

CharitéCentrum 17 für Frauen-, Kinder- & Jugendmedizin mit Perinatalzentrum & Humangenetik

Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie, Immunologie und Intensivmedizin

Direktor: Professor Dr. med. Marcus Mall

## **Habilitationsschrift**

### **Malaria im Kindesalter: Beiträge zu Prävention und Behandlung**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

Von

**Dr. med. Sabine Miriam Bélard PhD MSc DTMH**

**Eingereicht: März 2021**

**Dekan: Prof. Dr. Axel Radlach Pries**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Philipp Henneke, Freiburg**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen May, Hamburg**

# INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung.....	4
1.1 Parasitologie und Pathophysiologie der Malaria .....	4
1.2 Klinisches Bild der Malaria.....	5
1.2.1 Unkomplizierte Malaria .....	6
1.2.2 Schwere Malaria .....	6
1.2.3 Besonderheiten der Malaria bei Kindern .....	6
1.3 Epidemiologie der Malaria .....	8
1.4 Diagnostik der Malaria .....	9
1.5 Therapie der Malaria .....	9
1.5.1 Therapie der unkomplizierten Malaria.....	10
1.5.2 Therapie der schweren Malaria.....	10
1.6 Strategien zur Eindämmung der Malaria .....	11
1.7 Fragestellungen .....	12
2 Eigene Arbeiten .....	13
2.1 Malariaimpfstoffentwicklung .....	13
2.1.1 Klinische Prüfung des Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 bei Kindern in Gabun.....	13
2.1.2 Einfluss helminthologischer Infektionen auf die Immunantwort des Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 bei Kindern in Gabun .....	22
2.2 Artemisinin-basierte Therapie der Malaria bei Kindern.....	27
2.2.1 Klinische Prüfung einer pädiatrischen Darreichungsform von Artesunat/Pyronaridin bei Kindern mit unkomplizierter Falciparum-Malaria in Gabun.....	27
2.2.2 Artemisinin-basierte Kombinationstherapie bei Non-Falciparum Malaria und Malaria-mischinfektionen in Gabun .....	37
2.2.3 Cochrane Review und Metaanalyse pädiatrischer Darreichungsformen Artemisinin- basierter Kombinationstherapien bei Kindern mit Malaria .....	44
2.2.4 Intravenöse Artesunattherapie bei Kindern mit importierter schwerer Malaria.....	83
3 Diskussion .....	90
3.1 Artemisinin-basierte Kombinationstherapie bei Kindern mit Malaria in Afrika .....	90
3.2 Artemisinin-basierte Therapie der importierten Malaria bei Kindern .....	94
3.3 Prävention der Malaria im Kindesalter durch Impfung.....	97
4 Zusammenfassung.....	99
5 Literaturangaben .....	101
6 Danksagung .....	108
7 Erklärung.....	109



## Abkürzungsverzeichnis

ACT	Artemisinin combination therapy
AUC	Area under the curve
CHMI	Controlled human malaria infection
DGPI	Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie e.V.
DTG	Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit e.V.
EMA	European Medicines Agency
GLURP	Glutamate rich protein
HRP-2	Histidin-rich protein 2
ITN	Insecticide treated nets
ITPi	Intermittent preventive treatment during infancy
ITPp	Intermittent preventive treatment during pregnancy
MSP3	Merozoite surface protein 3
NGS	Next generation sequencing
oi-E	Once infected erythrocytes
PADH	Post-artemisinin delayed hemolysis
RCT	Randomized controlled trial
RKI	Robert Koch Institut
SMC	Seasonal malaria chemoprophylaxis
VFR	Visiting friends and relatives
WHO	World Health Organisation

# 1 Einleitung

Malaria ist die bedeutendste parasitäre Infektionskrankheit weltweit. Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization (WHO)) schätzte für das Jahr 2018 229 Millionen Krankheitsfälle und 409.000 Todesfälle durch Malaria (1). Malaria-bedingte Morbidität und Mortalität betrifft vor allem junge Kinder; 2018 waren zwei Drittel aller an Malaria gestorbenen Kinder im Alter unter 5 Jahren (1).

## 1.1 Parasitologie und Pathophysiologie der Malaria

Malaria wird durch den infektiösen Stich der weiblichen Anopheles-Mücke übertragen und durch Protozoen des Genus *Plasmodium* verursacht. Verschiedene Plasmodienspezies mit unterschiedlicher Pathogenität und geographischer Verteilung verursachen beim Menschen Malaria. Die meisten Malariafälle in Afrika werden durch *P. falciparum* verursacht; *P. falciparum* ist auch für fast alle Malaria-Todesfälle weltweit verantwortlich und ein häufiger Erreger der importierten Malaria in Deutschland (1, 2). Malaria durch *P. vivax* tritt vor allem in Südostasien und Südamerika auf (1); die Vivax-Malaria verläuft meist gutartig, kann aber auch zu schweren Krankheitsverläufen und Tod führen. Malaria durch Infektion mit *P. ovale* (*P. ovale wallikeri* oder *P. ovale curtisi*) oder *P. malariae* ist weltweit deutlich weniger prävalent und verläuft meist komplikationslos. *P. knowlesi*, der Erreger der Makaken-Malaria, kann beim Menschen eine schwere Malaria verursachen ist aber nur in begrenzten Gebieten in Südostasien endemisch.

Während einer Blutmahlzeit der infizierten Mücke werden aus deren Speicheldrüsen Sporoziten in die menschliche Haut inokuliert. Die Sporoziten gelangen dann über die Blutbahn zur Leber, wo die exo-erythrozytäre Schizogonie stattfindet. Hierbei entstehen in den Hepatozyten durch asexuelle Vermehrung Gewebeschizonten. In Abhängigkeit der Plasmodienspezies gelangen nach 5 – 15 Tagen durch Ruptur des infizierten Hepatozyten bis zu 30.000 Merozoiten in den Blutstrom und infizieren dort Erythrozyten. Da die klinischen Manifestationen der Malaria durch die zyklische Infektion der Erythrozyten mit asexuellen Parasitenformen hervorgerufen wird, lässt sich aus der Dauer der exo-erythrozytären Schizogonie die Spezies-abhängige Inkubationszeit ableiten. Bei der Malaria tertiana (*P. vivax* und *P. ovale* spp.) können Hypnozoiten in den Hepatozyten in einer Latenz verbleiben und ohne Therapie Wochen oder sogar Jahre später zu Malariarückfällen führen.

Nach der Freisetzung der Merozoiten in die Blutbahn beginnt die erythrozytäre Schizogonie, die zweite asexuelle Vermehrungsphase. Merozoiten infizieren Erythrozyten und entwickeln sich zunächst zu Trophozoiten welche dann zu Schizonten reifen. Mit Ruptur der Erythrozyten werden je nach Plasmodienspezies 6 – 30 Merozoiten in den Blutstrom freigesetzt und infizieren wieder neue Erythrozyten. Die Dauer dieses sich wiederholenden asexuellen Vermehrungszyklus ist abhängig von der Plasmodienspezies und dauert bei *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale* ca. 48 Stunden, bei *P. malariae* ca. 72 Stunden und bei *P. knowlesi* ca. 24 Stunden. Klinische Symptome treten auf wenn die Parasitämie einen Schwellenwert überschreitet, welcher in Abhängigkeit von vorausgegangenen Malariainfektionen und Semi-Immunität bei ungefähr 10 – 50 Parasiten pro Mikroliter Blut oder darüber liegt. Die

allgemeinen unspezifischen systemischen Symptome der Malariaerkrankung entstehen im Rahmen der Ruptur der parasitierten Erythrozyten infolge der Freisetzung von Zytokinen sowie parasitären und erythrozytären Bestandteilen. Das zyklische Rupturieren der Erythrozyten mit entsprechender Mediatorenfreisetzung ist das pathophysiologische Korrelat des für die Malaria typischen Wechselfiebers.

Die Infektion der Erythrozyten durch Malariaparasiten führt zu vielfältigen Veränderungen der Erythrozyten, welche vor allem bei der Pathogenese der schweren Malaria zum Tragen kommen (3). Mit *P. falciparum* infizierte Erythrozyten exprimieren Oberflächenmoleküle welche zur Adhäsion der infizierten Erythrozyten an das Endothel kleinster Gefäße führen; *P. falciparum* entzieht sich somit durch Sequestrierung seiner Beseitigung durch die Milz (4). Durch Adhäsion von infizierten und nicht-infizierten Erythrozyten kommt es zu Rosettenbildung, ein parasitärer Adhäsionsphänotyp der mit vaskulärer Obstruktion und lebensbedrohlicher Malaria assoziiert ist (5). Da *P. falciparum*, im Gegensatz zu den anderen Plasmodienspezies, aufgrund des breiten Spektrums an Rezeptormöglichkeiten Erythrozyten jeden Alters befallen kann ist die Parasitämie bei Falciparum-Malaria nicht begrenzt und eine Hyperparasitämie ein Kriterium der schweren Malaria.

Parallel zur asexuellen Vermehrung entstehen aus wenigen Merozoiten Mikro- und Makrogametozyten, welche die weiblichen und männlichen Geschlechtsformen der Plasmodien darstellen. Werden diese bei einer Blutmahlzeit von der Anopheles-Mücke aufgenommen, kommt es in deren Darm zur Befruchtung. An die Befruchtung schließt sich die Sporogonie an; aus der initialen Zygote entstehen motile Ookineten welche sich in der Wand des Mitteldarms zu Oozysten entwickeln. Durch Ruptur der Oozyste werden die Sporoziten freigesetzt, welche schließlich zu den Speicheldrüsen der Mücke wandern um bei der folgenden Blutmahlzeit auf einen neuen menschlichen Wirt übertragen zu werden.

## 1.2 Klinisches Bild der Malaria

Malaria ist in der Regel eine akute febrile Erkrankung deren Schweregrad und Verlauf sowohl von Plasmodienspezies und Erregerstamm als auch von Wirtsfaktoren wie Alter, Immunität, Genetik oder Schwangerschaft sowie Chemoprophylaxe und Therapie beeinflusst werden.

Die Malaria tropica durch *P. falciparum* ist aufgrund des höheren Risikos für einen lebensbedrohlichen Verlauf die gefährlichste Malaria. Bei der Malaria tertiana durch *P. vivax* kann das Krankheitsgefühl ausgeprägt sein, die Sterblichkeit ist jedoch gering. Die Malaria tertiana durch *P. ovale spp.* ähnelt der Malaria tertiana durch *P. vivax*, spontane Remissionen sind jedoch häufiger und Rückfälle seltener. Malaria quartana durch *P. malariae* führt meist nur zu niedrigen Parasitämien und komplikationslosen Verläufen.

Wiederholte Malariainfektionen führen zum Aufbau einer transienten Immunität. Je nach Endemizität bzw. Häufigkeit von Malariainfektionen unterscheidet sich daher altersbezogen das vorwiegende klinische Bild in der Population. In Hochendemiegebieten erkranken vor allem junge Kinder an schwerer Malaria da sie noch keine schützende Immunität aufgebaut haben. Mit zunehmendem Alter und zunehmender Anzahl überlebter Malariainfektionen kommt es zu zunehmend mildereren Verläufen bis hin zu asymptomatischen Parasitämien. In

Gebieten mit niedriger Endemizität oder saisonaler Malaria treten schwere Verläufe in allen Altersklassen auf.

