

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 21 januari 2021
KENMERK CGM/210121-01
ONDERWERP Advies klinische studie malariavaccin LUMC

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 20-018 met de titel "Exposure of human test subjects to live genetically attenuated PfΔmei2 (LA-GAP) malaria parasites" van het LUMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

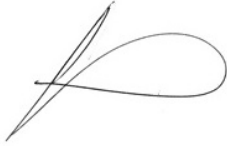
De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase I en II vaccinatiestudie met genetisch gemodificeerde (gg-) parasieten. Het betreft een deletiemutant van *Plasmodium falciparum* (*PfΔmei2*). Vaccinatie van de proefpersonen zal plaatsvinden door middel van injecties en muggenbeten.

P. falciparum veroorzaakt malaria en is alleen pathogeen voor de mens. Besmetting en overdracht vinden plaats door muggen. De in Nederland voorkomende mug, *Anopheles plumbeus*, kan deze parasiet ook overdragen.

De stam *PfΔmei2* is tot stand gekomen door het *mei2* gen te verwijderen, waardoor de parasiet zijn levenscyclus in de lever van de mens niet kan voltooien en het zogenaamde bloedstadium niet kan bereiken. In het theoretische geval dat een proefpersoon toch een infectie met *PfΔmei2* door zou maken, is de kans dat de parasiet zich kan verspreiden verwaarloosbaar klein, omdat gedurende de studie monitoring van de proefpersonen plaatsvindt en bij een gebleken infectie de proefpersoon effectief behandeld wordt met geneesmiddelen. Concluderend is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan de hierboven genoemde klinische fase I en II studies met *PfΔmei2*, 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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 Dr. N. Smit, Loket Getherapie
 Dr. R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is COGEM lid dr. M.C.W. Felkamp niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Klinische malaria vaccinatiestudie met muggen en de *Plasmodium falciparum* deletiemutant *PfΔmei2*

COGEM advies CGM/210121-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een vergunningaanvraag betreffende fase I en fase II vaccinatiestudies met de levende geattenueerde malariaparasiët *Plasmodium falciparum PfΔmei2* (IM-MV 20-018). De studies hebben als doel de veiligheid en effectiviteit van het vaccin te testen, en zullen uitgevoerd worden in het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC). Een soortgelijke aanvraag is ook gedaan door het Radboud Universitair Medisch Centrum te Nijmegen (Radboudumc). Beide aanvragen betreffen hetzelfde genetisch gemodificeerde organisme (ggo) en kennen nagenoeg dezelfde studie-opzet. Het enige verschil bestaat uit het feit dat in de klinische studie van het Radboudumc geïmmuniseerd zal worden door middel van muggenbeten, en in die van het LUMC immunisatie via parenterale injectie zal plaatsvinden. Gezien het geringe verschil tussen de vergunningaanvragen bestaan beide adviezen uit nagenoeg dezelfde informatie. Het onderhavige advies betreft de studie in het LUMC.

2 *Plasmodium* spp. en malaria

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 het een volwassen stadium bereikt. Deze ontwikkelingsstadia worden gekenmerkt door gedaantewisselingen (metamorfosen).¹

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.¹

2.1 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').^{1,2} Malaria komt voor in de tropische, subtropische en gematigde klimaatgebieden.^{2,3} Gemiddeld worden jaarlijks meer dan 229 miljoen ziektegevallen gerapporteerd.⁴ Mits tijdig gediagnosticeerd is malaria goed te behandelen, hoewel in endemische gebieden resistentie tegen de gangbaar gebruikte middelen voorkomt.^{2,4}

Voor malaria geldt in Nederland een meldingsplicht.⁵ In 2016 bedroeg de meldingsfrequentie 250 ziektegevallen.⁶ 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.⁷ Sindsdien betreffen malariameldingen doorgaans importgevallen van reizigers die enige tijd in een malariarisicogebied hebben doorgebracht.

