen ziekteverschijnselen zijn. De aanvrager onderbouwt de vermeende apathogeniteit van ‘*PfΔb9Δslarp*’ met verschillende literatuurgegevens. Ten eerste laten experimenten bij muizen met een gelijksoortige deletiemutant van de malariaverwekker van knaagdieren, *Plasmodium berghei*, geen schadelijke effecten zien.<sup>33</sup> Daarnaast tonen ook infectieproeven met ‘*PfΔb9Δslarp*’ op primaire humane hepatocyten en chimere muizen met humane levercellen geen schadelijke effecten aan.<sup>33</sup>

Bij werkzaamheden met geattenuëerde mutanten, bestaat de kans dat er een ‘breakthrough’ infectie optreedt. Een dergelijke ‘breakthrough’ ten gevolge van een dubbele deletiemutant van *P. falciparum* is tot nog toe één keer eerder tijdens een klinische studie beschreven. Het betrof een studie waarbij geattenuëerde sporozoiëten zich toch in de lever tot merozoïëten hadden kunnen ontwikkelen. Bij één van de 6 proefpersonen werden parasieten in de bloedbaan aangetroffen.<sup>41</sup> In de gebruikte deletiemutant ‘*PfΔp52Δp36*’, waren de beide verwijderde genen betrokken bij de vorming van de ‘parasitophorous vacuole’ in de lever. Onder bepaalde omstandigheden bleek in een niet volledig ontwikkelde ‘parasitophorous vacuole’ toch ontwikkeling van de parasiet naar het volgende stadium plaats te vinden.<sup>42,43,44</sup>

In ‘*PfΔb9Δslarp*’ zijn twee genen verwijderd. Deze genen zijn betrokken bij verschillende ontwikkelingsstadia van de parasiet en elk afzonderlijk noodzakelijk voor de verdere ontwikkeling van *P. falciparum* in de lever. Gezien de functie van de eiwitten die door beide genen tot expressie gebracht worden, heeft de COGEM geen redenen om aan te nemen dat het tropisme van

'*PfΔb9Δslarp*' veranderd is ten opzichte van wildtype *P. falciparum*. Voor de milieurisicobeoordeling van '*PfΔb9Δslarp*' is daarom alleen het pathogeniteitsaspect voor de mens van belang.

De COGEM verwacht dat de kans op een 'breakthrough' infectie met de dubbele deletiemutant '*PfΔb9Δslarp*' ten opzichte van de dubbele deletiemutant '*PfΔp52Δp36*' verkleind is, omdat de verwijderde genen in '*PfΔb9Δslarp*' op verschillende momenten in verschillende ontwikkelingsstadia van de parasiet aangrijpen. Omdat de kans op een 'breakthrough' infectie verwaarloosbaar klein is, '*PfΔb9Δslarp*' zich niet verder in de lever zal ontwikkelen, en het ggo daardoor geen ziekteverschijnselen kan veroorzaken, is de COGEM van mening dat '*PfΔb9Δslarp*' hoogst waarschijnlijk niet pathogeen is.

#### 5.4 Uitscheiding en verspreiding

Bij klinische 'CHMI' vaccinatiestudies met wildtype *P. falciparum* is nooit verspreiding van de parasiet naar het milieu waargenomen. De COGEM merkt echter op dat het totale aantal proefpersonen dat bij deze 'CHMI' studies betrokken is geweest, beperkt is.

Onderhavige aanvraag betreft een soortgelijke 'CHMI' studie, alleen zal er gebruik gemaakt worden van deletiemutant '*PfΔb9Δslarp*'. Omdat in deze mutant de *b9* en *slarp* genen verwijderd zijn, kan het ggo zijn levenscyclus in de lever niet voltooien. De COGEM is daarom van mening dat '*PfΔb9Δslarp*' biologisch ingeperkt is.

In theorie is het niet uit te sluiten dat er bij een proefpersoon een 'breakthrough' infectie optreedt. Deze zou zich ongeveer 8 dagen na de vaccinatie manifesteren. De patiënten worden 14 dagen na vaccinatie, of op het moment dat er ziekteverschijnselen optreden, met behulp van een qPCR gecontroleerd op de aanwezigheid van *P. falciparum* parasieten in het bloed. Bij een positieve PCR-uitslag wordt er onmiddellijk met effectieve malariatherapie gestart waardoor de aanwezige parasieten gedood zullen worden. Als extra voorzorgsmaatregel worden aan het eind van de studie, 28 dagen na de laatste vaccinatie, alle deelnemers uit voorzorg behandeld met het antimalariamiddel malarone. De COGEM acht de hierboven genoemde maatregelen voldoende om, als er een 'breakthrough' infectie optreedt, deze te bestrijden.

