



Formulier

Projectvoorstel dierproeven

- Dit formulier gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit formulier hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie vindt u in de '*Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning*' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

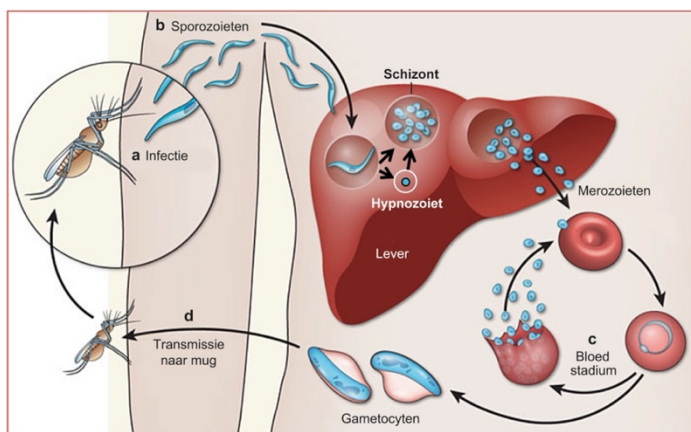
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2.1 aangekruiste categorieën.

Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten voor de mens, en treft vooral het armste deel van de wereldbevolking in de (sub)tropen. Malaria is een ernstige ziekte, vaak met dodelijke afloop. Het grote aantal ziektegevallen in de betreffende landen heeft een grote negatieve invloed op de sociaaleconomische ontwikkeling in die landen. In 2020 stierven ca. 627.000 mensen, vooral kinderen jonger dan 5 jaar, aan

deze ziekte en bijna de halve wereldbevolking wonend in zo'n 95 landen loopt risico op een malariabesmetting. Deze aantallen zijn toegenomen ten opzichte van 2019, voor een groot deel door de COVID pandemie die diagnose en tijdige behandeling verhinderd heeft. Een goed werkend vaccin is nog steeds niet beschikbaar en de malariaparasiet wordt in hoog tempo resistent tegen de huidige geneesmiddelen. Onderzoek naar effectieve vaccins en nieuwe geneesmiddelen is dan ook zeer urgent om uiteindelijk malaria uit te roeien (1).

Malaria wordt veroorzaakt door Plasmodiumparasieten, die door malariamuggen van de soort *Anopheles* worden overgedragen. Na een muggenbeet infecteren de parasieten (sporozoïeten genaamd) eerst de lever, waar ze zich in 6-10 dagen vermenigvuldigen (figuur 1). Dit deel van de infectie is zonder symptomen. Als de geïnfecteerde levercel openbarst komen 10.000-40.000 nieuwe parasieten (merozoïeten) vrij, die rode bloedcellen infecteren en zich cyclisch ~10-voudig vermenigvuldigen. Dit bloedstadium veroorzaakt de verschijnselen van malaria. In het bloed vormen zich ook geslachtelijke cellen (gametocyten) die, wanneer opgenomen via een muggenbeet, en na bevruchting in de mug, uiteindelijk weer leiden tot sporozoïeten in de speekselklieren van de mug.

Er zijn 5 Plasmodium soorten die ziekte geven in de mens, waarvan *P. falciparum* en *P. vivax* de belangrijkste zijn. De meeste doden worden door *P. falciparum* veroorzaakt, terwijl *P. vivax* ernstige ziekte en soms ook de dood van patiënten veroorzaakt. Plasmodiumparasieten hebben een nauw gastheerbereik; er zijn Plasmodiumsoorten die vogels, reptielen, knaagdieren, apen en mensen van nature infecteren. De meeste apenmalariaparasieten infecteren ook mensen en sommige zijn een belangrijke zoönose. De twee belangrijkste humane malariaparasieten (*P. falciparum* en *P. vivax*) infecteren experimenteel alleen chimpansees, *Aotus* en *Saimiri* (Nieuwe Wereld) apen. De parasieten moeten aan deze apen geadapteerd worden en meestal moeten de apen gesplenectomeerd worden om een waarneembare bloedstadiuminfectie te kunnen krijgen. Door deze restricties en door de zeer beperkte beschikbaarheid van deze apensoorten voor biomedisch onderzoek worden deze modellen niet heel frequent gebruikt, hoe waardevol ze ook kunnen zijn (2).