In de buurt van luchthavens worden incidenteel gevallen van malaria waargenomen bij mensen die nooit in de tropen zijn geweest.^{7,8,9} Deze infecties worden toegeschreven aan de onbedoelde import van geïnfecteerde muggen, en komen voornamelijk voor gedurende de warme zomermaanden.¹⁰

2.2 Plasmodium spp.

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

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

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 asexueel 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 asexuele vermenigvuldiging plaatsvindt. Een klein deel van de parasieten (1%) ontwikkelt zich in de erythrocyt tot vrouwelijke of mannelijke gametocyten (geslachtscellen).¹³ 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 maagdarmkanaal 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.^{1,2}

2.2.1 *P. falciparum*

P. falciparum is de verwekker van malaria tropica. Malaria tropica is de ernstigste malariavorm.^{1,2} *P. falciparum* is alleen pathogeen voor de mens. Zeldzame *P. falciparum* infecties in Nederland worden toegeschreven aan de onbedoelde import van geïnfecteerde muggen uit West-Afrika.¹⁴ *P. falciparum* heeft zich nooit blijvend in Nederland gevestigd.¹⁰ De in Nederland voorkomende *Anopheles* muggensoort die *P. falciparum* kan overbrengen is *Anopheles plumbeus*.^{15,16} Van oktober tot april komen volwassen muggen niet in Nederland voor vanwege de omgevingstemperatuur.¹⁷ *A. plumbeus* overleeft de winter als larve of ei.¹⁸

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 asexuele 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 (20°C) uitlopen tot 30 dagen.^{19,20,21,22}

De ontwikkeling van gameten tot een sporozoiët kan alleen *in vivo* (in de mug, maar niet in de larve of het ei) plaatsvinden.²³ 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.^{8,24}

3. Beschrijving van het ggo

3.1 Ouderorganisme *P. falciparum* NF54 en kloon 3D7

Het ggo '*PfΔmei2*' waarmee de proefpersonen tijdens de klinische studie gevaccineerd zullen worden, is een 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.^{8,9} De gekloneerde lijn 3D7 is verkregen door kweekculturen van stam *Pf*NF54 stapsgewijs te verdunnen.²⁵ Het genoom van 3D7 is gesequenced en is 23 Mbp en 14 chromosomen groot.²⁶ 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*. Inmiddels hebben meer dan 3.000 proefpersonen aan deze studies deelgenomen, waarvan 302 in Nederland. Tot nu toe zijn daarbij geen blijvende schadelijk effecten gerapporteerd.^{27,28} Klinische verschijnselen zoals koorts, rillingen, vermoeidheid, hoofdpijn en spierpijn waren van voorbijgaande aard. Malaria opgelopen door stam *Pf*NF54 kan goed met de antimalariamiddelen atovaquone/proguanil (Malarone®), arthemeter/lumefantrine en chloroquine bestreden worden.²⁹

3.2 Deletiemutant *Pf*Δ*mei2*

De deletiemutant *Pf*Δ*mei2*, hierna beschreven als LA-GAP (Late-Arresting Genetically Attenuated Parasite) is geconstrueerd door het gen *mei2* te verwijderen uit het genoom van *Pf*NF54 kloon 3D7.^{8,30} Het *mei2* gen codeert voor het RNA-bindende eiwit Mei2 (Meiosis inhibited 2). In de knaagdier malariaparasiët *Plasmodium berghei* is aangetoond dat *mei2* tot expressie wordt gebracht tijdens het leverstadium.^{31,32} Deletie van dit gen in *Plasmodium yoelii* en *P. berghei* leidt tot blokkering van groei in het latere leverstadium.³³ Hierdoor is de LA-GAP geblokkeerd in zijn ontwikkeling: de levercellen worden geïnfecteerd, maar er vindt geen infectie van de rode bloedcellen plaats.³⁰

In deze klinische studie wordt de veiligheid van LA-GAP onderzocht als vaccin voor *P. falciparum*, en wordt de effectiviteit als vaccin vergeleken met een deletiemutant die in een eerder ontwikkelingsstadium geblokkeerd is. Deze mutant, *Pf*Δ*b9Δslarp* ofwel EA-GAP (Early-Arresting GAP) is reeds vergund en onderzocht in een eerdere vaccinatiestudie door het LUMC en Radboudumc.³⁴