De COGEM wijst er op dat in het theoretische geval dat gedurende de studie een 'breakthrough' infectie onopgemerkt blijft, verdere verspreiding van '*PfΔb9Δslarp*' niet zal optreden. Uit gegevens van het Amerikaanse 'Centers of Disease Control and Prevention' blijkt dat *P. falciparum* zich niet via aerosolen kan verspreiden.<sup>45</sup> Transmissie van '*PfΔb9Δslarp*' kan op een dergelijk moment alleen plaatsvinden als een geïnfecteerde proefpersoon gebeten wordt door een mug. De kans dat dit gebeurt door de voor *P. falciparum* ontvankelijke mug *A. plumbeus*, er versmelting van een mannelijke en een vrouwelijke gameet plaatsvindt, en er vervolgens door een muggenbeet opnieuw besmetting van de mens met '*PfΔb9Δslarp*' plaats zal vinden, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Daarbij wijst de COGEM er op dat, als sporozoieten al in *A. plumbeus* tot ontwikkeling komen en verspreiding van met '*PfΔb9Δslarp*' besmette muggen optreedt, het ggo zich niet blijvend in Nederland kan handhaven omdat de muggen van *A. plumbeus* in het Nederlandse klimaat alleen in de zomermaanden aanwezig zijn.

Om te voorkomen dat in geval van een onopgemerkte ‘breakthrough’ infectie ‘*PfΔb9Δslarp*’ aan derden wordt overgedragen, heeft de aanvrager als extra maatregel het exclusie criterium opgenomen dat proefpersonen gedurende het verloop van de studie geen bloed mogen doneren. De COGEM merkt op dat mogelijke overdracht van het ggo ook via orgaandonatie (waaronder het doneren van de lever) plaats kan vinden. De COGEM wijst er daarom volledigheidshalve op dat ook orgaandonatie in de exclusiecriteria opgenomen moet worden.

Samengevat acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat - met inachtneming van het extra exclusie criterium inzake orgaandonatie - tijdens de voorgenomen klinische studie verspreiding van ‘*PfΔb9Δslarp*’ naar het milieu plaats zal vinden.

## 6. Conclusie en advies

Omdat ‘*PfΔb9Δslarp*’ hoogst waarschijnlijk niet pathogeen is, de kans dat het ggo zich in het milieu verspreidt verwaarloosbaar klein is, en er deugdelijke beheersmaatregelen genomen worden in het geval van een theoretische ‘breakthrough’ infectie, acht de COGEM - onder toevoeging van het extra exclusie criterium betreffende orgaandonatie - de risico’s voor mens en milieu bij de voorliggende aanvragen voor klinische fase 1 en fase 2 studies met ‘*PfΔb9Δslarp*’ verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. In: The encyclopedia of Parasitology (2008). Ed Mehlhorn H. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
2. Fairhurst RM & Wellems TE (2010). *Plasmodium* species (malaria). In: Principles and Practice of Infectious diseases. 7th edition. Eds Mandell GL *et al.* Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia
3. Hay SI *et al.* (2010). Developing global maps of the dominant *Anopheles* vectors of human malaria. PLOS Medicine 7: e1000209
4. World Health Organization. Factsheet on the World Malaria Report 2013. [www.who.int/malaria/media/world\\_malaria\\_report\\_2013/en/](http://www.who.int/malaria/media/world_malaria_report_2013/en/) (bezocht 31 augustus 2015)
5. RIVM. Meldingsplicht infectieziekten. [www.rivm.nl/Onderwerpen/M/Meldingsplicht\\_infectieziekten/Welke\\_infectieziekten\\_zijn\\_meldingsplichtig](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/M/Meldingsplicht_infectieziekten/Welke_infectieziekten_zijn_meldingsplichtig) (bezocht 31 augustus 2015)
6. RIVM. State of infectious diseases in the Netherlands in 2013. [www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/150205001.pdf](http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/150205001.pdf) (bezocht 31 augustus 2015)
7. Berger S (2015). Malaria: Global status. In: Gideon Informatics. Los Angeles, California. 284-286
8. Ponnudurai T *et al.* (1981). Chloroquine sensitivity of isolates of *Plasmodium falciparum* adapted to *in vitro* culture. Trop Geogr Med 33: 50-54
9. Delemarre BJ & van der Kaay HJ (1979). Tropical malaria contracted the natural way in the Netherlands. Ned Tijdschr Geneesk 123: 1981-1982
10. Takken W *et al.* (1999). Terugkeer van endemische malaria in Nederland uiterst onwaarschijnlijk. Ned Tijdschr Geneesk 143: 836- 838
11. Perkins SL & Austin CC (2008). Four new species of *Plasmodium* from new guinea lizards: integrating morphology and molecules. J Parasitol 95: 424-433