Figuur 1. De levenscyclus van malaria. Sporozoïeten uit de mug infecteren de lever. Hypnozoïeten in de lever komen alleen bij *P. vivax*, *P. ovale* (menselijke malaria parasieten), en een klein aantal niet-humane primaten malarias voor. Merozoïeten vanuit de lever infecteren rode bloedcellen, waarin de parasiet zich cyclisch vermenigvuldigt. Ook vormen zich dan geslachtelijke stadia (gametocyten), die de mug weer infecteren.

P. vivax is één van de twee humane malariaparasieten die in de lever slapende stadia (hypnozoïeten, zie figuur 1) vormen. Deze kunnen na weken, maanden of jaren reactiveren en weer aanleiding geven tot malariaverschijnselen, zonder dat een nieuwe infectie is opgetreden. Hypnozoïeten vormen een grote belemmering voor de toekomstige uitroeiing van de parasiet, vooral omdat na re-activatie geïnfecteerde individuen alweer besmettelijk zijn voor muggen voordat ze malaria symptomen krijgen. Er blijft dus transmissie van mens naar mug (en weer naar mens) plaatsvinden, direct vanuit gereactiveerde hypnozoïeten. Veilige nieuwe geneesmiddelen zijn nodig om deze stadia te bestrijden. Op dit moment zijn alleen primaquine en tafenoquine geregistreerd als geneesmiddel tegen hypnozoïeten en deze hebben veel bijwerkingen en bovendien lijkt de parasiet resistentie tegen primaquine te ontwikkelen (3).

Onderzoek naar *P. vivax* is bijzonder lastig, omdat de bloedstadia van de parasiet niet *in vitro* gekweekt kunnen worden. Voor de productie van sporozoïeten, die nodig zijn om onderzoek te doen naar *P. vivax* leverstadia is men afhankelijk van de beschikbaarheid van bloed van patiënten, waarmee muggen geïnfecteerd kunnen worden. Voor de *P. vivax* leverstadia zelf is onlangs een chimeer muismodel ontwikkeld, met humane hepatocyten, waarin *P. vivax* leverstadia zich ontwikkelen en waarin zich ook

hypnozoieten vormen (4). Dit model is, naast *in vitro* kweekmodellen, geschikt voor biologische studies en vooral voor een eerste *in vivo* evaluatie van nieuwe geneesmiddelen tegen hypnozoieten, echter voor het screenen van grote aantallen geneesmiddelen tegen hypnozoieten is dit *in vivo* model niet geschikt (*in vivo* modellen hebben inherent een veel te lage 'throughput'). Daarnaast zijn ook biologische studies lastig, omdat daarvoor veel sporozoieten van dezelfde parasiet lijn nodig zijn (deze hebben exact dezelfde biologie). De meest gebruikte bron van *P. vivax* sporozoieten is bloed van geïnfecteerde mensen en vaak heeft ieder individu weer een iets andere parasiet, wat biologische studies aan dezelfde parasiet in het gehumaniseerde muizenmodel bemoeilijkt. Tot slot is, door de zeer beperkte beschikbaarheid van *P. vivax* parasieten (uit mensen) en de afhankelijkheid van nieuwe wereldapen (Aotus, Saimiri) voor experimentele infecties, genetische manipulatie technologie van *P. vivax* voor toegepaste biologische studies en zgn. 'target discovery' en -validatie zeer slecht ontwikkeld. Deze technologie heeft bijvoorbeeld bij biologische studies aan *P. falciparum* voor grote doorbraken gezorgd en dat missen we compleet in *P. vivax*.