### **1.2.1 Unkomplizierte Malaria**

Das klassische klinische Zeichen der Malaria ist der mit dem Fieberschub plötzlich einsetzende Schüttelfrost. Dem Fieber können unspezifische Prodromi wie Müdigkeit, Unwohlsein, Kopf- und Gliederschmerzen Tage vorausgehen. Nach dem Fieberanstieg mit Schüttelfrost und starkem Kältegefühl des Patienten persistiert das Fieber in der Regel für mehrere Stunden bei hoher Temperatur; Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden und delirante Bewusstseinszustände sind hierbei häufig. Bei der anschließenden Entfieberung kommt es mit starkem Schwitzen und Rückgang der Begleitbeschwerden zum Ende des typischen Malariaschubs. Die Spezies-abhängige Periodizität des klassischen Wechselfiebers tritt nur bei synchronisiertem Plasmodienzyklus auf. Bei der Falciparum-Malaria tritt eine Periodizität des Fiebers selten auf, häufiger kommt es zu hohen unregelmäßigen täglichen Fieberspitzen bei kontinuierlichem Fieber.

### **1.2.2 Schwere Malaria**

Fast alle schweren Malariaverläufe und Malariatodesfälle sind auf Malaria durch *P. falciparum* zurückzuführen (1). Eine *P. vivax* Infektion kann selten auch zu schweren und tödlichen Malariaverläufe führen, die biologischen Grundlagen hierfür sind jedoch noch nicht vollständig verstanden (6). Bei der begrenzt endemischen *P. knowlesi* Malaria ist das Risiko für einen schweren und lebensbedrohlichen Verlauf im Vergleich zur *P. falciparum* Malaria sogar erhöht (7).

Bei nicht immunen Personen mit *P. falciparum* oder *P. knowlesi* Infektion kann sich ohne rechtzeitige Therapieeinleitung rasch ein schwerer und lebensbedrohlicher Krankheitsverlauf entwickeln. Grundlegend besteht eine schwere Malaria bei Vorliegen von Funktionseinschränkungen lebenswichtiger Organe und/oder hoher Parasitämie. Eine schwere Falciparum-Malaria nach WHO Definition (8) liegt vor wenn mindestens ein Kriterium (der in der Leitlinie genau definierten) Krankheitszustände folgender Organsysteme vorliegt: Bewusstseinsstrübung, Erschöpfung, zerebrale Krampfanfälle, Azidose, Hypoglykämie, schwere Malaria-assoziierte Anämie, Nierenversagen, Ikterus, Lungenödem, Spontanblutungen, Schock und Hyperparasitämie. Für die schwere Vivax-Malaria gelten die gleichen Kriterien wie für die schwere Falciparum-Malaria, nur das Kriterium der Parasitämie entfällt hier. Für die schwere Knowlesi-Malaria gelten ebenfalls die gleichen Kriterien wie für die schwere Falciparum-Malaria, jedoch mit Abweichungen bei den Kriterien Parasitämie und Ikterus.

### **1.2.3 Besonderheiten der Malaria bei Kindern**

Junge Kinder sind besonders gefährdet schwere und tödliche Malariaverläufe zu erleiden; sie haben noch keine schützende Immunität. Die meisten Berichte und Studien zu Malaria bei Kindern unterscheiden die Altersgruppen  $\geq 5$  Jahre und  $< 5$  Jahre, wobei sich Prävalenz und

Klinik der Malaria innerhalb der Gruppe der unter 5-Jährigen nochmals altersabhängig unterscheidet. Klinische kongenitale und neonatale Malaria sind in Endemiegebieten prävalenter als lange Zeit angenommen; in Afrika liegt die Prävalenz klinischer kongenitaler Malaria (Alter 0 – 7 Tage, plazentare Übertragung prä- oder intrapartal) bei 3 – 4% und die Prävalenz klinischer neonataler Malaria (Alter 0-28 Tage, plazentare Übertragung prä- oder intrapartal oder Infektion durch Stich einer infizierten Mücke) bei 1% (9). Für die relativ geringe Malariaprävalenz in der Neonatalperiode werden verschiedene Faktoren diskutiert, unter anderem der hohe Anteil fetalen Hämoglobins (ungünstige intraerythrozytäre Wachstumsbedingungen für *P. falciparum*) und die passive Immunität (in utero Transfer mütterlicher Antikörper) (9). Mit Abnahme des fetalen Hämoglobins und mütterlicher Antikörper vor allem vom 3. bis 6. Lebensmonat, steigt in diesem Alter die Malariaprävalenz entsprechend an (9). Ab dem 6. Lebensmonat besteht daher auch eine hohe Vulnerabilität für Malaria und die Malariamortalität ist in den ersten zwei Lebensjahren am höchsten. In Hochendemiegebieten erwerben Kinder bis zum Schulalter dann durch wiederholte Malariaerkrankungen eine (Teil-) Immunität, welche vor hochakuten und schweren Verläufen schützt. In Afrika korrelieren Anzahl an Malariainfektionen und Erwerb der Immunität mit dem Vorliegen asymptomatischer *Falciparum*-Malaria (10).

Symptome der Malaria bei jungen Kindern, wie Fieber, schlechte Nahrungsaufnahme, Atembeschwerden oder Durchfall, gleichen Symptomen anderer systemischer Infektionen (10, 11). Die unspezifische Klinik erschwert die Diagnosefindung insbesondere wenn keine parasitologische Diagnostik zur Verfügung steht oder Parasitämien ohne Krankheitsrelevanz vorliegen. Schwere Malaria bei Kindern präsentiert sich meist als zerebrale Malaria oder schwere Malaria-bedingte Anämie (Hämoglobin  $\leq$  5g/dl) (10). Die Mortalität der zerebralen Malaria bei Kindern liegt Therapie-abhängig bei 15 – 30% (12) und viele der Überlebenden behalten bleibende neurologische Schäden zurück (13). In Endemiegebieten mit hoher Malariatransmission adaptieren Kinder unter anderem im Rahmen wiederholter Malariainfektionen an niedrige Hämoglobinkonzentrationen. Bei febrilen Erkrankungen oder neuen Malariainfektionen können dann auch niedrige Parasitämien zu lebensbedrohlicher Anämie führen. Die Mortalität, die auf schwere Malaria-bedingte Anämie zurückzuführen ist, liegt bei 5 – 15% (13).

Die Therapie pädiatrischer Patienten ist durch die Notwendigkeit alters- oder gewichtsbezogener Dosierungen eine Herausforderung: indizierte Dosierungen müssen bestimmt werden und Präparate müssen in den bestimmten Dosierung zur Verfügung stehen oder durch den Anwender abgemessen werden. Ohne kindgerechte Darreichungsformen wird eine adäquate orale Therapie kleiner Kinder weiter erschwert. Das Teilen und/oder Zermörsern von Standardtabletten führt zu ungenauer Dosierung und zur Verstärkung des bitteren Geschmacks, welcher bei vielen Malariamedikamenten besonders intensiv ist und gerade bei kleinen Kinder die Verabreichung und Einnahme erschwert (14, 15). Daraus resultierende Therapieverzögerung oder unzureichende Dosierung oraler Malariatherapie erhöhen das Risiko eines Progresses zu schwerer Malaria bei jungen Kindern.

### 1.3 Epidemiologie der Malaria

Die Malaria ist weltweit in den tropischen und subtropischen Regionen Amerikas, Asiens und vor allem Afrikas endemisch (1). Die Endemizität kann nach Prävalenz von Splenomegalie und Parasitämie bei Kindern in hypoendemisch (wenig Transmission und geringer Effekt auf die Population), mesoendemisch (Transmissionsrisiko mit großer geographischer Breite), hyperendemisch (starke aber saisonale Transmission, mangelhafte Immunität in allen Altersklassen) und holoendemisch (ganzjährige Transmission, bedeutender Grad an Immunität jenseits des frühen Kindesalters) klassifiziert werden (13). Ein weiteres Maß zur Bestimmung der Malariatransmission ist die entomologische Inokulationsrate (EIR), definiert als Anzahl infektiöser Stiche pro Person in einer bestimmten Zeitspanne (16).

Im neuesten WHO Malaria Report (2020) wird die Zahl der weltweiten Malariafälle im Jahr 2019 auf 229 Millionen geschätzt (1). Der größte Anteil der Malariamorbidity liegt mit 215 Millionen (94%) Fällen in Afrika, allein Nigeria und die Demokratische Republik Kongo verzeichneten 2019 über ein Drittel der globalen Malariafälle (1). Die globale Malaria-Inzidenzrate ging zwar seit 2010 zurück, der Rückgang verlangsamte sich jedoch über die letzten Jahre, so dass zwischen 2014 und 2019 kaum noch ein Rückgang zu verzeichnen war (1). Für die Malariasterblichkeit war zwischen 2010 und 2019 global ein Rückgang um fast ein Drittel zu verzeichnen, der Rückgang verlangsamte sich jedoch auch über die letzten Jahre (1). Auch wenn der größte absolute Rückgang der Malariasterblichkeit in Afrika erreicht wurde, bleibt die Malariasterblichkeit in Afrika am Höchsten; 93% der Todesfälle treten in Afrika auf und 67% der Todesfälle betreffen Kinder unter 5 Jahren (1).

In Europa wurden im Jahr 2018 über das *The European Surveillance System* (TESSy) 8349 Malariafälle gemeldet (17). Fast alle gemeldeten Fälle waren importierte Malariainfektionen; 14 Fälle wurden jedoch als nicht Reise-abhängig sondern autochthon in Mittelmeerländern erworben gemeldet. Für Deutschland wurden mit 896 Fällen (1.1/100.000), nach Frankreich und Großbritannien, die drittmeisten Fälle gemeldet. 84% aller importierter Fälle waren durch *P. falciparum* verursacht und die Sterblichkeitsrate der importierten Falciparum-Malaria bei Fällen mit bekanntem Krankheitsausgang betrug 1%.

In Deutschland besteht für Malaria eine nicht-namentliche Meldepflicht an das Robert Koch Institut (RKI). Die Anzahl der dem RKI gemeldeten Malariafälle hatte sich über die letzten 20 Jahre zunächst deutlich reduziert, seit 2014 ist jedoch wieder ein merklicher Anstieg zu verzeichnen (2). In den letzten Jahren wurden dem RKI jährlich 900 – 1.000 importierte Malariafälle gemeldet (2). Die importierte Malaria war 2018 zu 81% durch *P. falciparum* verursacht; gemeldet wurden jedoch auch Malariainfektionen durch alle anderen Plasmodienspezies sowie Malariamischinfektionen (2). Die meisten (95%) importierten Malariainfektionen wurden in Afrika von Reisenden mit Migrationshintergrund, welche in ihre Heimatländer reisen um Freunde und Familie zu besuchen (visiting friends and relatives, VFR), erworben (2). Importierte Malariafälle wurde für alle Altersklassen, inklusive junge Kinder, gemeldet; drei Falciparum-Infektionen verliefen tödlich (2).