4. Opzet van de klinische studie

4.1 De verschillende fases

De klinische studie bestaat uit twee fases, welke in verschillende instellingen zullen worden uitgevoerd. In fase I wordt de veiligheid van LA-GAP bepaald. In deze fase wordt LA-GAP enkel met behulp van muggenbeten aan de proefpersonen toegediend, dat zal worden uitgevoerd in het Radboudumc. Hiervoor worden per proefpersoon minimaal 15, en maximaal 50 muggenbeten toegediend in twee groepen van 6 en 15 proefpersonen. Als naar aanleiding van de fase I studie vaccinatie met de mutant veilig wordt bevonden, start men met fase II. In fase II wordt de effectiviteit van LA-GAP bepaald door gevaccineerde proefpersonen te testen op immuniteit voor het wildtype *P. falciparum*. In fase II worden de proefpersonen geïmmuniseerd met behulp van parenterale injectie in het LUMC of met muggenbeten in het Radboudumc. In het LUMC zal enkel fase II, vaccinatie met behulp van parenterale injectie, uitgevoerd worden.

4.2 Vaccinatie

In fase II worden 25 proefpersonen gevaccineerd door middel parenterale injectie (intraveneus, intramusculair, intradermaal of subcutaan) met LA-GAP (15 proefpersonen) of EA-GAP (10 proefpersonen) sporozoiëten. Hierbij worden per proefpersoon per vaccinatie 9.0×10^5 sporozoiëten toegediend. De proefpersonen worden meerdere keren gevaccineerd, met 4-10 weken tussen de vaccinaties (toedieningen). Drie tot acht weken na de laatste vaccinatie zullen proefpersonen worden getest op immuniteit voor malaria, door het toedienen van wildtype *P. falciparum* sporozoiëten met behulp van parenterale injecties.

4.3 Monitoring proefpersonen

De proefpersonen zullen regelmatig (elke twee dagen tot drie keer per dag) op poliklinische basis gemonitord worden: 30 tot 60 minuten na vaccinatie en gedurende de 6-28 dagen daarop volgend, waarbij de meest intensieve monitoring plaatsvindt op 7-14 of 6-21 dagen na infectie (zie paragraaf 7.

Signalering). Dagelijks zullen bloedmonsters worden afgenomen en getest worden op de aanwezigheid van parasieten door middel van een 18S qPCR test of een bloeditstrijk.³⁵ De aanvrager geeft aan dat deze qPCR zowel wildtype *P. falciparum*, EA-GAP en LA-GAP kan aantonen en van elkaar kan onderscheiden. De gevoeligheid van een bloeditstrijk bedraagt 4 parasieten per µl bloed, bij de qPCR betreft dit 35 parasieten per ml bloed (0,035 parasieten per µl bloed). De aanvrager stelt dat klinische symptomen van malaria in het algemeen overeenkomen met de detectie van 10-20 bloedstadium parasieten per µl bloed. De aanvrager meldt dat, indien bij proefpersonen malariaparasieten in het bloed worden aangetroffen, onmiddellijk gestart zal worden met effectieve malariatherapie in de vorm van toediening van Malarone[®] of arthemeter/lumefantrine.

Aanwezigheid in het bloed van LA-GAP in de fase I studie zou veroorzaakt zijn door een eventuele ‘breakthrough’ infectie, waarbij het ggo in de testpersoon niet volledig biologisch ingeperkt blijkt te zijn. Tijdens de fase I zal de studie worden afgebroken als 1 persoon bij een dosis van 15 muggenbeten een ‘breakthrough’ infectie ontwikkelt. Bij een dosis van 50 muggenbeten zal de studie worden afgebroken als meer dan 5 personen een ‘breakthrough’ infectie ontwikkelen. Na afloop van zowel de fase I als de fase II studie zullen alle proefpersonen preventief worden behandeld met een effectieve malariatherapie. Aanvullende risicomanagementmaatregelen worden gehanteerd doordat proefpersonen afzien van bloed- en orgaandonatie en er bij het vaststellen van parasieten in het bloed na een prik- of snijaccident, er direct gestart zal worden met een effectieve malariatherapie.