Op het instituut waar dit onderzoek uitgevoerd zal worden, wordt het probleem rond geneesmiddelenonderzoek voor *P. vivax* aangepakt door te werken met de apen malaria *P. cynomolgi*. Dit is de zuster parasiet van *P. vivax* met een vrijwel identieke biologie (inclusief vorming van hypnozoieten). *P. cynomolgi* infecteert van nature resusapen en ook mensen en is historisch veel gebruikt in *in vivo* onderzoek naar medicijnen tegen hypnozoieten. De bloedstadia van 1 specifieke stam van deze parasiet kunnen *in vitro* gekweekt worden, maar helaas is transmissie vanuit *in vitro* kweken om op grote schaal muggen te infecteren nog niet mogelijk. Er is een procedure ontwikkeld waarbij met bloed uit een geïnfecteerde resusaap muggen worden gevoed, waaruit dan sporozoieten worden geïsoleerd voor *in vitro* leverstadium onderzoek en drug screening. In de *in vitro* leverstadium kweek worden primaire resusaap hepatocyten gebruikt, die geïsoleerd worden uit dieren die geëuthanaseerd worden om veterinaire en/of kolonimanagement redenen en waaruit naast de lever ook andere organen voor *in vitro* studies geïsoleerd worden. Hepatocyten worden ofwel vers gebruikt, ofwel ingevroren en op een later moment gebruikt. Iedere keer wordt dezelfde *P. cynomolgi* stam gebruikt, om genetische en biologische variatie te vermijden. Voor drugscreening, dat vroeger geheel *in vivo* uitgevoerd werd in het gouden standaard *P. cynomolgi*-resusaap model (5), is een *in vitro* platform ontwikkeld waarbij de activiteit van potentiële geneesmiddelen op hypnozoieten in *in vitro* drug assays gemeten kan worden. Recentelijk is een genetisch gemodificeerde *P. cynomolgi* lijn ontwikkeld, waarmee drug screening efficiënter, nauwkeuriger en op grotere schaal kan worden uitgevoerd, waardoor per geïnfecteerde resusaap (nodig om muggen te voeden) meer verschillende potentiële geneesmiddelen getest kunnen worden (6). Het toegepaste onderzoek dat in dit kader uitgevoerd wordt bestaat uit een aantal onderdelen:

- i) Productie van sporozoieten voor leverstadium onderzoek, inclusief de *in vitro* drug assays, waarvoor parasiet donorresusapen gebruikt worden.
- ii) *In vivo* evaluatie van de activiteit van geoptimaliseerde potentiële geneesmiddelen die met de *in vitro* assays zijn geïdentificeerd.
- iii) *In vivo* parasiet transfectiestudies om genetisch gemodificeerde parasieten te maken om:
 - a. drug targets te identificeren in leverstadia. Dit kan bijv. gebeuren door eerst merker parasieten met behulp van de merker (bijv. fluorescentie) in grote hoeveelheden te zuiveren uit *in vitro* kweken en dan via -omics studies processen in de hypnozoiet en in de geïnfecteerde gastheercel te ontdekken die gebruikt kunnen worden om nieuwe geneesmiddelen tegen de parasiet en/of de geïnfecteerde gastheercel (maar mogelijk ook vaccins en diagnostica, gebaseerd op unieke hypnozoiet eiwitten of metabolieten) te ontwikkelen. Als parasieten met PET-CT *in vivo* zichtbaar kunnen worden gemaakt (zie iv) kunnen geïnfecteerde levercellen via image-geleide biopten geïsoleerd worden voor single-cell omics analyses, zodat foutieve identificatie van drug targets door te verwachten *in vitro*-*in vivo* verschillen voorkomen kan worden.
 - b. drug targets te valideren in leverstadia, bijv. door gen modificatie- of knock out studies, waarbij de hypnozoiet dood moet gaan als de drug target essentieel is voor het overleven van de parasiet.

- c. Leverstadiumparasieten zichtbaar te maken voor PET-CT studies. Hiervoor zullen specifieke receptoren voor PET tracers door de leverstadiumparasiet tot expressie gebracht moeten worden.

Voor transfectiestudies zijn parasiet donor resusapen nodig om voldoende bloedstadium parasieten te leveren voor de transfecties; Na de (*ex vivo*) transfecties worden de getransfecteerde bloedstadium parasieten gebruikt om acceptor resusapen te infecteren. Van deze acceptor apen wordt bloed afgenomen met de getransfecteerde parasieten om daarna parasiet stocks te maken voor later gebruik en geïnfecteerd bloed aan muggen te voeren voor sporozoiet productie en verder leverstadium onderzoek. Het optimaliseren van (nieuwe) transfectie constructen en protocollen gebeurt met *in vitro* gekweekte *P. cynomolgi* bloedstadium parasieten; alleen wanneer leverstadium onderzoek nodig is zullen *in vivo* transfecties uitgevoerd worden met geoptimaliseerde protocollen, omdat transmissie via de mug van *in vitro* bloedstadium parasieten nog niet goed mogelijk is.