## 1.4 Diagnostik der Malaria

Eine schnelle und akkurate Diagnose der Malaria ist ein wichtiger Teil des effektiven Patientenmanagements und alle Patienten mit Verdacht auf Malaria sollten auf Grundlage einer durch Mikroskopie oder Schnelltest bestätigten Diagnose behandelt werden (8).

Der mikroskopische Nachweis von Plasmodien im Blutaustriech und im „Dicken Tropfen“ stellt den diagnostischen Goldstandard dar. Während der „Dicke Tropfen“ eine Konzentrationsmethode darstellt und somit niedrige Parasitämien besser detektieren kann, kann mittels Ausstrich die Plasmodienspezies und Parasitämie bestimmt werden. Sensitivität und Spezifität der Mikroskopie liegen bei 95% und 98% im Vergleich zur PCR und die Nachweisgrenze der Mikroskopie liegt bei ungefähr 50 Parasiten/ $\mu$ l Blut (18).

Malariaschnelltests basieren auf Antigennachweis mittels Immunchromatographie. Die meisten verfügbaren Schnelltest basieren auf Nachweis des *P. falciparum*-spezifischen histidin-reich protein 2 (HRP-2); nicht Spezies-spezifische Malariaschnelltests mit Nachweis von Plasmodium lactate dehydrogenase (pLDH) oder Plasmodium aldolase sind jedoch auch verfügbar. Die Sensitivität der Schnelltests liegt zwischen 85% und 95%, die Spezifität zwischen 95% und 99% (19). Schnelltests stellen eine rasche und einfach zu handhabende Diagnostik dar, können die Parasitämie jedoch nicht bestimmen und sind für das Therapiemonitoring ungeeignet.

PCR-basierte Nachweismethoden kommen bisher in der Patientenversorgung nur in Ausnahmefällen zur Anwendung, z.B. zum Nachweis submikroskopischer Parasitämien bei negativer Mikroskopie und Schnelltest. Der Einsatz kommerzieller PCR-Kits wird möglicherweise in Zukunft an Bedeutung gewinnen (20). Im Vergleich zur Mikroskopie liegt die Sensitivität der PCR zwischen 98% – 100% und die Spezifität zwischen 88% – 94% (21).

Die Serologie spielt in der Malariadiagnostik keine Rolle.

## 1.5 Therapie der Malaria

Die Behandlungsempfehlungen der WHO werden von vier Kernprinzipien geleitet: i) frühzeitige Diagnosestellung und rasche effektive Therapie um schweren und fatalen Verläufen vorzubeugen, ii) Einsatz von Antimalariamedikamenten nur bei bestätigter Malaria um Resistenzentwicklung zu verringern, iii) Verabreichung von Malariamedikation nur als Kombinationstherapie zweier Medikamente mit unterschiedlichem Wirkmechanismus ebenfalls um Resistenzentwicklung zu minimieren und iv) gewichtsadaptierte Dosierungsoptimierung für eine schnellstmögliche klinische und parasitologische Heilung (8). Die Behandlung der Malaria richtet sich primär nach der Erregerart und nach der Schwere der Erkrankung. Auch wenn die Empfehlungen der WHO (8) weltweit Gültigkeit haben, gibt es zusätzlich nationale Leitlinien oder Behandlungsempfehlungen einschlägiger Fachgesellschaften; für Deutschland sind hier die Leitlinie Malaria der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit e.V. (DTG) (22) und die Handlungsempfehlung Malaria der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie e.V. (DGPI) (23) zu nennen.

Artemisinin-basierte Therapien sind heute weltweiter Standard in der Behandlung aller Malariaformen (8) und haben erfolgreich die weitgehend unwirksam gewordenen alten Malariamedikamente wie Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin ersetzt. Artemisinin wurde 1971 aus dem Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) isoliert, eine Pflanze die in der traditionellen chinesischen Medizin Anwendung fand. Aufgrund der hohen Wirksamkeit von Artemisinin und dem damit verbundenen bahnbrechenden Fortschritt in der weltweiten Eindämmung der Malaria, wurde 2015 Tu Youyou für die Entdeckung des Artemisinins mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet (24).

Aufgrund rascher Resistenzentwicklung bei Monotherapie mit den schnell aber kurzwirksamen und sehr gut verträglichen Artemisinin-Derivaten, müssen Artemisinin-basierte Präparate mit einem langwirkenden Partnermedikament kombiniert werden. Die Partnerwirkstoffe dieser Artemisinin-basierten Kombinationstherapien (artemisinin combination therapy, ACT) unterscheiden sich vorallem hinsichtlich Halbwertszeiten und Verträglichkeit und determinieren somit sowohl das Nebenwirkungsprofil des ACTs als auch die Dauer der sogenannten „post-treatment prophylaxis“, ein wichtiger zusätzlicher Benefit für Patienten in Hochendemiegebieten.

### **1.5.1 Therapie der unkomplizierten Malaria**

Die Erstlinientherapie der unkomplizierten Falciparum-Malaria bei Kinder und Erwachsenen besteht aus einer oralen ACT über 3 Tage. Aktuell werden von der WHO folgende als gleichwertig erachtete ACTs zur Therapie der unkomplizierten Falciparum-Malaria empfohlen: Artemether/Lumefantrin (AL), Artesunat/Amodiaquin (ASAQ), Artesunat/Mefloquin (ASMQ), Dihydroartemisinin/Piperaquin (DHA-PIP), Artesunat/Sulfadoxin-Pyrimethamin (ASSP) (8). Ausserdem wurde Artesunat/Pyronaridin (ASPY) 2017 als weiteres wirksames und sicheres ACT von der WHO in die Liste der Essentiellen Medikamente aufgenommen (25).

Die Behandlung einer Malariainfektion mit unklarer Plasmodienspezies oder Infektionen mit *P. vivax*, *P. ovale spp*, *P. malariae* oder *P. knowlesi* in Gegenden mit Chloroquinresistenz sollten ebenfalls mit einem oralen ACT behandelt werden; in Gegenden mit Chloroquinempfindlichkeit können Infektionen mit *P. vivax*, *P. ovale spp.*, *P. malariae* oder *P. knowlesi* mit einem ACT oder mit Chloroquin behandelt werden (8).

Um nach einer Malaria tertiana Rückfälle zu vermeiden, ist nach Bestimmung des Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase Status Primaquin per os über 14 Tage empfohlen (8).

Nach Möglichkeit sollen ACTs als „fixed dose combinations“ (Präparate welche beide Wirkstoffe in derselben Formulierung enthalten) und für junge Kinder pädiatrische Darreichungsformen verwendet werden (8).

### **1.5.2 Therapie der schweren Malaria**

Die schwere Malaria ist ein lebensbedrohlicher Notfall und bedarf umgehender intravenöser Antimalariatherapie. Intravenöses Artesunat löste die jahrelange Standardtherapie der schweren Malaria mit intravenösem Chinin ab, nachdem mehrere Studien dessen eindruckliche Überlegenheit belegten (8, 12, 26). Die Therapie mit intravenösem oder



intramuskulärem Artesunat ist für mindestens 24 Stunden empfohlen; anschließend oder ab dem Zeitpunkt wenn eine orale Therapie wieder möglich ist, ist eine 3-tägige orale Anschlussbehandlung mit einem ACT empfohlen (8). Wenn kein intravenöses Artesunat zur Verfügung steht, ist eine intramuskuläre Therapie mit Artemether dem ehemals Erstlinienmedikament Chinin vorzuziehen (8).

## 1.6 Strategien zur Eindämmung der Malaria

Nach dem Ende des Global Malaria Eradication Programme Mitte des 20. Jahrhunderts war der Kampf gegen Malaria bis zur Jahrhundertwende von Scheitern und Vernachlässigung geprägt (1). Im Gegensatz hierzu stellen die ersten zwei Dekaden im 21. Jahrhundert eine goldene Ära der Malariakontrolle dar (1). Vielzählige globale Anstrengungen und Investitionen im Kampf gegen die Malaria führten in den vergangenen 20 Jahren zu einem deutlichen Rückgang Malaria-bedingter Morbidität und Mortalität (1). Innovationen und Erfolge bei den verschiedenen Säulen der Malariakontrolle leisteten hierbei ihre Beiträge.

Bei den präventiven Maßnahmen konnte über die vergangenen Jahre eine beeindruckende Zunahme der Verwendung von Insektizid-behandelten Moskitonetzen (insecticide treated nets, ITN) verzeichnet werden (1). Auch die Einführung und Zunahme medikamentöser Präventionstrategien wie die saisonale Malariachemoprophylaxe für Kinder (seasonal malaria chemoprophylaxis, SMC) (27) und die intermittierende präventive Therapie junger Kinder (intermittent preventive treatment during infancy, IPTi) und schwangerer Frauen (intermittent preventive treatment during pregnancy, IPTp) sind heute Teil effektiver Malariabekämpfungsmaßnahmen vieler Länder (10). Mit der Zulassung des ersten Malariaimpfstoffes Mosquirix™ (RTS,S) im Jahr 2015 gelang jahrelanger intensiver Malariaimpfstoffforschung ein erster Durchbruch (28); inwieweit der relativ niedrige und zeitlich begrenzte Impfschutz zur Reduktion der Malaria beitragen kann wird sich zeigen müssen. Zahlreiche weitere Malariaimpfstoffkandidaten befinden sich in der präklinischen und klinischen Entwicklung.

Auch auf dem Gebiet des Fallmanagements konnten in den letzten Jahren wichtige Fortschritte erzielt werden. Zum einen konnte mittels Entwicklung und weitreichender Verfügbarkeit von Malariaschnelltests die schnelle Diagnosestellung auch in Gebieten mit wenig Gesundheitsinfrastruktur verbessert werden (19). Dies führte zu einer Verlagerung weg von Malariabehandlung aller Fieberfälle hin zu Malariabehandlung parasitologisch bestätigter Malaria. Mit der Entwicklung der Artemisinin-basierten Kombinationstherapie Anfang des 21. Jahrhunderts standen wieder effektive Malariamedikamente zur Verfügung nachdem die zuvor weitverbreitet eingesetzten Medikamente Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin aufgrund von Resistenzentwicklung weitreichend unwirksam geworden waren.

Trotz der verzeichneten Fortschritte steht der weitere Erfolg bei der Eindämmung der Malaria vor Herausforderungen und Bedrohungen. Das Aufkommen von Malariaparasiten welche kein HRP2 exprimieren stellen eine Gefahr dar, da Schnelltests vorwiegend auf diesem Antigen beruhen (1, 29). Die Verbreitung von *P. falciparum* Isolaten mit Mutationen im kelch13 (Pfk13) Gen, welches mit Artemisininresistenz assoziiert ist, gefährden die Bestrebungen der Malariaeindämmung und Malariaelimination (1, 30). Auch Insektizidresistenzen bedrohen

durch abnehmende Vektorenkontrolle die Eindämmung der Malaria (31). Weitere Faktoren welche Fortschritte bei der Bekämpfung der Malaria negativ beeinflussen können sind gefälschte oder minderwertige Malariamedikamente (32) oder Gesundheitsnotstände beispielsweise durch Ebola oder SARS-CoV2 oder auch politische Unruhen, welche mit dem Zusammenbruch vorhandener Gesundheitsstrukturen auch die Versorgung von Malariapatienten einschränken (33).

