Universiteit Leiden
The Netherlands

Safety and efficacy after immunization with Plasmodium falciparum sporozoites in the controlled human malaria infection model

Schats, R.

Citation
Schats, R. (2019, November 12). *Safety and efficacy after immunization with Plasmodium falciparum sporozoites in the controlled human malaria infection model*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/80326

Version:	Publisher's Version
License:	Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden
Downloaded from:	https://hdl.handle.net/1887/80326

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page

Universiteit Leiden

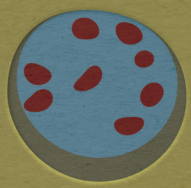
The handle http://hdl.handle.net/1887/80326 holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Schats, R.
Title: Safety and efficacy after immunization with Plasmodium falciparum sporozoites in the controlled human malaria infection model
Issue Date: 2019-11-12

Indonesia Aceh. April 2006. Malaria survey in villages of Aceh performing interviews and malaria tests.

CHAPTER 8

Summary
Samenvatting



SUMMARY

Using a variety of anti-malaria tools, numerous efforts have been made to stop malaria over the past decades. These tools include DDT fumigation, improved diagnosis (rapid tests) and treatment (ACT), distribution of bed nets and spraying of houses and water places near houses. The combined strengths of these tools resulted in a steady decline of malaria in several endemic countries worldwide but unfortunately so far without elimination of malaria. Unfortunately, it has been shown that if one or a combination of these tools are no longer stringently applied, malaria incidence can rapidly increase. A more permanent solution is urgently needed and availability of an effective vaccine, together with all other existing tools will be critical to halt malaria or even succeed to final eradication.

In that perspective, we studied the potential of whole sporozoite immunization. Dutch healthy volunteers were immunized according to the CPS model, which encompasses immunizations under chemoprophylaxis via bites of *Anopheles* mosquitoes, infected with P. *falciparum* sporozoites. It has been previously shown that three inoculations by 15 *P. falciparum* infected *Anopheles* mosquitoes results in 100% sterile homologous protection. Protection is evaluated in the Controlled Human Malaria Infection (CHMI) model.

In this thesis we further explored the CPS model and assessed different immunizing doses, type of chemoprophylaxis and immunological determinants of disease and protection.

In **chapter 2** we reduced the immunization dose from 3x15 bites to 3x10 bites and to 3x5 bites and found a clear dose dependent efficacy in the CPS model; when reducing the immunization dose to 3x5 bites the efficacy was reduced to 50% protection. After challenge and follow-up, volunteers can be grouped to either being sterilely protected, completely unprotected or partially protected as defined by a significantly prolonged pre-patent period compared to control volunteers.

In addition we evaluated immune responses related to protective immunity. In vitro re-stimulation tests showed CD4 T cells expressing CD107a and CD8 T cells producing granzyme B are associated with protection in het CPS model.

Chloroquine (CQ), has known immuno-modulating properties with potential effects on the high protective efficacy. In **chapter 3** we, therefore, evaluated whether Mefloquine (MQ), is also effective in inducing protective immunity. Although the number of volunteers in each arm in this study was relatively low, we found no differences in efficacy when comparing these two drugs using three times eight infective bites. Also, no differences in immune responses were found.

In most CPS trials, the P. *falciparum* strain NF54 is used both for immunizations and challenge to assess homologous protection. In the field many genetically different strains circulate and a future vaccine should be able to cover multiple strains. To be able to use the CPS model in field settings in the future protection to a wide range of other strains are needed.

In **chapter 4** we re-challenged a subset of the volunteers who participated in the study in **chapter 2** with a different strain to assess heterologous protection. Re-challenging with a strain NF135 from Cambodia, showed that two out of thirteen volunteers were also heterologously protected at 14 months after immunization.

Despite the use of malaria chemoprophylaxis during the immunization period, participants in the CPS model usually experience symptoms and signs of malaria. Volunteers can experience usually mild symptoms of fever, muscle pain, headache and general malaise. Unprotected volunteers may develop signs and symptoms of clinical malaria after challenge before treatment is initiated.

To reduce the severity of such symptoms after challenge as well as the associated delay of treatment, more sensitive molecular parasite detection methods such as qPCR can be used to potentially reduce the clinical symptoms of malaria for volunteers. In **chapter 5** we retrospectively assessed the parasitological dynamics and adverse events in case of a positive qPCR rather than thick smear. Analysing parasite data of the clinical trials described in **chapters 2 and 3**, we found that parasite density and adverse events on day of treatment considerably reduce if treatment would be initiated based on positive qPCR . However, different end-points in studies will change parasitological and immunological assessment when treating volunteers shorter after challenge.

In **chapter 6** we retrospectively assess which qPCR cut-off parasite densities should be used to optimise both the reduction in adverse events for volunteers and simultaneously be able to acquire sufficient relevant immunological and parasitological data. A qPCR threshold of 100 parasites/ml was accompanied with a 99 % sensitivity and 100 % specificity and resulted in a shortening of the prepatent period with 3,5 days when compared to thick smear.