- iv) PET-CT studies om de *in vivo* biologie van leverstadium parasieten te karakteriseren en begrijpen en *in vivo* geneesmiddelenstudies te verkorten (verfijning). Doordat het lot van parasieten na een geneesmiddelbehandeling in de lever gevisualiseerd kan worden (en er dus niet zo lang gewacht hoeft te worden tot er uiteindelijk nog nieuwe bloedstadium parasieten verschijnen, als niet alle hypnozoieten gedood zouden zijn).

3.2 Doel

3.2.1 Beschrijf het directe en het uiteindelijke doel van het project. Beschrijf de bijdrage van het behalen van het directe doel aan het uiteindelijke doel.

- Indien het directe doel bestaat uit verschillende subdoelstellingen, benoem deze dan hier.

Zoals hierboven beschreven zijn nieuwe geneesmiddelen tegen hypnozoieten hard nodig in de strijd tegen malaria. Dit uiteindelijke doel wordt bereikt door te werken aan diverse aspecten van geneesmiddelenontwikkeling, samengevat in 4 subdoelstellingen.

1. Willekeurige screening van grote hoeveelheden nieuwe potentiële middelen van diverse chemische samenstelling op *in vitro* hypnozoiet kweken. Zoveel mogelijk verzamelingen van chemische stoffen worden getest voor activiteit op de leverstadium parasieten, om zoveel mogelijk 'hits' te krijgen. Hierdoor wordt de kans dat enkele van deze hits ook daadwerkelijk tot medicijn ontwikkeld kunnen worden vergroot (het percentage dat afvalt in het ontwikkelingsproces is groter dan 90%). Het doel is om in de komende 5 jaar tienduizenden chemische en biologische stoffen getest te hebben op activiteit tegen hypnozoieten. In de afgelopen jaren hebben we de hypnozoiet drug assay verder geoptimaliseerd door te miniaturiseren en gebruik te maken van nieuwe merker parasieten, waarmee we heel gevoelig specifiek de activiteit van stoffen op hypnozoieten kunnen meten (6). Tevens zijn we bezig de assay uit te voeren bij een professioneel screeningscentrum, waar de assay grotendeels geautomatiseerd uitgevoerd kan worden. Dit geeft de mogelijkheid om veel meer stoffen te testen per batch sporozoieten, waardoor er optimaal gebruik gemaakt wordt van een parasiet donoraap.
2. Vanuit de 'hits' onder 1 zullen stoffen geoptimaliseerd worden om betere activiteit te krijgen. Potentieel nieuwe medicijnen met optimale *in vitro* activiteit tegen hypnozoieten moeten *in vivo* gevalideerd worden in het gouden standaard *P. cynomolgi*-resusaap model, voordat ze in klinische studies in mensen getest kunnen worden. Naar verwachting zullen dit maar enkele stoffen zijn in de komende 5 jaar. De afgelopen jaren is geen enkel product hiervoor in aanmerking gekomen.

Vanuit het standpunt dat het beter begrijpen van de biologie van de parasiet zal leiden tot een snellere ontwikkeling van nieuwe, werkzame medicijnen, zijn punt 3 en 4 gericht op het bestuderen van de biologie van de parasiet.

3. Er is vrijwel niets bekend van de biologie van hypnozoieten in de lever van geïnfecteerde individuen. Onbekendheden zijn bv: Waar in de lever zijn hypnozoieten gelokaliseerd, zijn er voorkeursplekken; als ze reactiveren, gaat dat 1 voor 1 en verandert dat over de tijd? Om dit te kunnen waarnemen en tevens dmv "image-guided biopsy" individuele parasieten en gastheercellen uit de lever te kunnen isoleren voor diepgaande moleculaire analyse (waarbij de data vergeleken worden met die van *in vitro* gekweekte parasieten om belangrijke verschillen in kaart te brengen en te gebruiken om nieuwe drug targets te identificeren), gaan we parasieten ontwikkelen (punt 4) die we zichtbaar kunnen maken mbv PET-CT in geïnfecteerde resusapen. Als dat lukt, kunnen we op een niet-invasieve manier de ontwikkeling van lever stadium parasieten over de tijd volgen. Met deze methode kunnen we vervolgens ook studies onder punt 2 verder verfijnen: ipv na een geneesmiddelbehandeling standaard 100 dagen te wachten en dmv vele kuitprikjes te kijken of er parasieten in het bloed verschijnen (zo niet, dan was de behandeling succesvol), kunnen we beperkt tijdens en/of na de behandeling direct niet-invasief naar de leverparasieten kijken of ze allemaal verdwenen zijn en kunnen studies veel sneller en met veel minder kuitprikjes gestopt worden.
4. Het directe doel van parasiet transfecties is de biologie van de parasiet nader karakteriseren. Dit leidt dan uiteindelijk tot het identificeren en valideren van mogelijke drug targets, waar specifiek geneesmiddelen tegen gemaakt kunnen worden, en het maken van merker parasieten die zichtbaar gemaakt kunnen worden met bijvoorbeeld PET-CT (punt 3) en die gebruikt kunnen worden in betere, specifiekere drug assays, te gebruiken onder punt 1.