Das zuletzt 2015 von der Weltgesundheitsversammlung lancierte Programm *Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030* stellt die aktuellste umfangreiche Strategie zur Beschleunigung der Malariaelimination dar; Ziel ist die Malariainzidenz und Malariasterblichkeit bis 2030 um 90% gegenüber 2015 zu senken (1). Auch wenn insgesamt ein Progress bei der Eindämmung der Malaria zu verzeichnen ist, wurden die Meilensteine für 2020 nicht erreicht und werden auch die Meilensteine für 2030 bei gleichbleibender Progressdynamik nicht erreicht werden (1).

## 1.7 Fragestellungen

Folgende Fragestellungen waren für die vorliegende Arbeit relevant:

- Wie sicher, verträglich und immunogen ist der Malariaimpfstoffkandidat GMZ2 bei afrikanischen Kindern?
- Beeinflusst eine intestinale Helminthose das Impfansprechen auf den Malariaimpfstoffkandidat GMZ2 bei afrikanischen Kindern?
- Welche Dosierung von Pyronaridin/Artesunat eignet sich für die Therapie der unkomplizierten Malaria im Kindesalter und sind Tabletten- sowie Granulat-Darreichungsform von Pyronaridin/Artesunat gleichwertig?
- Verbessern pädiatrische Darreichungsformen Artemisinin-basierter Kombinationstherapien die Therapie der unkomplizierten Malaria im Kindesalter?
- Ist Artemether/Lumefantrin für die Therapie der Non-Falciparum Malaria sowie Malaria-Mischinfektionen wirksam und sicher?
- Wie effektiv und sicher ist die intravenöse Artesunattherapie bei Kindern mit importierter schwerer Malaria in Deutschland?

## 2 Eigene Arbeiten

### 2.1 Malariainpfstoffentwicklung

#### 2.1.1 Klinische Prüfung des Malariainpfstoffkandidaten GMZ2 bei Kindern in Gabun

**Bélarde S\***, Issifou S\*, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M, Fendel R, de Salazar PM, Mürbeth RE, Milligan P, Imbault N, Imoukhuede EB, Theisen M, Jepsen S, Noor RA, Okech B, Kremsner PG, Mordmüller B. A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. *PLoS One*, 2011; 6(7):e22525. doi: 10.1371/journal.pone.0022525 \*geteilte Erstautorenschaft

Ein effektiver Malariainpfstoff verspricht die Eindämmung der Malaria-bedingten Krankheitslast und Sterblichkeit deutlich voranzutreiben. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit befanden sich zahlreiche Malariainpfstoffkandidaten in der klinischen Entwicklung, ein zugelassener Malariainpfstoff war noch nicht verfügbar. Der Malariainpfstoffkandidat GMZ2 gehört zur Gruppe der Blutstadien-Impfstoffkandidaten, welche zum Ziel haben mittels Blutstadienantigenen eine Immunität analog der natürlich erworbenen Malariaimmunität zu induzieren. GMZ2 besteht aus einem Fusionsprotein konservierter Anteile der zwei Antigene *merozoite surface protein 3* (MSP3) und *glutamate rich protein* (GLURP). MSP3 und GLURP waren in vorausgegangenen Studien als potentiell protektive Immunität induzierende Antigene identifiziert worden.

In dieser Phase I randomisiert kontrollierten Studie in Gabun erhielten je 10 Kinder im Alter von 1-5 Jahren intramuskulär 3 Gaben 30µg GMZ2, 100µg GMZ2 oder einer Tollwutimpfung im Abstand von 28 Tagen. Die Nachbeobachtungzeit betrug ein Jahr. Primäre Studienziele waren die Evaluation der Sicherheit und der Impfreaktionen von GMZ2 im Vergleich zur Tollwutimpfung bei Kindern, der Zielgruppe für eine anschließende Phase II Wirksamkeitsstudie. Weiteres Studienziel war die Auswertung der humoralen Immunantwort.

Sowohl die niedrigere als auch die höhere GMZ2 Impfdosis wurde gut vertragen. Die meisten Kinder zeigten während der Impfphase leichte lokale und systemische Impfreaktionen. Die zwei beobachteten schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse standen nicht mit der Impfung in Verbindung. Der Impfstoffkandidat induzierte Antikörper und Gedächtniszellen gegen GMZ2 und seine Bestandteile MSP3 und GLURP. Die mittleren Antikörperkonzentrationen gegen GMZ2 und MSP3 waren nach 3-facher Gabe sowohl bei der 30µg als auch der 100µg GMZ2 Dosierung deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend war der Malariainpfstoffkandidat GMZ2 in jungen Malaria-exponierten Kindern immunogen, gut verträglich und sicher. Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten vorausgehende klinische Prüfungen von GMZ2 in Erwachsenen und erlaubten die Fortführung der klinischen Prüfung von GMZ2 in einer Phase II Studie.

# A Randomized Controlled Phase Ib Trial of the Malaria Vaccine Candidate GMZ2 in African Children

Sabine B elard<sup>1,2,3a</sup>, Saadou Issifou<sup>1,3</sup>, Aurore B. Hounkpatin<sup>1</sup>, Frieder Schaumburg<sup>1,2b</sup>, Ulysse Ateba Ngoa<sup>1</sup>, Meral Esen<sup>1,2</sup>, Rolf Fendel<sup>1,2</sup>, Pablo Martinez de Salazar<sup>1</sup>, Raymund E. M urbeth<sup>1</sup>, Paul Milligan<sup>3</sup>, Nathalie Imbault<sup>4,5c</sup>, Egeruan Babatunde Imoukhuede<sup>4,5c</sup>, Michael Theisen<sup>5</sup>, S oren Jepsen<sup>6</sup>, Ramadhani A. Noor<sup>7</sup>, Brenda Okech<sup>7</sup>, Peter G. Kremsner<sup>1,2</sup>, Benjamin Mordm uller<sup>1,2\*</sup>

**1** Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambar en , Gabon, **2** Institute of Tropical Medicine, University of T bingen, T bingen, Germany, **3** Faculty of Epidemiology and Population Health, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom, **4** European Malaria Vaccine Initiative, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark, **5** Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Statens Serum Institut and Centre for Medical Parasitology at the Department of International Health, Immunology and Microbiology, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark, **6** Statens Serum Institut, Copenhagen Denmark, **7** African Malaria Network Trust, Dar es Salaam, Tanzania

## Abstract

**Background:** GMZ2 is a fusion protein of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 3 (MSP3) and glutamate rich protein (GLURP) that mediates an immune response against the blood stage of the parasite. Two previous phase I clinical trials, one in na ve European adults and one in malaria-exposed Gabonese adults showed that GMZ2 was well tolerated and immunogenic. Here, we present data on safety and immunogenicity of GMZ2 in one to five year old Gabonese children, a target population for future malaria vaccine efficacy trials.

**Methodology/Principal Findings:** Thirty children one to five years of age were randomized to receive three doses of either 30  g or 100  g of GMZ2, or rabies vaccine. GMZ2, adjuvanted in aluminum hydroxide, was administered on Days 0, 28 and 56. All participants received a full course of their respective vaccination and were followed up for one year. Both 30  g and 100  g GMZ2 vaccine doses were well tolerated and induced antibodies and memory B-cells against GMZ2 as well as its antigenic constituents MSP3 and GLURP. After three doses of vaccine, the geometric mean concentration of antibodies to GMZ2 was 19-fold (95%CI: 11,34) higher in the 30  g GMZ2 group than in the rabies vaccine controls, and 16-fold (7,36) higher in the 100  g GMZ2 group than the rabies group. Geometric mean concentration of antibodies to MSP3 was 2.7-fold (1.6,4.6) higher in the 30  g group than in the rabies group and 3.8-fold (1.5,9.6) higher in the 100  g group. Memory B-cells against GMZ2 developed in both GMZ2 vaccinated groups.

**Conclusions/Significance:** Both 30  g as well as 100  g intramuscular GMZ2 are immunogenic, well tolerated, and safe in young, malaria-exposed Gabonese children. This result confirms previous findings in na ve and malaria-exposed adults and supports further clinical development of GMZ2.

**Trial Registration:** ClinicalTrials.gov NCT00703066

**Citation:** B elard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, et al. (2011) A Randomized Controlled Phase Ib Trial of the Malaria Vaccine Candidate GMZ2 in African Children. PLoS ONE 6(7): e22525. doi:10.1371/journal.pone.0022525

**Editor:** James G. Beeson, Burnet Institute, Australia

**Received:** March 18, 2011; **Accepted:** June 23, 2011; **Published:** July 28, 2011

**Copyright:**   2011 B elard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The study was funded by the European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP, grant IP.2007.31100.001) and the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, grant 01KA0804). The funders URLs are: <http://www.edctp.org/> and <http://www.bmbf.de/>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: benjamin.mordmueller@uni-tuebingen.de

  These authors contributed equally to this work.

<sup>a</sup> Current address: Center for Pediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Center Freiburg, Freiburg, Germany

<sup>b</sup> Current address: Institute of Medical Microbiology, University Hospital M nster, M nster, Germany

<sup>c</sup> Current address: European Vaccine Initiative, Universit tsKlinikum Heidelberg, Heidelberg, Germany

## Introduction

Malaria control relies primarily on case management and the use of impregnated bednets. Recently, a decline in the incidence of malaria associated with scaling up of interventions has been reported in many countries [1], raising hopes that malaria could be eliminated in these countries [2]. However, before these goals can be achieved, significant political, economic as well as scientific

hurdles need to be addressed. Malaria vaccines may have an important role in malaria control and elimination, in part because they can be readily integrated into existing health care structures. Two main lines of research on malaria vaccines have resulted in advanced clinical development programmes, the induction of immunity against pre-erythrocytic stages, and mimicry of naturally acquired immunity to clinical malaria through vaccination with blood stage antigens. GMZ2 is one representative of the second

group which is currently under clinical development and RTS,S/AS01 is the most advanced of the first group [3]. Naturally acquired immunity is not sterile but protects from severe symptoms and complications, and despite marked genetic and antigenic variability of the parasite, is remarkably robust. Several passive transfer experiments showed that antibodies are central to the development of natural immunity [4,5,6]. Robustness of naturally-acquired immunity was most convincingly demonstrated when antibody preparations from one continent (Africa) were used to inhibit *in vivo* growth of parasites in malaria patients from another continent (Asia) [5]. Unfortunately, the mechanism of protection and the targets of immunity are not known although several immunological surrogate markers of protection have been proposed. Analysis of sera from immune adults from endemic regions, including those from passive transfer experiments, led to the identification of merozoite surface protein 3 (MSP3) as a potentially important antigen for the induction of anti-malarial immunity [7]. Another antigen that elicits antibodies in frequently exposed individuals is glutamate rich protein (GLURP). High anti-GLURP titers have been associated with protection from malaria in several studies [8,9] and it was shown that anti-GLURP antibodies induce antibody-dependent cellular inhibition (ADCI) in a way similar to MSP3 [10]. A fusion protein of conserved parts of both proteins showed good immunogenicity. Since the presumed mechanism of protection of MSP3 and GLURP is similar, and partial protection in pre-clinical trials was documented [11], it was decided to develop a MSP3-GLURP fusion protein for studies in humans naturally exposed to malaria.