The world is waiting for an highly effective malaria vaccine. CPS is currently not suitable for large scale field applicability yet. In the meanwhile an injectable variant of radiation attenuated sporozoites (*Pf*SPZ-CVac) is being further optimized and might be effective and implementable on a larger scale. Additionally, other vaccine initiatives such genetically attenuate parasites (GAP) are being tested. Finally, improving existing vaccines like RTS,S with multistage antigens and new adjuvants might be an option to improve its efficacy.

The implementation of malaria vaccines in endemic areas will most probably face several new tremendous challenges. For instance, many people in malaria endemic areas are infected with helminth infections which may impact on vaccine efficacy. Introducing a malaria vaccine that does not cover all immunological relevant strains might select immuno-resistant strains and thereby affecting vaccine efficacy and could theoretically make the vaccine useless.

Successful malaria eradication will be more likely to be achieved with a multi-disciplinary approach including all relevant disciplines like clinicians, parasitologists, epidemiologists and bio-statisticians. But most important the affected populations and their governments need to accept vaccination. Additionally, sufficient and continuous funds will proof to be of tremendous necessity.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De laatste twintig jaar heeft men met een grote verscheidenheid aan anti-malaria maatregelen getracht malaria een halt toe te roepen. Deze maatregelen bestonden onder andere uit het vernevelen van langwerkende insecticiden (zoals DDT) in huizen, het verbeteren van de malaria-diagnostiek, het gebruik van krachtig werkzame anti-malaria behandeling (artemisinin combination therapy; ACT) en het bevorderen van het slapen onder geïmpregneerde klamboes. Samen resulteerden de gecombineerde maatregelen in een gestage afname van malaria in vele landen in de wereld waar deze ziekte voorkomt. Helaas heeft het echter niet geleid tot de totale uitroeiing van deze dodelijke bloedparasiet.

Bovendien kan malaria weer zeer snel toenemen als deze maatregelen niet langer strikt worden nageleefd. Een meer definitieve oplossing is daarom dringend nodig. Zo zal de beschikbaarheid van een effectief vaccin, samen met alle andere bestaande anti-malaria maatregelen, uitermate belangrijk zijn om malaria te stoppen of zelfs volledig uit te roeien.

In dit proefschrift bestudeerden wij de veiligheid en effectiviteit van de herhaalde toediening van muggenbeten met het infectieuze stadium (sporozoïeten) van de malariaparasiet *Plasmodium falciparum* onder bescherming van een anti-malariamiddel (ook wel 'whole sporozoite immunisation under chemoprophylaxis' of CPS genoemd). Eerder werd aangetoond dat Nederlandse vrijwilligers na CPS volledig beschermd waren tegen een infectie met dezelfde stam (homologe bescherming). Deze bescherming werd getest door vrijwilligers bloot te stellen aan een 'gecontroleerde malaria infectie' ('Controlled Human Malaria Infection' (CHMI) model) via geïnfecteerde muggenbeten, maar dit keer zonder chemoprofylaxe. Het bloed van de vrijwilligers werd daarna op vaste tijdstippen nauwgezet microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van malariaparasieten. Zodra malariaparasieten werden gezien, werd gestart met de behandeling.

In dit proefschrift werd CPS verder geëxploreerd waarbij het effect van lagere immunisatie doses, andere malariaprofylaxe en gevoeligere malariadiagnostiek werden getoetst. Hierbij werd gekeken naar mate van ziekzijn en bescherming na CHMI en naar de afweermechanismen die hierbij een rol spelen.

In **hoofdstuk 2** werd de immunisatiedosis verlaagd van 3 x 15 naar 3 x 10 en 3 x 5 geïnfecteerde muggenbeten. We vonden een duidelijke relatie tussen dosis en effectiviteit van CPS: wanneer de dosis werd verlaagd naar 3 x 5 beten, nam de bescherming met de helft af.

Niet alle vrijwilligers waren echter volledig beschermd na een gecontroleerde infectie. Bij sommige vrijwilligers trad malaria wel op, maar dat gebeurde significant later dan bij controle vrijwilligers die geen enkele vorm van bescherming hadden. Door deze verschillen in bescherming (volledig of gedeeltelijk beschermd en onbeschermd) was het mogelijk om de afweerreactie te onderzoeken die samenhangt met bescherming. In het laboratorium werd aangetoond dat bepaalde typen afweercellen, namelijk CD4 T-cellen (CD4 en CD8 T cellen) met speciale afweercelkenmerken (CD107a) en CD8 T-cellen die bepaalde afweerstoffen (granzyme B) produceerden, die vaker voorkomen bij personen die beschermd zijn tegen malaria. Deze stoffen en celkenmerken en stoffen worden geproduceerd door het immuunsysteem om de met malaria geïnfecteerde lichaamscellen te kunnen doden.

Chloroquine (CQ) is een antimalariamiddel dat al sinds de veertiger jaren bestaat. CQ heeft ook afweer-veranderende eigenschappen waarvan bij auto-immuunziekten, zoals reuma, gebruik wordt gemaakt bij auto-immuunziekten, zoals reuma. Deze eigenschappen van CQ zouden mogelijk een belangrijk deel van de beschermende effectiviteit van CPS kunnen verklaren. In **hoofdstuk 3** werd daarom onderzocht of mefloquine, een verwant malariamedicijn, ook effectief is in het opwekken van beschermende immuniteit na CPS. Alhoewel het aantal vrijwilligers in elke studie-arm relatief klein was, vonden we geen verschil in effectiviteit van CPS met 3 x 8 muggenbeten. Ook vonden we geen verschillen in afweerrespons.