De opgedane kennis van de biologie van de parasiet zal zeker een belangrijke bijdrage leveren aan de interpretatie van de uitkomst van drug assays (hoe werken de gevonden actieve stoffen en doden ze de echt slapende parasieten en hoe snel gaat dat).

3.2.2 Hoe wordt de haalbaarheid van het directe doel gewaarborgd?

De afgelopen jaren is grote progressie gemaakt met de verdere ontwikkeling van een *in vitro* malaria leverstadium platform voor het screenen van geneesmiddelen (6) en in een *in vivo* transfectie platform voor *P. cynomolgi* (7), waarmee transgene parasieten gemaakt kunnen worden die ook weer in de *in vitro* leverstadium kweken geanalyseerd kunnen worden. Verder is er ook meer bekend geworden over de biologie van hypnozoieten (8, 9), maar hier zijn nog grote stappen te maken. Tevens is recentelijk een *P. cynomolgi* stam ontwikkeld waarvan de bloedstadia *in vitro* langdurig te kweken zijn (10). Helaas is grootschalige transmissie van deze *in vitro* parasiet (nog) niet mogelijk, zodat geheel *in vitro* bestudering van lever stadia niet mogelijk is, maar deze parasiet kan wel gebruikt worden om nieuwe transfectie technologieën *in vitro* te testen en te optimaliseren. Werkzame technologie kan dan in een *in vivo* transfectie gebruikt worden om transgene parasieten te genereren waarmee de lever stadia te bestuderen of lever drug assays uit te voeren. Op dit moment is het instituut waar het beschreven onderzoek plaats vindt het enige lab in de wereld dat routinematig malaria hypnozoieten in kweek heeft voor drug screening en toegepaste studies aan de biologie van de hypnozoiet en daarnaast een robuust *in vivo* malaria model heeft, waarmee potentiële geneesmiddelen preklinisch geëvalueerd kunnen worden. Tevens is al een aantal transgene *P. cynomolgi* lijnen beschikbaar voor verder onderzoek en drug screening. Met alle opgedane kennis en ervaring is de haalbaarheid van het project zeer groot.

3.2.3 Is voor de uitvoering van dit project andere wet- en regelgeving van toepassing die een invloed zou kunnen hebben op het welzijn van de dieren en/of de haalbaarheid van het directe doel?

Nee

Ja > Geef aan welke wet-en regelgeving van toepassing is en beschrijf de effecten daarvan op het welzijn van de dieren en de haalbaarheid van het project.

3.3 Belang

3.3.1 Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelen.