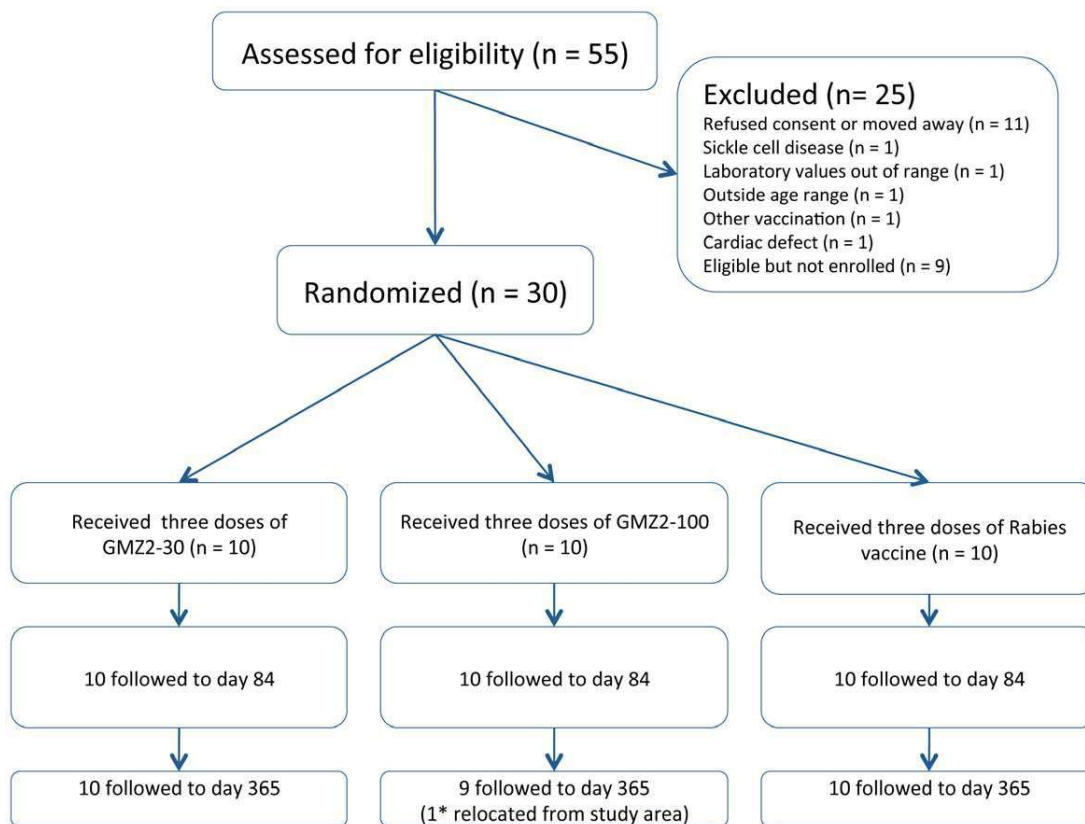
GMZ2 is the preparation of a recombinant GLURP<sub>27–500</sub>-MSP3<sub>212–380</sub> fusion protein, expressed in *Lactococcus lactis*, and mixed with the adjuvant aluminium hydroxide. The vaccine is given intramuscularly as three injections one month apart. The first trial in humans, in German malaria-naïve adults, showed good safety, tolerability and immunogenicity of three different dosing schemes of GMZ2 [12]. Subsequently, a randomized controlled trial in malaria-exposed Gabonese adults was done, where the higher dose of GMZ2 (100 µg) was compared to a control vaccine (rabies vaccine). In this study, the vaccine was well tolerated and boosted pre-existing immune responses against the vaccine antigen [13]. The vaccine induced strong responses to GMZ2 and to GLURP, but responses to MSP3 were low. The present trial was designed to provide first data on safety and immunogenicity of 100 µg GMZ2, and a lower dose 30 µg GMZ2, in malaria-exposed children 1–5 years of age, the group in which phase IIb efficacy trials would be done.

## Methods

The protocol for this trial and supporting CONSORT checklist are available as supporting information; see Checklist S1 and Protocol S1.

### Participants and interventions

The study took place from September 2008 to October 2009 at the Albert Schweitzer Hospital Lambaréné, Gabon, an area with year-round malaria transmission [14]. Healthy children from



**Figure 1. Study flow.** All participants received the complete course of vaccination and were followed for 4 weeks after the last vaccination. \* The subject lost to follow-up and was in good health when examined after the scheduled Day 365 visit. doi:10.1371/journal.pone.0022525.g001

Lambaréné between 1 and 5 years of age were screened and those who met the inclusion criteria were randomly assigned 1:1:1 to receive three doses of either rabies vaccine, 30 µg GMZ2 (GMZ2-30) or 100 µg GMZ2 (GMZ2-100). Vaccine doses were given one month apart (days 0, 28 and 56) intramuscularly, alternately in the left or right deltoid muscle. GMZ2 was produced as one clinical batch following Good Manufacturing Practice (Henogen SA, Belgium) and provided in aliquots of 12 µ. Aluminium hydroxide (Statens Serum Institut, Denmark) was provided in separate vials and mixed with the vaccine one hour before administration following a standard operating procedure in a separate preparation room equipped with a sterile flow hood. Rabies vaccine (Verorab, Sanofi Pasteur) was used as control vaccine. Each child was kept under observation for 30 minutes after vaccination. A physician examined participants on the day of vaccination and 1, 3, 7, and 14 days after each vaccination. Participants were re-examined by a physician on Day 84 (one month after the last dose of vaccine) and on Day 365 (10 months after the last vaccine dose). Children were visited at home by a field worker 2, 4, 5 and 6 days after each vaccination and on days 140, 224 and 308 after the first vaccination to assess health and record the occurrence of adverse events. A 24-hour phone line was maintained for parents to contact the study team in the event of any adverse event.

**Ethics**

Written informed consent was obtained from the parents of participating children. If the child’s parent or guardian was unable to read, an impartial witness was present during the informed consent and signed together with the child’s parent the informed consent form. The study was approved by the Comité d’Ethique Régional Indépendant de Lambaréné (CERIL) and the Gabonese Ministry of Health. A data and safety monitoring board (DSMB)

**Table 1.** Baseline characteristics of study participants.

	Rabies	GMZ2-30	GMZ2-100
Age (years) *	3.5 (1.9, 4.8)	3.5 (2.2, 5.6)	3.5 (1.8, 5.7)
Gender #	5/5	5/5	5/5
Height (cm) *	96 (85, 105)	94 (82, 114)	92 (77, 109)
Weight (kg) *	14.6 (11.4, 18.6)	13.7 (11.0, 21.8)	13.3 (9.6, 17.0)
Hemoglobin (g/dl) *	10.3 (9.3, 11.9)	10.5 (8.6, 11.8)	10.5 (8.7, 11.8)
White blood cells (cells/nl)*	10.9 (8.3, 13.6)	9.6 (7.3, 13.4)	8.6 (6.1, 11.4)
Thrombocytes (cells/nl)*	387 (262, 487)	322 (222, 408)	381 (201, 516)

\*mean (min, max), # female/male.  
doi:10.1371/journal.pone.0022525.t001

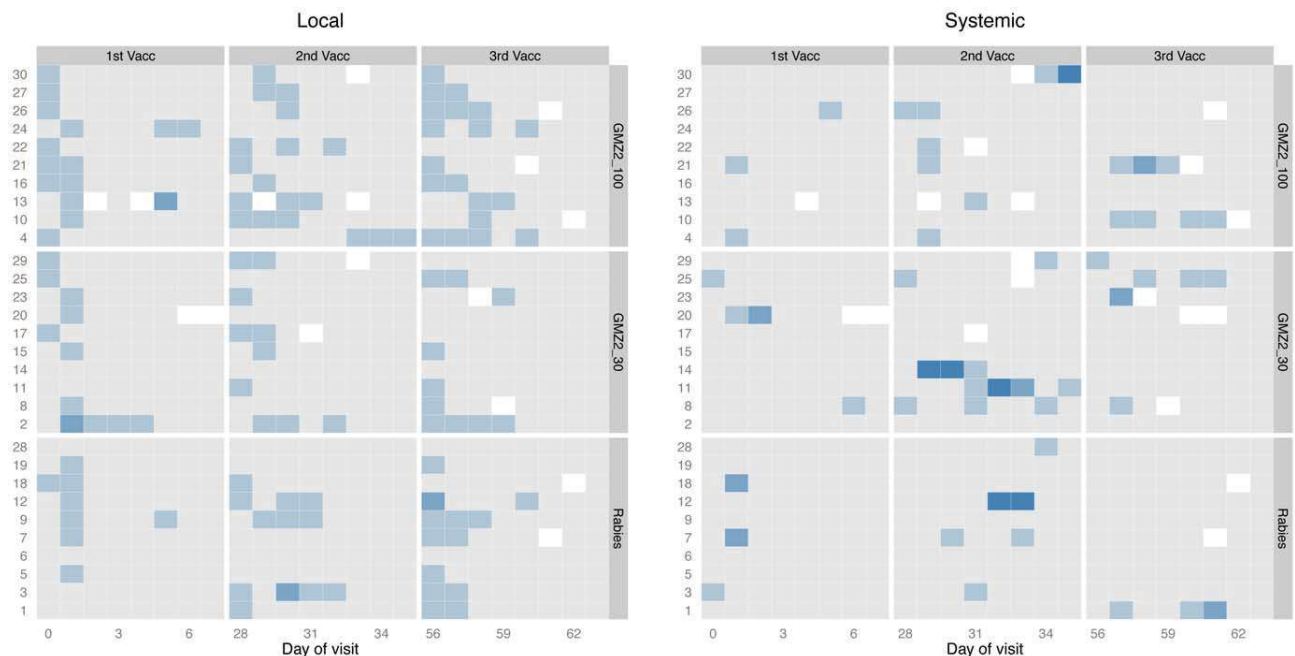
monitored subject safety during the trial. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki (5<sup>th</sup> revision) and International Conference on Harmonization Good Clinical Practice (ICH-GCP) guidelines.

**Objectives and outcomes**

The primary objective was to evaluate the safety and reactogenicity of three injections of either 30 or 100 µg GMZ2 compared to rabies vaccine in the target group for a clinical phase IIb efficacy trial. As secondary objective, humoral immune responses were assessed.

**Randomization and blinding**

A screening list of 39 eligible individuals was sorted on sex and age; 30 were required for enrolment, so 9 individuals (every 4<sup>th</sup>



**Figure 2. Solicited adverse events.** Intensity of local and systemic AE in the 7 days post-vaccination period. Given is the grade of the AE with the highest intensity at each day of follow up as shading (from grey [no AE] to dark blue [grade 3]). Local grade 2 AEs were (top down) pain, swelling, and pruritus at the injection site. Grade 3 reactions were only present as systemic reactions. They consisted of (top down) fever, fever, loss of appetite, and fever (all fevers were due to upper respiratory infection). All grade 3 AEs were judged not to be related to vaccination. Vaccinations were given on Days 0, 28, and 56.  
doi:10.1371/journal.pone.0022525.g002



individual in the sorted list) were excluded to be used as reserves in case any selected individuals dropped out before the administration of the first vaccine dose. The 30 individuals in the sorted list were then allocated to vaccine group using randomly permuted blocks of 3 individuals per block. If a subject was withdrawn before vaccine dose 1, they were to be replaced with the reserve nearest in age. If a subject was withdrawn after vaccine dose 1, they were not replaced. The randomization list was sent by electronic mail by a study statistician (PM) to the study pharmacist who prepared sealed envelopes. A separate sealed envelope of the randomization codes was kept by the local safety monitor. The study pharmacists prepared the vaccines in identical opaque syringes; they had no other role in the trial.