12. Centers of Disease Control. Anopheles mosquitos. [www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/](http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/mosquitoes/) (bezocht 31 augustus 2015)
13. Nilsson SK *et al.* (2015). Targeting human transmission biology for malaria elimination. *PLoS Pathog* 11: e1004871
14. Takken W *et al.* (2007). Distribution and dynamics of arthropod vectors of zoonotic disease in the Netherlands in relation to risk of disease transmission. Staff publication Wageningen University Research
15. Schaffner F *et al.* (2012). *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? *Malar J* 11: 393
16. Ibanez-Justicia A *et al.* (2015). Modelling the spatial distribution of the nuisance mosquito species *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in the Netherlands. *Parasit Vectors* 8: 258-267
17. European Centre for Disease Prevention and Control. *Anopheles plumbeus*. <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/anopheles-plumbeus.aspx> (bezocht 7 september 2015)
18. Volkman SK *et al.* (2007). A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. *Nat Genet* 39: 113-119
19. Macdonald G (1956). Epidemiological basis of malaria control. *Bull World Health Organ* 15: 613-626
20. Parham PE & Michael E (2010). Modelling climate change and malaria transmission. *Adv Exp Med Biol* 673: 184-199.
21. Menard R *et al.* (2013). Looking under the skin: the first steps in malarial infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* 11: 701-712
22. Mota MM & Rodriguez A (2004). Migration through host cells: the first steps of *Plasmodium* sporozoites in the mammalian host. *Cell Microbiol* 6: 1113-1118
23. LeRoux M *et al.* (2009). *Plasmodium falciparum* biology: analysis of *in vitro* versus *in vivo* growth conditions. *Trends Parasitol* 25: 474-481
24. Ponnudurai T *et al.* (1982). The production of mature gametocytes of *Plasmodium falciparum* in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 242-250
25. Walliker D *et al.* (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 236(4809): 1661-1666
26. Gardner MJ *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 419(6906): 498-511
27. Roestenberg M *et al.* (2012). Comparison of clinical and parasitological data from controlled human malaria infection trials. *PLoS One* 7: e38434
28. Sauerwein RW *et al.* (2011). Experimental human challenge infections can accelerate clinical malaria vaccine development. *Nat Rev Immunol* 11: 57-64
29. Teirlinck AC *et al.* (2013). NF135.C10: a new *Plasmodium falciparum* clone for controlled human malaria infections. *J Infect Dis* 207: 656-660
30. Silvie OK *et al.* (2008). A sporozoite asparagine-rich protein controls initiation of *Plasmodium* liver stage development. *PLoS Pathog* 4: e1000086
31. Annoura T *et al.* (2014). Two *Plasmodium* 6-Cys family-related proteins have distinct and critical roles in liver-stage development. *FASEB J* 28: 2158-2170

32. Aly AS *et al.* (2008). Targeted deletion of SAP1 abolishes the expression of infectivity factors necessary for successful malaria parasite liver infection. *Mol Microbiol* 69: 152-163
33. van Schaijk BC *et al.* (2014). A genetically attenuated malaria vaccine candidate based on gene-deficient sporozoites. *Elife* 3. doi: 10.7554/eLife.03582
34. Beier JC *et al.* (1991). Quantitation of malaria sporozoites transmitted *in vitro* during salivation by wild Afrotropical Anopheles. *Med Vet Entomol* 5: 71-79
35. Frischknecht F *et al.* (2004). Imaging movement of malaria parasites during transmission by *Anopheles* mosquitoes. *Cell Microbiol* 6: 687-694
36. Vanderberg JP (2014). Imaging mosquito transmission of *Plasmodium* sporozoites into the mammalian host: immunological implications. *Parasitol Int* 63: 150-164
37. Laurens MB *et al.* (2012). A consultation on the optimization of controlled human malaria infection by mosquito bite for evaluation of candidate malaria vaccines. *Vaccine* 30: 5302-5304
38. COGEM (2006). Werkzaamheden met *Plasmodium falciparum* in een ruimte buiten inperking. COGEM advies CGM/060707-01
39. COGEM (2012). Classificatie humaan- en dierpathogene parasieten. COGEM advies CGM/120127-01
40. Durand PM *et al.* (2006). An analysis of mobile genetic elements in three *Plasmodium* species and their potential impact on the nucleotide composition of the *P. falciparum* genome. *BMC Genomics* 7: 282-292
41. Spring M *et al.* (2013). First-in-human evaluation of genetically attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites administered by bite of *Anopheles* mosquitoes to adult volunteers. *Vaccine* 31: 4975-4983
42. Annoura T *et al.* (2012). Assessing the adequacy of attenuation of genetically modified malaria parasite vaccine candidates. *Vaccine* 30: 2662-2670
43. Ploemen IH *et al.* (2012). *Plasmodium berghei* Delta p52&p36 parasites develop independent of a parasitophorous vacuole membrane in Huh-7 liver cells. *PLoS One* 7: e50772
44. VanBuskirk KM *et al.* (2009). Preerythrocytic, live-attenuated *Plasmodium falciparum* vaccine candidates by design. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13004-13009
45. Centers of Disease Control. 2007 Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare settings. [www.cdc.gov/hicpac/2007ip/2007ip\\_appenda.html](http://www.cdc.gov/hicpac/2007ip/2007ip_appenda.html) (bezocht 31 augustus 2015)