Malaria is één van de belangrijkste infectieziekten, veroorzaakt door 5 verschillende humane malaria parasieten. Deze parasitaire ziekte komt voor in de tropen en subtropen en treft vooral de armste bevolking op aarde. Het grote aantal ziektegevallen zorgt ervoor dat kinderen niet naar school kunnen en volwassenen niet goed kunnen deelnemen aan het arbeidsproces. Dit heeft een desastreuze invloed op de sociaaleconomische ontwikkeling van de getroffen landen waar malaria in grote mate voorkomt. Dodelijke slachtoffers, zo'n 600.000 per jaar, zijn vooral kinderen jonger dan 5 jaar in Afrika ten zuiden van de Sahara. Er bestaan nog geen goed werkende vaccins en de malariaparasieten worden in hoog tempo resistent tegen bestaande geneesmiddelen; onderzoek dat leidt tot nieuwe vaccins en geneesmiddelen is dan ook zeer urgent om de ziekte onder controle te houden en uiteindelijk uit te roeien. Buiten Afrika is *Plasmodium vivax* de meest voorkomende malariaparasiet die mensen infecteert. Deze parasiet veroorzaakt niet zo vaak dodelijke slachtoffers, maar heeft door de ernstige ziekte die hij toebrengt, een grote sociaaleconomische impact op de endemische gebieden. *P. vivax* heeft een unieke eigenschap die niet voorkomt bij de humane malariaparasiet die de meeste dodelijke slachtoffers veroorzaakt (*P. falciparum*); hij vormt namelijk slapende parasieten (hypnozoieten) in de lever na een infectie door een besmette muggenbeet. Deze parasieten vormen een verborgen parasieten reservoir (lever infecties verlopen asymptomatisch) en zijn een ernstige complicatie bij de uiteindelijke uitroeiing van malaria met medicijnen en vaccins. Er zijn maar 2 geneesmiddelen (van dezelfde chemische klasse) geregistreerd die hypnozoieten kunnen doden, primaquine en tafenoquine. Deze middelen hebben vele bijwerkingen en kunnen niet door iedereen veilig gebruikt worden, bovendien beginnen parasieten resistent te worden tegen primaquine (tafenoquine is nog te kort op de markt om hier al iets over te kunnen zeggen). Het hier beschreven onderzoek is erop gericht om nieuwe, veilige geneesmiddelen te ontwikkelen voor de behandeling van hypnozoieten, door meer kennis op te doen over de (moleculaire) biologie van de hypnozoiet (zowel *in vitro* als *in vivo*) en door grote hoeveelheden potentiële geneesmiddelen te screenen op de hypnozoiet, en actieve middelen verder te testen op de werking. De opgedane biologische kennis zal mogelijk zwakke plekken in de hypnozoiet blootleggen, die aangepakt kunnen worden met nieuwe geneesmiddelen. Positieve resultaten uit dit onderzoek zullen leiden tot het terugdringen van het aantal met *P. vivax*-geïnfecteerde mensen, waardoor *vivax* malaria verder onder controle gebracht kan worden en uiteindelijk hopelijk geëlimineerd.

3.3.2 Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden wat hun belang is.

De belanghebbenden in dit project zijn alle mensen die leven in *P. vivax* malaria-endemische gebieden in de tropen en subtropen. Een nieuw, veilig geneesmiddel dat hypnozoieten doodt zal hen vrijwaren van steeds terugkerende *vivax* malaria aanvallen en dus hun gezondheid en sociaaleconomische ontwikkeling verbeteren. De dieren die in de genoemde experimenten gebruikt worden hebben hier geen voordeel van (behalve dat sommige *in vivo* effectiviteitsstudies mogelijk verfijnd kunnen worden); zij zullen minimaal tot matig ongerief ondervinden.

3.4 Strategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project. Besteed aandacht aan de eventuele fasering in de uitvoering en de samenhang. Vermeld eventuele mijlpalen, keuzemomenten en beslisriteria.

Het project bestaat uit 3 onderdelen die na elkaar of gelijktijdig kunnen plaatsvinden: **Het eerste onderdeel** is op grote schaal screenen van potentieel nieuwe geneesmiddelen op *in vitro* gekweekte *P. cynomolgi* leverstadium parasieten. Dit screenen gebeurt 'random', door gebruik te maken van zogenaamde bibliotheken van kleine chemische- en biologische stoffen, die beschikbaar zijn vanuit de farmaceutische industrie. Om leverstadium parasieten te kunnen kweken zijn resusapen nodig als parasiet donor. Bloed van geïnfecteerde donor apen wordt afgenomen en gebruikt om *ex vivo* muggen te voeden, waarna parasieten uit de mug gebruikt worden om de leverstadium kweken te starten voor de screening. **Het tweede onderdeel** is de *in vivo* evaluatie van potentieel nieuwe geneesmiddelen (al dan niet ontdekt in de *in vitro* screening; mijlpaal van onderdeel 1) in *P. cynomolgi*-geïnfecteerde resusapen. Om deze apen met sporozoieten te infecteren is een parasiet donor aap nodig uit onderdeel 1. Een mijlpaal is het vinden van een *in vivo* actieve stof, met weinig tot geen bijwerkingen. **Het derde onderdeel** is validatie/ontdekking van mogelijke drug targets en toegepaste studies aan de (moleculaire) biologie van hypnozoieten d.m.v. moleculaire analyse van parasieten (transfecties). Hierbij worden ook merker parasieten gemaakt, die d.m.v. de merker te detecteren zijn in bepaalde stadia van ontwikkeling, *in vitro*