**Laboratory analyses**

Immunological assays were done as previously described [12,13] with minor modifications. For antibody measurement, enzyme linked immunoassays (ELISA) were done. Antigen-specific antibody concentration was assessed by solving a four-parameter logistic regression equation fitted to a serial dilution of a serum pool of highly positive adults according to published procedures [15]. Therefore antibody data is expressed as fraction of antibody concentration compared to a positive serum pool prepared from high responders of a previous clinical trial on GMZ2 [13]. Memory B-cell enzyme linked immunospot assays (ELISPOT) were done on freshly isolated peripheral blood mononuclear cells using previously published procedures [12,13]. Anti-GMZ2, anti-MSP3, and anti-GLURP antibodies were measured by ELISA, whereas memory B-cell response was assessed by ELISPOT against the whole vaccine antigen (GMZ2) and anti-IgG as a positive control.

**Statistical methods and sample size**

The aim of the trial was to establish safety of the vaccine doses with respect to very common adverse reactions. In the previous two clinical trials [12,13] analysis of ten individuals per group sufficed to detect increases in anti-GMZ2 immune responses. Data was captured on paper case report forms and transferred to an electronic database. All analyses were done using Stata v10 and R v2.12.0. Data analysis followed a statistical analysis plan that was finalized before unblinding.

For analysis of antibody concentrations, zero values were considered as left-censored observations, and replaced with a constant value equal to the smallest non-zero concentration for that antigen in the dataset. For each antigen, the ratio of the geometric mean concentration at each time point to the mean concentration pre-vaccination, was calculated with a 95% confidence interval. Analysis of covariance was used to compare humoral responses between the vaccine groups at each time point,

**Table 2.** Non-solicited adverse events grouped by organ system, recorded until one month after last vaccination.

	Rabies	GMZ-30	GMZ-100
Ear	3	0	1
Eye	2	1	2
Fever	0	0	2
Gastrointestinal tract	2	2	0
Malaria	1	0	0
Respiratory tract	22	25	22
Skin	3	5	6
Trauma	2	3	10
Urinary tract	0	0	1
TOTAL	35	36	44

All AEs were of mild intensity besides 2 respiratory tract infections of moderate intensity in the GMZ2-30 and Rabies group, respectively. All AEs resolved without sequelae.  
doi:10.1371/journal.pone.0022525.t002

with adjustment for the pre-dose-one value as a covariate, after transforming to logarithms, and the adjusted difference in means between vaccine groups was presented as a ratio in the original measurement scale, with a 95% confidence interval.

As sensitivity analysis the log-transformed area under the curve (AUC) of antigen-specific IgG concentration against time was calculated for each subject from day 0 to day 84 and compared between vaccine groups. This provides a single test for each antigen to determine whether the vaccine induced an antibody response. ELISPOT data are given as number of GMZ2-specific cells per total number of antibody secreting cells (ASC). Non-parametric methods were used to calculate difference in AUC between groups in a hierarchical approach: Kruskal-Wallis test for comparison of the three intervention groups and an exact version the Wilcoxon-Mann-Whitney test for pairwise comparisons if the first test rejected the null hypothesis. An estimate of the shift in location and its 95% confidence interval was calculated using the method of Bauer [16]. Solicited local adverse events (pain, swelling, induration, erythema, or pruritis at the injection site, or contralateral reaction) and general adverse events (fever, irritability, drowsiness, loss of appetite, or diarrhoea) were graded as mild, moderate or severe following the guidelines of the Brighton Collaboration [17]. The number of local and general adverse events, and the number of non-solicited adverse events, within 14 days after each dose was tabulated for each vaccine group. Analyses were by intention to treat.

**Table 3.** Change in antigen-specific antibody concentration to GMZ2, GLURP and MSP3 after 1, 2 and 3 doses of vaccine.

Antigen	GMZ2			GLURP			MSP3		
	Rabies	GMZ2-30	GMZ2-100	Rabies	GMZ2-30	GMZ2-100	Rabies	GMZ2-30	GMZ2-100
Vaccine									
Day 28	0.12 (0.01,1.1)	2.3 (0.70,7.8)	2.6 (0.74,9.1)	1.1 (0.35,3.1)	2.2 (0.57,8.4)	2.5 (0.56,11)	0.3 (0.07,1.2)	0.46 (0.18,1.2)	0.90 (0.22,3.7)
Day 56	0.21 (0.04,1.0)	17 (6.9,49)	9.5 (2.7,34)	0.90 (0.26,3.1)	13 (3.8,42)	8.6 (1.8,40)	0.50 (0.19,1.3)	1.9 (0.94,3.8)	3.3 (1.2,9.1)
Day 84	1.2 (0.57,2.5)	30 (11,83)	19 (6.1,58)	1.7 (0.62,4.5)	21 (6.4,68)	14 (3.8,56)	1.5 (0.83,2.8)	4.2 (2.4,7.6)	7.1 (2.9,17)
Day 365	1.0 (0.50,2.05)	3.2 (1.5,6.9)	1.1 (0.70,1.8)	1.0 (0.37,2.8)	1.9 (1.1,3.5)	1.0 (0.45,2.2)	0.67 (0.33,1.4)	1.2 (0.71,2.0)	0.83 (0.45,1.5)

Data is given as the ratio of geometric mean IgG concentration (95% confidence interval).  
doi:10.1371/journal.pone.0022525.t003

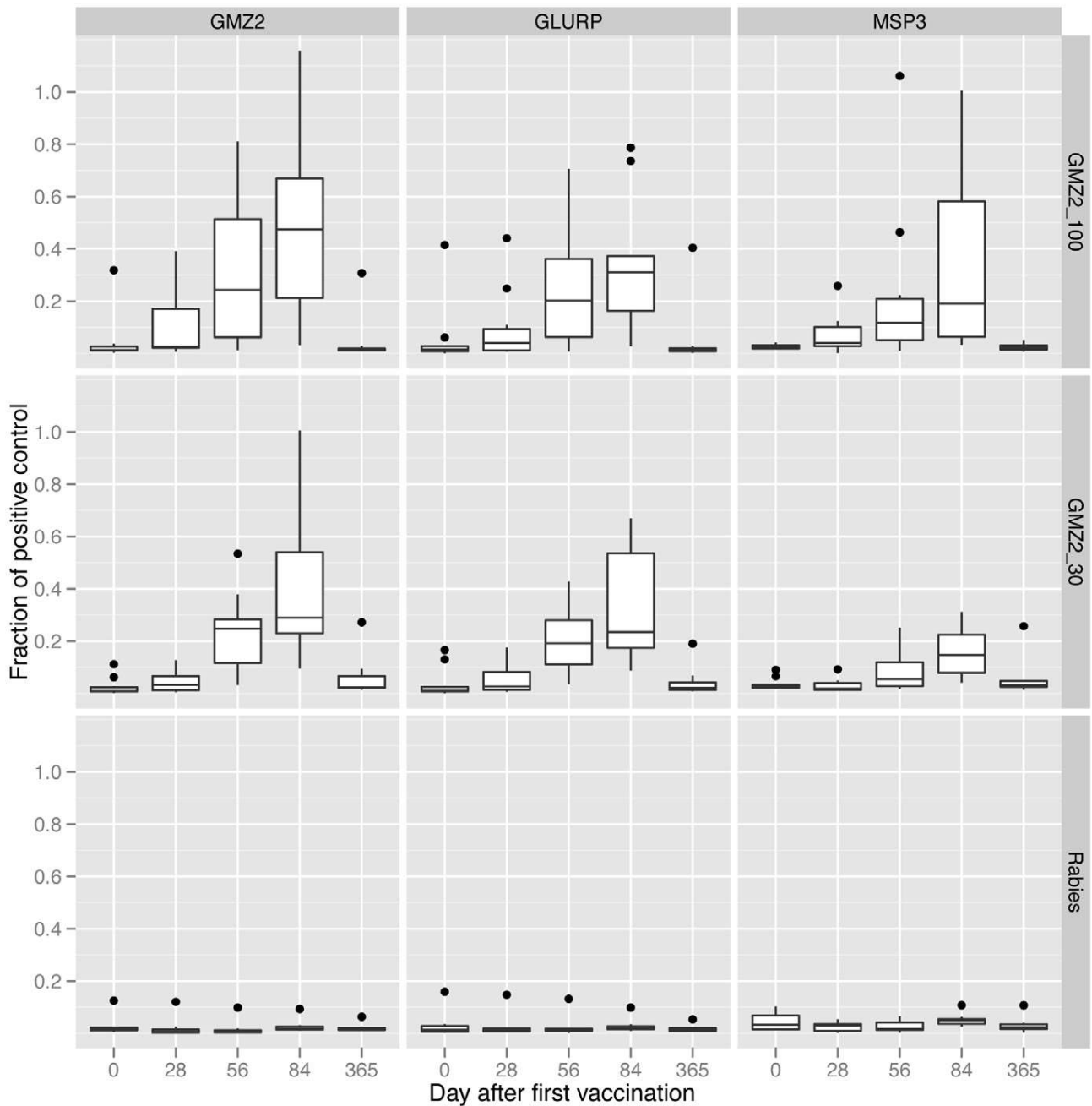
**Results**

**Participants flow and recruitment**

Thirty-nine out of 55 children were eligible to participate in the study (Figure 1). The first subject was enrolled on 13<sup>th</sup> October 2008 and the last patient's follow-up ended 14<sup>th</sup> October 2009. All participants received their scheduled vaccinations (scheduled on Days 0, 28 and 56) and were closely monitored up to one month after the third dose (Day 84), and follow-up continued until Day 365. One participant of the GMZ2-100 group, a 3-year-old boy, was lost to follow-up at Day 365 due to his relocation from the

area. However, the boy was visited and examined two months after the intended last clinical visit. His parents did not report any possible drug-related adverse reaction and he was in good health.

At baseline, participants had similar demographic and laboratory characteristics (Table 1). One participant, a 2-year-old boy, received tetanus vaccine on Day 76 of the study, was excluded from according to protocol analyses of immunogenicity (not shown). Nevertheless, the full set of 30 children was considered for safety and immunological outcomes until Day 84. For analyses including Day 365, all successfully followed 29 children were assessed.



**Figure 3. Antibody responses.** Antibody responses against GMZ2, GLURP, and MSP3 are shown as boxplot in the original measurement scale (Fraction of positive control).  
doi:10.1371/journal.pone.0022525.g003



## Adverse events

During the trial two serious adverse events (SAE) occurred. A 4-year-old boy was hospitalized because of severe malaria (high parasitemia and prostration) on Day 53. The child recovered without sequelae and received the 3<sup>rd</sup> vaccination on Day 59. The second SAE occurred in a 3-year-old boy. He presented with fever and upper respiratory infection on Day 29 and was hospitalized for diagnostic purposes on Day 30. The child was discharged in good health on Day 32 without causal treatment and received the third vaccination as planned. Both SAEs occurred in the GMZ2-30 group and were not related to vaccination as judged by the investigators and the DSMB.