In de meeste onderzoeken wordt zowel voor de immunisatie (CPS) als voor de beoordeling van bescherming (CHMI) de Afrikaanse *P. falciparum* stam NF54 gebruikt.

In gebieden waar malaria veel voorkomt, circuleren echter verschillende stammen van *P. falciparum*. Het vaccin van de toekomst zou dan ook tegen al deze stammen bescherming moeten bieden. Om CPS te kunnen toepassen in verschillende landen waar malaria voorkomt moet het dus bescherming bieden aan een breed scala aan stammen.

In **hoofdstuk 4** werd een deel van de vrijwilligers, die 14 maanden eerder deelnamen aan de studie van **hoofdstuk 2**, opnieuw blootgesteld aan een gecontroleerde infectie. Echter, ditmaal met een *P. falciparum* stam uit Cambodja (NF135). Bij (slechts) twee van de 13 vrijwilligers werd volledige bescherming tegen deze vreemde stam aangetoond (heterologe bescherming).

Er zijn veel meer parasieten nodig in het bloed (parasietendichtheid) om malaria te kunnen aantonen met microscopisch onderzoek van een dikke druppel bloed, dan met een kwantitatieve polymerasekettingreactie (qPCR) waarbij een stukje van het kernmateriaal (DNA) van de malariaparasiet meer dan een miljoen keer wordt vermenigvuldigd. Het gebruik van deze veel

gevoeligere malariadetectiemethode zou dus kunnen leiden tot het eerder vaststellen van malaria, het sneller starten van de anti-malaria behandeling en het verminderen van de duur en de ernst van het ziekzijn door malaria bij vrijwilligers na een gecontroleerde infectie.

In **hoofdstuk 5** werd daarom teruggekeken naar de gegevens van de studies uit **hoofdstuk 2 en 3**. Als de veel gevoeligere qPCR zou zijn gebruikt in plaats van het dikkedruppelonderzoek, dan zou er anderhalve dag eerder met de malariabehandeling gestart zijn, was de parasietendichtheid met 90% afgenomen en waren de klachten op de dag van behandeling 70% minder uitgesproken.

In **hoofdstuk 6** werd aan de hand van negen eerder uitgevoerde CHMI studies uitgezocht wat het optimale qPCR afkappunt is om enerzijds de klachten bij vrijwilligers zo veel mogelijk te beperken en anderzijds voldoende betrouwbare gegevens over parasietendichtheid en afweerreactie te verkrijgen. Een drempelwaarde van 100 parasieten per milliliter had een sensitiviteit van 99% en een specificiteit van 100% en resulteerde in een verkorting van tijd tot het stellen van de diagnose met 3,5 dagen gesteld in vergelijking met het dikkedruppelonderzoek.

De wereld wacht al lange tijd op een effectief malariavaccin. CPS is op dit moment echter nog niet geschikt voor grote vaccinatiecampagnes. Ondertussen wordt hard gewerkt aan een injecteerbare variant van door bestraling geïnactiveerde sporozoïeten (Sanaria *Pf*SPZ vaccine). Met dit vaccin worden fase-2 studies in verschillende Afrikaanse landen uitgevoerd. Na verdere optimalisatie zou dit vaccin mogelijk op een grotere schaal ingezet kunnen worden en effectief zijn. Daarnaast worden andere methoden voor het verzwakken van sporozoïeten uitgetest zoals door wijziging van genetische code van de malariaparasiet (genetically attenuated malaria parasite of GAP).

Tenslotte wordt het reeds bestaande vaccin RTS,S, waar in Afrika al mee gevaccineerd wordt, verder worden geoptimaliseerd met antigenen uit andere stadia van de parasiet of met andere hulpstoffen (adjuvans) om de effectiviteit daarvan te vergroten.

De implementatie van malariavaccins in malaria gebieden zal ongetwijfeld weer nieuwe uitdagingen met zich meebrengen. In veel malariagebieden zijn mensen vaak geïnfecteerd met wormen die mogelijk de effectiviteit van vaccinatie negatief zouden kunnen beïnvloeden. Daarnaast kan de introductie van een malariavaccin, dat als het niet tegen alle stammen voldoende afweer biedt, er voor zorgen dat er een selectie plaatsvindt van stammen waartegen het vaccin minder werkzaam is en mogelijk uiteindelijk hierdoor onwerkzaam wordt.

Succesvolle uitroeiing van malaria zal waarschijnlijk alleen bereikt kunnen worden door betrokkenheid en intensieve samenwerking van vele disciplines zoals artsen, parasitologen, epidemiologen en bio-statistici. De allerbelangrijkste factor is wellicht dat de lokale bevolking de vaccinatie accepteert en er een continue voldoende geldstroom zal zijn om malaria tot de laatste parasiet uit te roeien.