en/of *in vivo*. Dit kan helpen om de drug assay specifiek te maken, bijvoorbeeld als de merker uitsluitend zichtbaar is in hypnozoieten of in hypnozoieten die op het punt staan wakker te worden; in de drug assay kan dan gezocht worden naar middelen die specifiek de gemerkte populatie doden. Ook kunnen merker parasieten gebruikt worden om ze zichtbaar te maken in de lever van geïnfecteerde apen, om voor het eerst sinds de ontdekking van hypnozoieten de ontwikkeling *in vivo* te volgen in de tijd middels PET-CT studies (mijlpaal). Dit zal waarschijnlijk vooral gaan om groepjes hypnozoieten die gevolgd kunnen worden, zoals eerder beschreven voor T-cellen (11). Tevens kunnen leverstadia vanuit de lever opgezuiverd worden op verschillende tijdstippen in de ontwikkeling voor moleculairbiologische analyses, die in belangrijke mate bijdragen aan de ontdekking en validatie van nieuwe drug targets. Voor PET-CT studies en isolatie van *in vivo* gegroeide leverstadium parasieten is een parasiet donoraap nodig voor de productie van *P. cynomolgi* sporozoieten (steeds dezelfde stam om biologische variatie uit te sluiten), die gebruikt worden om resusapen te infecteren voor PET studies.

Voor transfecties om merker parasieten te maken (o.a. voor PET studies) of drug targets te valideren (bijvoorbeeld door knock-out studies) zijn parasiet donor resusapen nodig om voldoende bloedstadium parasieten te verkrijgen; verder zijn ontvanger resusapen nodig, die geïnfecteerd worden met getransfecteerde parasieten om vervolgens muggen te voeden op het geïnfecteerde bloed, als hierboven beschreven. Nieuwe transfectie technologieën en transfectie constructen kunnen eerst getest worden met geheel *in vitro* gekweekte bloedstadium parasieten en optimale procedures worden dan toegepast in een *in vivo* transfectie, waarmee sporozoieten geproduceerd kunnen worden voor verder leverstadium onderzoek.

Zoals hierboven gezegd, zullen de onderdelen gedurende de 5 jaar parallel uitgevoerd worden. Het screenen van grote hoeveelheden verschillende chemische en biologische stoffen gaat continu door. Hieruit zullen 'hits' komen die in de 5 jaar in verschillende stadia van ontwikkeling zullen verkeren en dus ook op verschillende tijden in aanmerking kunnen komen voor *in vivo* evaluatie. De *in vitro* assay zal steeds verder geoptimaliseerd worden door gebruik van nieuw gemaakte specifieke merker parasieten, voortkomend uit verschillende moleculaire analyses van *in vitro* en *in vivo* hypnozoieten en geïnfecteerde levercellen (-omics studies). Nieuwe potentiële drug targets (ontdekt vanuit de geneesmiddelen screening of vanuit de moleculaire analyse van *in vitro* en *in vivo* hypnozoieten en gastheercellen) die in de 5 jaar worden gevonden zullen met transfectie studies gevalideerd worden.