All children, except for one 4-year-old boy in the rabies vaccine group had either local or systemic reactions during the vaccination period from Day 0 to 2 weeks after the last injection (27 out of 30 with at least one local and 21 out of 30 with at least one systemic reaction). Local and systemic adverse events were slightly more common in the GMZ2-100 group (Figure 2) most of these events were mild in severity. No grade 3 local AE was observed. Within 6 days following vaccination two participants of the rabies and one participant of the GMZ2-100 and -30 groups experienced local grade 2 reactions. Four grade 3 systemic reactions were observed after the second vaccine administration, one case of loss of appetite in the GMZ2-30 group and three cases of fever ( $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ), one in each intervention group. All grade 3 fever cases were associated with upper respiratory infections and resolved without specific treatment.

Unsolicited adverse events during the trial, were all judged not to be related to the vaccines. In total, 114 unsolicited AE were observed: none of severe intensity, two of moderate and 112 of mild intensity (Table 2). Of note, one 4-year-old boy of the rabies vaccine group developed mild malaria on Day 32 of the study.

## Immunogenicity

The concentration of antibodies to GMZ2, GLURP and MSP3 was low in all three groups before vaccination. In both GMZ2 vaccine groups, antibody concentrations to all three antigens increased after each vaccination, with small increases after the first dose and larger increases after the second and third doses (Table 3 and Figure 3). In the GMZ2-30 group, all individuals responded to vaccination with an increase in anti-GMZ2 antibodies at Day 84, whereas in the GMZ2-100 group one non-responder was observed. Confidence intervals for the rises in concentration were wide reflecting the small sample size (Table 3). Anti-MSP3 antibody concentration measured one month after the third dose of vaccine was higher in the GMZ2 vaccinated groups, than in the rabies vaccine group, by 2.7 fold (95%CI: 1.6,4.6) in the GMZ2-30 group and by 3.8 fold (1.5,9.6) in the GMZ2-100 group (ratios adjusted for differences in pre-vaccination antibody concentration). Anti-GLURP antibody concentration was 12 fold higher (7.2,21) in the GMZ2-30 group than in the rabies vaccine group and 9.7 fold higher (4.4,22) in the GMZ2-100 group. Anti-GMZ2 antibody concentration was 19 fold higher (11,34) in the GMZ2-30 group and 16 fold higher (7.4,36) in the GMZ2-100 group.

One year after the first vaccination (Day 365) the concentration of anti-GMZ2, anti-MSP3 and anti-GLURP antibodies was similar in the rabies and GMZ2-100 groups while the GMZ2-30 group had a 1.2 (1.1,4.2) fold higher baseline corrected anti-GMZ2 antibody concentration compared to the rabies group on Day 365.

AUCs were calculated to examine if a different approach of analyzing leads to similar conclusions (Table 4). Anti-GMZ2, anti-GLURP and anti-MSP3 antibody AUCs were higher in the GMZ2-30 and GMZ2-100 groups as compared to the rabies

vaccinated subjects whereas the GMZ2 groups had similar reactivity, thus confirming the findings of the primary statistical approach.

Memory B-cell responses increased upon vaccination with GMZ2 (Figure 4). No increase in anti-GMZ2 memory B-cell numbers at Day 84 was detected in 4 children of the GMZ2-30 and 3 children of the GMZ2-100 groups. AUCs were significantly different between the groups (Kruskal Wallis test; p-value = 0.008). Pairwise comparison showed a shift in location of 44 (4.2,98) GMZ2-specific spots per ASC times Days for the comparison between rabies and GMZ2-100 AUCs, 49 (7.6,251) for rabies versus GMZ2-30 and a non-significant  $-7.4$  ( $-211,45$ ) for GMZ2-100 versus GMZ-30. There was no evidence of an association between antigen-specific antibodies and memory B-cell response (data not shown).

## Discussion

Clinical development of malaria vaccines has gained momentum in recent years. Several vaccine candidates have been evaluated in malaria-exposed individuals but only very few have proceeded to efficacy trials in endemic countries. Asexual blood stage vaccines that have been tested for efficacy in naturally exposed individuals (clinical phase IIb) recently, include AMA-1 [18] and MSP1<sub>42</sub> (FMP1-AS02A) [19]. Unfortunately, these malaria vaccine candidates did not protect children in phase II efficacy trials. Two major difficulties in the selection of potential vaccine antigens are the lack of a surrogate marker for protection and the high degree of variability of antigens that are exposed to the immune system. GMZ2 is one of the latest vaccine candidates to enter clinical trials. Association studies suggest a prominent role of both antigens contained in GMZ2 in protection from malaria and showed partial efficacy in an animal model [11]. In addition, both antigen fragments used in the vaccine are conserved in clinical isolates [20,21], which may constitute an advantage over other candidates. Therefore a clinical development program for GMZ2 was developed that resulted in the present phase Ib trial to assess safety and immunogenicity in the target population for a subsequent clinical phase IIb efficacy trial.

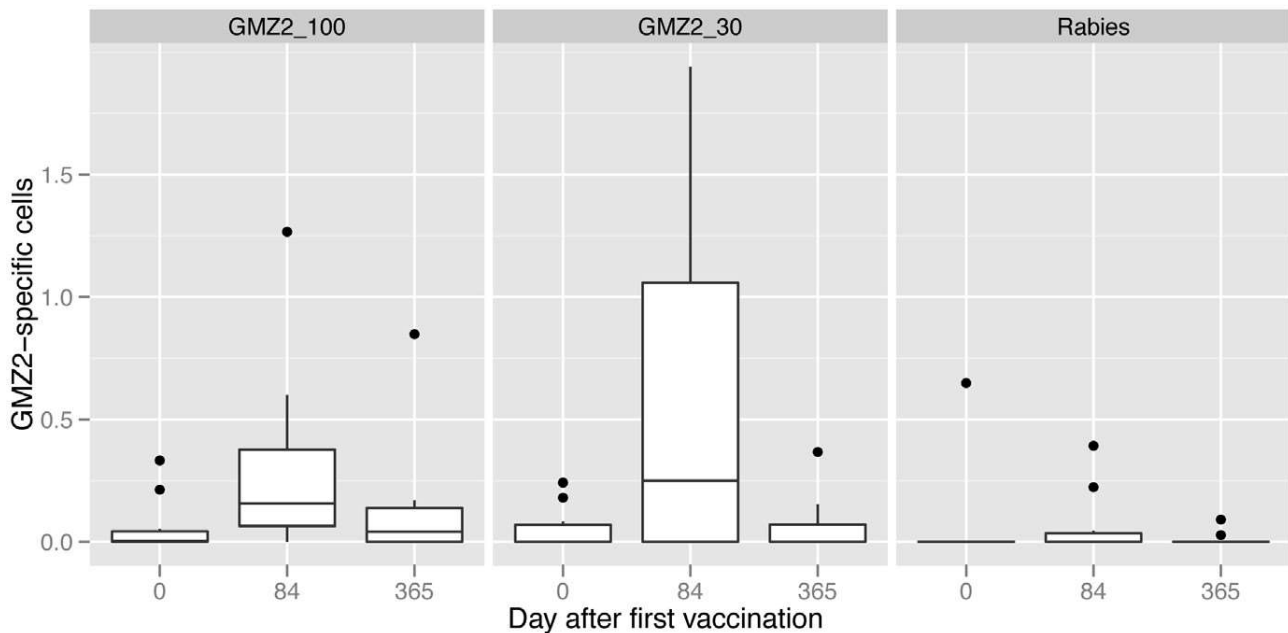
GMZ2 has been developed under the premise that vaccination schedule should be compatible with the Expanded Program on Immunization (EPI), although it is being increasingly recognized that the EPI scheme may be unlikely to induce maximal immunogenicity. Nonetheless, GMZ2 was well tolerated and induced a robust immune response in its target population. No vaccine-related SAEs or grade 3 AEs were observed and all GMZ2 vaccinated participants developed either anti-GMZ2 antibodies or memory B-cells.

Both the 30  $\mu\text{g}$  and 100  $\mu\text{g}$  GMZ2 induced strong antibody responses to GLURP, as has been seen with GMZ2 in previous trials [12,13]. Both groups showed responses to MSP3, in contrast to the study in Gabonese adults, where there was no evidence of

**Table 4.** Area under the curve IgG concentration.

	Rabies	GMZ2-30	GMZ2-100
Anti-GMZ2	6.7 (4.4,10)	65 (39,109)	58 (24,141)
Anti-GLURP	6.9 (5,11)	53 (32,87)	41 (17,103)
Anti-MSP3	13 (10,18)	29 (18,47)	36 (15,88)

Data is given as geometric mean (95% confidence interval) in fraction of positive control x days.  
doi:10.1371/journal.pone.0022525.t004



**Figure 4. GMZ2-specific memory B-cells.** Results are given as GMZ2-specific per 1000 ASCs. doi:10.1371/journal.pone.0022525.g004

responses to MSP3. The rise in anti-MSP3 IgG concentration after three doses was somewhat greater in the 100 µg group than in the 30 µg group but the trial was not powered to be able to compare immunogenicity between these two groups, (a much larger trial would have been required to determine whether 30 µg GMZ2 was as immunogenic as 100 µg). Considering data from all phase I trials of GMZ2 [12,13], the 100 µg dose is safe and well tolerated and was selected for further clinical development, although this does not rule out the use of other doses in the final product. In contrast to malaria-naïve German adults [12], antigen-specific IgG concentrations seemed to decrease by Day 365, but the confidence intervals were wide and the trial was too small to evaluate persistence of IgG response. If anti-parasitic immunity can be induced, it will be important to investigate kinetics of IgG responses and to consider alternative administration schemes, doses, or vaccine formulations to improve longevity of responses and of protection. Such trials will be extraordinarily helpful for understanding immune response patterns and their role in protection.

The number of GMZ2 vaccinated subjects is still low (a total of 70 people have been vaccinated with GMZ2, 40 of them with the 100 µg dose), therefore it is too early to assess its overall safety with confidence. Nevertheless, the use of aluminum hydroxide, one of the most frequently administered molecules in vaccinations, as the adjuvant was a choice that minimizes safety problems and therefore the good tolerability is not surprising. We believe that this is an important issue and should be investigated with more emphasis in other vaccines that use novel and experimental

adjuvant systems. This is particularly relevant for vaccines intended for widespread use in young children.

In conclusion, GMZ2 is immunogenic and well tolerated. Efficacy studies are now needed and a multi-center phase IIb trial in four countries has been designed to determine whether three doses of 100 µg GMZ2 can protect children from malaria.

## Supporting Information

**Checklist S1**  
(DOC)

**Protocol S1**  
(PDF)

## Acknowledgments

We thank all participants, their parents and the teams in Lambaréné, Tübingen, Copenhagen, and Dar es Salaam for their great help and continuous support. In particular, Jörn Lange was central for solving medical problems, Judith Kammer managed the laboratory and the vaccines, and Gerlinde Pürkenhauer, Sonja Killinger, Markus Gmeiner, and Ibrahim William Ntchana mastered the logistics of the trial.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SI PM NI EBI MT SJ RAN BO PGK BM. Performed the experiments: SB SI ABH FS UAN ME RF PMdS REM. Analyzed the data: PM BM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT SJ. Wrote the paper: SB SI BM. Involved in the supervision of immunological experiments: MT. Critically read the manuscript drafts and approved the final version: MT.