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.³⁶ Al het afval zal via de standaard afvalstroom van besmet ziekenhuis materiaal afgehandeld worden. De tijdens de studie 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* en een eerder vergunde aanvraag.^{27,28,36,37}

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder advies uitgebracht betreffende werkzaamheden met *P. falciparum*. In 2006 heeft de COGEM positief geadviseerd over een vergunningaanvraag over experimenten met *P. falciparum* gametocyten in een niet-ingeperkte ruimte.³⁸ In 2015 is de COGEM om advies gevraagd bij een aanvraag voor een klinische vaccinatiestudie door het Radboudumc en het LUMC. Deze aanvraag betrof het gebruik van *PfΔb9Δslarp*: de EA-GAP die ook in de onderhavige klinische studie zal worden gebruikt. EA-GAP werd voor de vaccinatie van proefpersonen toegediend door middel van muggenbeten en/of parenterale injectie^{36,39} en dit is zeer gelijkend aan de onderhavige vergunningaanvraag. De milieurisico's van deze studies werden destijds door de COGEM verwaarloosbaar klein geacht, gezien de gepaste monitoring van de proefpersonen, het beperkte voorkomen van de transmissievector in Nederland, en beschikbaarheid van goede therapeutische behandelingen bij infecties.

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 vaker resistentie tegen de gangbare medicatie tegen malaria voorkomt, en infecties met *P. falciparum* onbehandeld binnen enkele dagen een fataal beloop kunnen hebben.⁴⁰

6. Overweging

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 deletiemutant van *P. falciparum* (*PfΔmei2*). De hierbij van belang zijnde milieurisicoaspecten worden hieronder puntsgewijs besproken.

6.1 Moleculaire karakterisering

De LA-GAP deletiestam *PfΔmei2* is gegenereerd met behulp van CRISPR/Cas9 technologie met *P. falciparum* NF54 kloon Pf3D7 als ouderstam. Het genoom van deze ouderstam is volledig gesequenced.⁴¹ In de eerste stap van dit proces is het *mei2* gen vervangen door een antibioticaselectiemarker aan beide kanten ingesloten door FRT sequenties (flippase recognition sites). In de tweede stap is een plasmide geïntroduceerd waarop de sequentie voor een eFLP (enhanced yeast flippase) recombinase tot expressie wordt gebracht. De resulterende mutant is hierdoor selectiemarkervrij, waarbij er een FRT sequentie van 34 nucleotiden in plaats van *mei2* geïnsereerd is, welke nodig was voor het modificatieproces. Met behulp van PCR en Southern blot-analyse laat de aanvrager zien dat de beoogde mutant de *mei2* deletie bevat, selectiemarkervrij is en dat heteroloog plasmide DNA afwezig is. Tevens is deze resulterende deletiemutant volledig gesequenced en blijkt uit deze gegevens dat de sequentie van de deletiemutant overeen komt met de door de aanvrager beoogde mutatie.

De COGEM merkt op dat op basis van de moleculaire karakterisering een klein deel van *mei2*, inclusief het startcodon ATG, aanwezig blijft. In theorie kan dit leiden tot expressie van een eiwit. De aanvrager heeft geen bioinformatische analyse van het nog aanwezige openleesraam uitgevoerd en het potentiële expressieproduct niet vergeleken met bekende eiwitsequenties. Middels een dergelijke bioinformatische analyse kan gecontroleerd worden of het theoretische eiwit product bekende schadelijke eigenschappen zou kunnen hebben. Onder het voorbehoud dat een bioinformatische analyse uitwijst dat er geen schadelijke producten gevormd worden, is de COGEM van oordeel dat de deletiemutant *PfΔmei2* voldoende moleculair gekarakteriseerd is.