3.4.2 Onderbouw de gekozen strategie.

De gekozen strategie is dezelfde als gebruikt in onze huidige CCD vergunning (AVD5020020172664) en geeft een route om zo snel mogelijk nieuwe geneesmiddelen te ontdekken en valideren die werkzaam zijn tegen malaria hypnozoieten. Deze strategie is tot nu toe, vanuit bepaalde oogpunten, zeer succesvol gebleken; We hebben de *in vitro* leverstadium drugassay verder kunnen optimaliseren door gebruik te maken van nieuwe merker parasieten (die we zelf hebben gemaakt) en we zijn bezig met het automatiseren van het proces. In een automatisch proces kunnen sneller veel meer chemische stoffen *in vitro* worden getest op werkzaamheid, waarmee we nieuwe actieve middelen hopen te ontdekken, die we tot nu toe nog niet hebben ontdekt. Met nieuwe merker parasieten hebben we voor het eerst aangetoond dat *in vitro* hypnozoieten kunnen reactiveren en dat dat maar in heel weinig gevallen gebeurt. Deze kennis levert de basis om een "wake and kill" assay te ontwikkelen, dwz een assay waarin we op zoek zijn naar drugs die parasieten tot 'ontwaken' dwingen, waarna ze kunnen worden gedood met reeds bestaande middelen. Dit is potentieel een andere manier om hypnozoieten kwijt te raken. Verder hebben we met behulp van merker parasieten single cell slapende en ontwikkelende leverparasieten weten te isoleren en genetisch materiaal weten te analyseren. Dit heeft specifieke merkers voor hypnozoieten opgeleverd (12), die we, na verder onderzoek, mogelijk kunnen gebruiken voor geneesmiddelenonderzoek. We hebben nog geen nieuwe actieve potentiële geneesmiddelen ontdekt, dus het *in vivo* effectiviteitsmodel is tot nu toe niet gebruikt. We willen graag doorgaan met de strategie om aan de ene kant willekeurig chemische stoffen te screenen op activiteit in een *in vitro* assay en aan de andere kant zoveel mogelijk van de biologie van hypnozoieten te begrijpen om van daaruit te komen tot processen die essentieel zijn voor het overleven van hypnozoieten. Tegen dat soort essentiële processen kunnen dan specifieke geneesmiddelen ontwikkeld worden. Wij kweken en bestuderen hypnozoieten *in vitro* in een tweedimensionale kweek, terwijl we ook onderzoek doen naar driedimensionale kweken. Echter, *in vitro* kweek is heel anders dan de complexiteit van een parasiet in een lever *in vivo*. Daarom willen we ook de parasiet *in vivo* bestuderen om een juist beeld te krijgen van de complexe biologie van de parasiet en de parasiet-gastheer interactie, waarvan op dit moment nog vrijwel niets bekend is. Omdat de experimenten veelal parallel lopen, kunnen we optimaal

gebruik maken van parasiet donorapen. Bijvoorbeeld, als wij sporozoieten produceren voor *in vitro* drug screening, kan een deel van die sporozoieten ook gebruikt worden om resusapen te infecteren, wanneer een *in vivo* effectiviteit studie van een nieuw geneesmiddel gepland is. Ook bij *in vivo* transfectie studies isoleren we zoveel bloedstadium parasieten uit 1 parasiet donoraap, om 3 afzonderlijke transfecties tegelijk te kunnen uitvoeren en dus met parasieten van 1 donoraap 3 transgene parasietlijnen kunnen maken. Tot slot wordt in dit project veel aandacht besteedt aan alternatieven, bijvoorbeeld door veelvuldig gebruik te maken van *in vitro* gekweekte leverstadium parasieten voor drug screening, parasietzuiveringen en moleculaire analyses; ook is er aandacht voor verfijning van studies, bijvoorbeeld door eindpunten in drug effectiviteitstudies te vervroegen door een andere manier van het uitlezen van effecten van geneesmiddelen te ontwikkelen (PET-CT).

3.4.3 Benoem de type dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Titel bijlage Beschrijving dierproef
1	Malaria infectie van resusapen
2	<i>In vivo</i> antimalaria drug studie in resusapen
3	<i>In vivo</i> karakterisering van malariaparasieten in resusapen met behulp van PET-CT
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Referenties

1. WHO, The Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, January 2016
2. Herrera et al., Int J Parasitol. 2002;32(13):1625
3. Thomas et al., Acta Trop. 2016;160:35
4. Mikolajczak et al., Cell Host Microbe. 2015; 17:536
5. Schmidt, Am. J. Trop. Med. Hyg. 1983; 32:231
6. Voorberg-van der Wel et al., Anal. Chem. 2020; 92:6667
7. Voorberg-van der Wel et al., Commun Biol 2020; 3:7
8. Bertschi et al., Elife 2018; 7:e41081
9. Gupta et al., Elife 2019; 8:e43362
10. Chua et al., Nat Commun. 2019;10:3635
11. Moroz et al. J Nucl Med. 2015;56(7):1055
12. Toenhake et al., Nat Microbiol. *Under final review*