6.2 Recombinatie

Het *P. falciparum* genoom bevat hypervariabele genfamilies, waardoor recombinatie kan plaatsvinden tijdens aseksuele vermeerdering (mitotische recombinatie) wat leidt tot genetische

diversiteit in *P. falciparum* parasieten.^{42,43} Daarnaast wordt genetische variatie gedreven door ‘cross-over events’ tijdens de seksuele vermeerdering, wanneer gameten samensmelten in de mug (meiotische recombinatie).^{44,45} Uitwisseling van genetische elementen en recombinatie tussen de gameten van verschillende *Plasmodium* stammen kan dus plaatsvinden in het seksuele stadium van de parasiet.

Recombinatie waardoor LA-GAP terug-muteert naar wild-type *P. falciparum* zou enkel in het seksuele stadium kunnen plaatsvinden. De preklinische studies met LA-GAP laten zien dat deze stam niet in staat is gametocyten te produceren.³⁰ In het theoretische geval dat LA-GAP wel gametocyten produceert in deze vaccinatiestudie, dienen zowel gametocyten van het wildtype aanwezig te zijn alsmede de mug waarin gametenversmelting plaatsvindt. *P. falciparum* komt niet voor in Nederland en hoewel de proefpersonen ‘gechallenged’ zullen worden met wildtype *P. falciparum* is de kans dat een LA-GAP gametocyt opgenomen wordt door een mug die al gameten van de wildtype *P. falciparum* bevat verwaarloosbaar klein, aangezien proefpersonen bij een breakthrough infectie onmiddellijk behandeld worden met malariatherapie.

Op basis van het hierboven genoemde acht de COGEM de kans dat recombinatie optreedt tussen LA-GAP, EA-GAP en/of het wild-type *P. falciparum*, verwaarloosbaar klein.

6.3 Pathogeniteit van het ggo

Het ouderorganisme van LA-GAP, *P. falciparum* is alleen pathogeen voor de mens. De typerende ziekteverschijnselen van malaria treden op als *P. falciparum* zich in de bloedbaanfase van het merozoïetstadium bevindt en zich aseksueel vermeerderd.

De stam *Pf* Δ *mei2* is tot stand gekomen door het *mei2* gen te verwijderen. Expressie van dit gen resulteert in het RNA-bindende eiwit Meï2 (Meiosis Inhibited 2), welke verantwoordelijk is voor de ontwikkeling van de malariaparasiet in de lever van de humane gastheer.³⁰ Er zijn, zover bij de COGEM bekend, geen publicaties die het Meï2 eiwit in verband brengen met gastheertropisme. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat het tropisme van LA-GAP *P. falciparum* Δ *mei2* veranderd is ten opzichte van wildtype *P. falciparum*.

De pathogeniteit van LA-GAPs is bestudeerd in preklinische studies, waar gebruik werd gemaakt van *in vitro* systemen en muismodellen. Bij malariastudies met muizen wordt gebruik gemaakt van *P. berghei* en *P. yoellii*, welke pathogeen zijn voor muizen. Infectie van muizen met de deletiemutanten van *P. berghei* Δ *mei2* en *P. yoellii* Δ *mei2* leidde tot infectie van de hepatocyten, maar resulteerde niet in ‘breakthrough’ infecties.⁴⁶ De deletie van *mei2* resulteert in *P. falciparum* in een vergelijkbare blokkade in de levenscyclus: merozoïeten worden gevormd in de hepatocyten maar kunnen niet uitbreken naar het bloedstadium. Dit is aangetoond met humane hepatocyten en humane lever-chimere muizen.³⁰

Gezien het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat *P. falciparum* Δ *mei2* geattenuëerd is.

6.4 Uitscheiding en verspreiding

Op basis van de uitkomsten van de preklinische studies in humane hepatocyten en humane leverchimere muizen is LA-GAP biologisch ingeperkt.³⁰ In theorie is de kans op een ‘breakthrough’ echter niet volledig uitgesloten. De proefpersonen in de vaccinatiestudie worden gemonitord en gecontroleerd op een ‘breakthrough’ infectie middels PCR analyse van bloedmonsters. Indien er een bloedfase-infectie bij een proefpersoon wordt gedetecteerd, wordt de persoon behandeld met malariamedicatie, atovaquone/proguanil (Malarone[®]) of arthemether/lumefantrine. Na afloop van de studie zullen alle proefpersonen worden behandeld.

De COGEM wijst erop dat gedurende de klinische studies proefpersonen hun deelname vroegtijdig kunnen stoppen. In de aanvraag wordt niet vermeld dat deze proefpersonen malariamedicatie ontvangen, in tegenstelling tot de proefpersonen die wel de studie voltooien. Mede met oog op mogelijke reisbewegingen van proefpersonen die de studie vroegtijdig verlaten, adviseert de COGEM dat de betreffende proefpersonen behandeld moeten worden met effectieve malariatherapie.

De aanvrager heeft aangegeven dat LA-GAP gevoelig is voor malariamedicatie, waaronder de middelen atovaquone en lumefantrine. De middelen proguanil en arthemeter zijn niet apart getest, maar worden standaard als combinatie met atovaquone of lumefantrine voorgeschreven.^{47,48} In het geval van prik- en snij-accidenten tijdens werkzaamheden met bloed van proefpersonen, zal met PCR worden vastgesteld of er bloedstadium-parasieten in het betreffende bloed voorkomen. In dat geval zal er worden gestart met de bovengenoemde malariamedicatie.

Ten tijde van de klinische studies zijn de proefpersonen uitgesloten van bloed- en orgaandonatie. Dit om mogelijke verspreiding van de parasiet via bloed (indien een uitbraak heeft plaatsgevonden) of via de levercellen aan derden te voorkomen.

In het geval dat LA-GAP niet in zijn ontwikkeling geremd blijkt te zijn en middels een ‘breakthrough’ infectie terug te vinden is in het bloed, kan de gg-parasiet in theorie opgenomen worden door muggen en het seksuele stadium doorlopen. Voor de fase I studie zijn in de aanvraag criteria opgesteld waarbij het ggo als veilig wordt beschouwd en toegepast kan worden in de fase II studie. Aan de hand van deze criteria wordt bij het voorkomen van ‘breakthrough’ infecties bij enkele proefpersonen, het ggo nog als veilig beschouwd (zie paragraaf ‘4.3 Monitoring proefpersonen’). De COGEM merkt op dat de onderbouwing van deze criteria, waarbij het ggo bij een aantal ‘breakthrough’ infecties nog als veilig wordt beschouwd, voor de fase I studie ontbreekt. Onder voorbehoud van het includeren van de onderbouwing voor de veiligheidscriteria voor de fase I studie, acht de COGEM de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De parasiet *P. falciparum* kan in Nederland overgedragen worden door *A. plumbeus*. Volwassen muggen van deze soort komen alleen voor wanneer de temperatuur warm genoeg is, zoals in de zomermaanden van april tot oktober. Naast *A. plumbeus* komt in Nederland ook *Anopheles*

atroparvus voor.⁴⁹ In het begin van de 20ste eeuw was *A. atroparvus* verantwoordelijk voor de verspreiding van *P. vivax* en *P. malariae* in de kustgebieden van Nederland.^{50,51} *A. atroparvus* is echter niet in staat *P. falciparum* te verspreiden.^{52,53}

De periode waarin de parasiet zich in de mug ontwikkelt van gametocyt naar sporozoiët is temperatuurafhankelijk. Deze ontwikkelingstijd varieert van zeker zeven dagen bij gemiddeld 32°C tot 30 dagen bij gemiddeld 20°C.^{19,20,21,22} Het Nederlandse klimaat kent warme periodes: zo heeft in augustus 2020 een zeer lange hittegolf plaatsgevonden waarbij de maximumtemperatuur in De Bilt acht opeenvolgende dagen op of boven de 30°C lag.^{54,55} De levensduur van een mug bedraagt ongeveer 4 weken, maar de levensduur van *A. plumbeus* kan oplopen tot 2 maanden.¹⁶ Hierdoor kan theoretisch gezien de ontwikkeling van sporozoiëten in de muggen in Nederland tijdens de zomermaanden plaatsvinden. De COGEM is echter van oordeel dat de kans dat zowel een ‘breakthrough’ infectie bij een proefpersoon plaatsvindt, deze niet tijdig gedetecteerd wordt, de geïnfecteerde proefpersoon gebeten wordt door een *A. plumbeus* mug, de temperaturen dusdanig zijn dat de ontwikkeling van de parasiet tot sporozoiët plaatsvindt in de mug en dat deze mug een nieuw persoon bijt en infecteert met sporozoiëten waarbij wederom een ‘breakthrough’ infectie plaatsvindt, verwaarloosbaar klein is.

Gezien het bovenstaande, onder voorbehoud van het includeren van de onderbouwing voor de veiligheidscriteria voor de fase I studie, tezamen met de door het LUMC in acht genomen maatregelen ter controle van proefpersonen, is de COGEM van oordeel dat de kans op verspreiding van het ggo in het milieu verwaarloosbaar klein is.

7. Conclusie en advies

Samengevat is *PfΔmei2* (LA-GAP) geblokkeerd in zijn ontwikkeling en geattenuëerd. Gezien de theoretische mogelijkheid van een ‘breakthrough’ infectie, zullen de proefpersonen welke *PfΔmei2* ontvangen worden gemonitord en behandeld met malariamedicatie indien nodig. De COGEM adviseert om proefpersonen die vroegtijdig de studie verlaten, te behandelen met effectieve malariatherapie. Tevens adviseert de COGEM aan de hand van de moleculaire karakterisatie van *PfΔmei2*, om middels een bioinformatische analyse te controleren of een schadelijk eiwit gevormd kan worden. De COGEM wijst erop dat er gegevens ontbreken betreffende de onderbouwing van criteria waarbij het ggo in de fase I studie veilig wordt beschouwd.

Al het bovenstaande in beschouwing genomen, onder voorbehoud van het aanleveren van de aanvullende informatie betreffende de bovenstaande punten, is de COGEM van oordeel dat de risico’s voor mens en milieu bij de voorliggende aanvraag voor klinische fase I en fase II studies met *PfΔmei2* verwaarloosbaar klein zijn.

8. Signalering

De COGEM signaleert dat er discrepanties of onduidelijkheden binnen de aanvraag bestaan. Alhoewel dit punten betreft die niet van invloed zijn op de uitkomsten van de milieurisicoanalyse, komen

dergelijke onduidelijkheden de inzichtelijkheid van de aanvraag niet ten goede voor derden en mogelijke belanghebbenden. Zo wordt gesteld dat rond 7 en 14 dagen na infectie de meest intensieve monitoringsperiode van proefpersonen zal plaatsvinden, terwijl dit elders in de aanvraag wordt beschreven als rond 6 en 21 dagen na infectie. Tevens wordt vermeldt dat in de fase II studie met een maximale dosis van 50 muggenbeten wordt gewerkt. Er wordt ook vermeldt dat er in vervolgstudies, die geen onderdeel uitmaken van de onderhavige vergunningaanvraag, met een hogere dosis van 75 muggenbeten wordt gewerkt. Echter wordt er in de onderhavige aanvraag bij de studieopzet van de fase II meermaals gesproken over een maximale dosis van 75 muggenbeten in plaats van de eerder genoemde 50, waardoor er onduidelijkheid ontstaat over de toegediende dosis.

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 Med. 7: e1000209
4. World Health Organization. World Malaria Report 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240015791> (bezocht 7 januari 2021)
5. RIVM. Meldingsplicht infectieziekten. www.rivm.nl/Onderwerpen/M/Meldingsplicht_infectieziekten/Welke_infectieziekten_zijn_meldingsplichtig (bezocht 7 januari 2021)
6. RIVM. State of infectious diseases in the Netherlands in 2016. <https://www.rivm.nl/en/news/state-of-infectious-diseases-in-netherlands-2016> (bezocht 7 januari 2021)
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/ (bezocht 7 januari 2021)
13. Nilsson SK *et al.* (2015). Targeting human transmission biology for malaria elimination. PLoS Pathog. 11: e1004871
14. Volkman SK *et al.* (2007). A genome-wide map of diversity in *Plasmodium falciparum*. Nat Genet. 39: 113-119
15. 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
16. Schaffner F *et al.* (2012). *Anopheles plumbeus* (Diptera: Culicidae) in Europe: a mere nuisance mosquito or potential malaria vector? Malar J. 11: 393
17. 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

18. European Centre for Disease Prevention and Control. *Anopheles plumbeus*.
<https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/anopheles-plumbeus> (bezocht 7 januari 2021)
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. Goswami D *et al.* (2020). A replication-competent late liver stage-attenuated human malaria parasite. JCI insight. doi:10.1172/jci.insight.135589
31. Otto, T. D. *et al.* (2014). A comprehensive evaluation of rodent malaria parasite genomes and gene expression. BMC. Biol. 12;86
32. Caldelari, R. *et al.* (2019). Transcriptome analysis of *Plasmodium berghei* during exo-erythrocytic development. Malaria J. 18: 330
33. Dankwa, D. A *et al.* (2016). A *Plasmodium yoelii* Mei2-Like RNA Binding Protein Is Essential for Completion of Liver Stage Schizogony. Infect and imm. 84: 1336-1345
34. Roestenberg, M. *et al.* (2020). A double-blind, placebo-controlled phase 1/2a trial of the genetically attenuated malaria vaccine PfSPZ-GA1. Science transl med. 12
35. Nijhuis, R. H. T *et al.* (2018). Multiplex real-time PCR for diagnosing malaria in a non-endemic setting: a prospective comparison to conventional methods. Eur. Jour. of Clin. Microbiol. & Infec. Dis.: official publication of the European Society of Clinical Microbiology 37: 2323-2329
36. COGEM (2015). Klinische malariavaccinatiestudie met muggen en een deletiemutant van *Plasmodium falciparum*. COGEM advies CGM/150907-04
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 (2015). Klinische malariavaccinatiestudie met een deletiemutant van *Plasmodium falciparum*. COGEM advies CGM/150907-03
40. COGEM (2012). Classificatie humaan- en dierpathogene parasieten. COGEM advies CGM/120127-01

41. Moser, K. A. *et al.* (2020). Strains used in whole organism *Plasmodium falciparum* vaccine trials differ in genome structure, sequence, and immunogenic potential. *Gen med.* 12;6
42. Durand P *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 gen.* 7: 282.
43. Zhang X *et al.* (2019) Rapid antigen diversification through mitotic recombination in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol.* 17: e3000271.
44. Miles A *et al.* (2016) Indels, structural variation, and recombination drive genomic diversity in *Plasmodium falciparum*. *Genome res.* 26: 1288-1299.
45. Walliker D *et al.* (1987) Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 236: 1661-1666.
46. Dankwa DA *et al.* (2016) A *Plasmodium yoelii* Mei2-like RNA binding protein is essential for completion of liver stage schizogony. *Infect and imm.* 84: 1336-1345.
47. College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG), de Geneesmiddelen Informatiebank. <https://www.geneesmiddeleninformatiebank.nl/nl/rvg118552> (bezocht op 11-01-2021)
48. Farmacotherapeutisch Kompas. https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/preparaatteksten/a/artemether_lumefantrine (bezocht op 12-01-2021)
49. Het Nederlandse Soortenregister. <http://www.nederlandsesoorten.nl/> (bezocht op 11-01-2021)
50. Takken W *et al.* (2002) Distribution and dynamics of larval populations of *Anopheles messeae* and *A. atroparvus* in the delta of the rivers Rhine and Meuse, The Netherlands. *AMBIO* 31: 212-218.
51. European Centre for Disease Prevention and Control, *Anopheles atroparvus* <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/facts/mosquito-factsheets/anopheles-atroparvus> (bezocht op 11-01-2021)
52. De Zulueta J *et al.* (1975). Receptivity to malaria in Europe. *Bulletin of the World Health Organization* 52: 109.
53. Ramsdale CD & Coluzzi M (1975) Studies on the infectivity of tropical African strains of *Plasmodium falciparum* to some southern European vectors of malaria (No. WHO/MAL/75.859) World Health Organization.
54. Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut (KNMI). <https://www.knmi.nl/over-het-knmi/nieuws/recordwarme-week> (bezocht op 11-01-2021)