## References

- World Health Organisation. World Malaria Report 2010. Geneva: WHO.
- Feachem RG, Phillips AA, Hwang J, Cotter C, Wielgosz B, et al. (2010) Shrinking the malaria map: progress and prospects. *Lancet* 376: 1566–1578.
- Ballou WR (2009) The development of the RTS,S malaria vaccine candidate: challenges and lessons. *Parasite Immunol* 31: 492–500.
- Cohen S, Mc GI, Carrington S (1961) Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192: 733–737.
- Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, Attanath P, Botharoun-Tayoun H, et al. (1991) Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am J Trop Med Hyg* 45: 297–308.

6. Sotiriades (1917) Attempts at serotherapy in malaria. *Greek Med* 19: 27–28.
7. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, et al. (1994) Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood* 84: 1594–1602.
8. Meraldi V, Nebie I, Tiono AB, Diallo D, Sanogo E, et al. (2004) Natural antibody response to *Plasmodium falciparum* Exp-1, MSP-3 and GLURP long synthetic peptides and association with protection. *Parasite Immunol* 26: 265–272.
9. Soe S, Theisen M, Roussillon C, Aye KS, Druilhe P (2004) Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein. *Infect Immun* 72: 247–252.
10. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, et al. (1998) The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect Immun* 66: 11–17.
11. Carvalho IJ, Alves FA, Bianco C, Jr., Oliveira SG, Zanini GM, et al. (2005) Immunization of Saimiri sciureus monkeys with a recombinant hybrid protein derived from the *Plasmodium falciparum* antigen glutamate-rich protein and merozoite surface protein 3 can induce partial protection with Freund and Montanide ISA720 adjuvants. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 242–248.
12. Esen M, Kremsner PG, Schleucher R, Gassler M, Imoukhuede EB, et al. (2009) Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine* 27: 6862–6868.
13. Mordmüller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, et al. (2010) Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambarene, Gabon. *Vaccine* 28: 6698–6703.
14. Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, Brandts C, Jenne L, Wernsdorfer WH (1995) Malaria epidemiology in the eprovince of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop Med Parasitol* 46: 77–82.
15. Miura K, Orcutt AC, Muratova OV, Miller LH, Saul A, et al. (2008) Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine* 26: 193–200.
16. Bauer DF (1972) Constructing confidence sets using rank statistics. *Journal of the American Statistical Association* 67: 687–690.
17. Gidudua J, Kohla KS, Halperin S, Hammerc SJ, Heath PT, Hennige R, Hoet B, Rothsteing E, Schuindh A, Varricchio F, Walopj W (2008) A local reaction at or near injection site: Case definition and guidelines for collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine* 26: 6800–6813.
18. Sagara I, Dicko A, Ellis RD, Fay MP, Diawara SI, et al. (2009) A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali. *Vaccine* 27: 3090–3098.
19. Ogotu BR, Apollo OJ, McKinney D, Okoth W, Siangla J, et al. (2009) Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya. *PLoS ONE* 4: e4708.
20. de Stricker K, Vuust J, Jepsen S, Oeuvray C, Theisen M (2000) Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 111: 123–130.
21. Singh S, Soe S, Weisman S, Barnwell JW, Perignon JL, et al. (2009) A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* 4: e5410.

### 2.1.2 Einfluss helminthologischer Infektionen auf die Immunantwort des Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 bei Kindern in Gabun

Esen M, Mordmüller B, Martinez de Salazar P, Adegnika AA, Agnandji ST, Schaumburg F, Bouyoukou Hounkpatin A, Brückner S, Theisen M, **Bélar** S, Ateba Ngoa U, Issifou S, Yazdanbakhsh M, Kremsner PG. Reduced antibody responses against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in the presence of *Trichuris trichiura*. *Vaccine*, 2012; 30(52):7621-7624. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.026

Afrikanische Kinder stellen die Hauptzielgruppe für die Entwicklung eines Malariaimpfstoffes dar. Neben Malariaparasiten sind sie auch einer Vielzahl weiterer Parasiten, unter anderem intestinaler Helminthen, ausgesetzt. Intestinale Helminthosen können in Abwesenheit funktionierender Kontrollprogramme und aufgrund milder klinischer und folglich unbehandelter Verläufe hochprävalent vorliegen.

Intestinale Helminthosen führen auch bei asymptomatischer Infektion zu Immunmodulation, welche durch antihelminthische Behandlung reversibel ist. Helminthosen können somit einen Einfluss auf die Immunantwort auf eine Impfung haben und die Impfwirksamkeit beeinflussen.

In dieser Studie wurde der Einfluss intestinaler Helminthosen auf die Impf-induzierte Immunantwort des Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 im Rahmen der Phase I Studie bei afrikanischen Kindern untersucht. Vakzin-spezifische Antikörperkonzentrationen waren bei Kindern ohne *Trichuris trichiura* Nachweis 3,4-fach höher (95% Konfidenzintervall: 1,6, 7,4) als bei Kindern mit *T. trichiura* Infektion; Antikörperkonzentrationen bei Kindern mit oder ohne *Ascaris lumbricoides* Infektion unterschieden sich hingegen nicht. Die Gedächtniszellantwort war bei *T. trichiura* negativen Kindern leicht aber nicht signifikant erhöht.

Diese Studie zeigte anhand einer kleinen Fallzahl, dass eine reduzierte Antikörperantwort auf den Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 mit einer *T. trichiura* Infektion assoziiert war. Der zugrunde liegende Pathomechanismus ist unklar. Impfprogramme sowie die Malariaimpfstoffentwicklung sollten die Möglichkeit eines verminderten Helminthen-vermittelten Impfansprechens berücksichtigen.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.026>

## 2.2 Artemisinin-basierte Therapie der Malaria bei Kindern

### 2.2.1 Klinische Prüfung einer pädiatrischen Darreichungsform von Artesunat/Pyronaridin bei Kindern mit unkomplizierter Falciparum-Malaria in Gabun

*Ramharter M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp Iv, **Bélar** S, Schlie M, Kammer J, Koumba PK, Cisse B, Mordmüller B, Lell B, Issifou S, Oeuvray C, Fleckenstein L, Kreamsner PG. Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated falciparum malaria in pediatric patients in Gabon. Journal of Infectious Diseases, 2008 Sep 15; 198(6):911-9. doi: 10.1086/591096*

Um die Verfügbarkeit verschiedener ACTs für die Behandlung der unkomplizierten Malaria zu erweitern, befanden sich zum Zeitpunkt dieser Arbeit verschiedene Kombinationen aus Artemisinin-Derivaten mit neuen Partnersubstanzen und auch in pädiatrischen Darreichungsformen in der klinischen Entwicklung. Die neue Kombinationstherapie Artesunat/Pyronaridin wurde im Rahmen einer öffentlich-privaten Partnerschaft zwischen Shin Poong Pharmaceutical Company und Medicines for Malaria Venture entwickelt. Diese „fixed-dose“ ACT sollte neben hoher Wirksamkeit sowie guter Sicherheit und Verträglichkeit auch kostengünstig sein, ein einfaches 3-tägiges Dosierungsschema mit einer einzigen täglichen Dosis haben und auch in einer pädiatrischen Darreichungsform verfügbar sein.

Nach erfolgreichen Phase I und II Studien bei Erwachsenen, wurde diese Phase II Studie bei 60 gabunischen Kindern mit unkomplizierter Falciparum-Malaria durchgeführt um in dieser Zielpopulation die geeignete Dosierung von Artesunat/Pyronaridin zu ermitteln. In vier Behandlungsgruppen wurden über drei Tage unterschiedliche Dosierungen (6:2, 9:3 und 12:4 mg/kg) von Artesunat/Pyronaridin verabreicht; drei Behandlungsgruppen erhielten Artesunat/Pyronaridin in Tablettenform, eine Behandlungsgruppe erhielt Artesunat/Pyronaridin als pädiatrische Granulat-Darreichungsform. Studienendpunkte waren Verträglichkeit, Sicherheit, Pharmakokinetik und Wirksamkeit.

Artesunat/Pyronaridin erzielte in allen Dosierungsgruppen sowie in Tabletten- und Granulatdarreichungsform hohe Wirksamkeit sowie gute Verträglichkeit und Sicherheit. Die pharmakokinetische Auswertung zeigte eine lineare Abhängigkeit zwischen Dosis und Blutkonzentration sowie eine vergleichbare Bioverfügbarkeit der Tabletten- und Granulat-Darreichungsform.

Die Ergebnisse dieser Studie ebneten den Weg für die Fortsetzung der Entwicklung von Artesunat/Pyronaridin sowohl in pädiatrischer Tabletten- als auch Granulat-Darreichungsform.

<https://doi.org/10.1086/591096>

### 2.2.2 Artemisinin-basierte Kombinationstherapie bei Non-Falciparum Malaria und Malariamischinfektionen in Gabun

Mombo-Ngoma G, Kleine C, Basra A, Würbel H, Diop DA, Capan M, Adegnika AA, Kurth F, Mordmüller B, Joanny F, Kremsner PG, Ramharter M, **Bélard S**. Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon. *Malar Journal*, 2012; Jul 10;11:120. doi: 10.1186/1475-2875-11-120.

Die nicht lebensbedrohlichen Malariainfektionen durch *P. malariae*, *P. ovale curtisi* oder *P. ovale wallikeri* erhielten im Rahmen der Entwicklung und Einführung von ACT kaum Aufmerksamkeit und Chloroquin blieb entsprechendes Mittel der Wahl in den Therapieempfehlungen.

Zur Zeit dieser Studie war es in Gabun gängige Praxis die Non-Falciparum Malaria mit ACT zu behandeln. Diese Praxis stand den offiziellen Empfehlungen, welche eine Therapie mit Chloroquin empfahlen, entgegen und beruhte, in Ermangelung klinischer Studien zur Wirksamkeit und Sicherheit von ACT für Non-Falciparum Malaria, auf der lokalen Beobachtung, dass ACT auch bei Non-Falciparum Malaria wirkte.

In dieser prospektiven Studie untersuchten wir Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit von Artemether/Lumefantrin bei Patienten mit unkomplizierter Non-Falciparum Malaria oder Malariamischinfektion in Gabun. Die Studienkohorte mit einem Medianalter von 8 Jahren umfasste 40 Patienten. Der dreitägigen oralen Behandlungsphase folgte eine Nachbeobachtung bis Tag 28. Alle auswertbaren Patienten (n = 38) waren nach 36 Stunden parasitenfrei und zeigten an Tag 28 ein adäquates klinisches und parasitologisches Ansprechen. Alle unerwünschten Nebenwirkungen waren mild bis moderat und bis zum Studienende vollständig regredient.

Diese erste systematische und prospektive Untersuchung einer ACT für Malaria durch *P. malariae*, *P. ovale curtisi* und *P. ovale wallikeri* oder Malariamischinfektion zeigte eine hohe Heilungsrate sowie gute Sicherheit und Verträglichkeit. Die Daten dieser Studie unterstützten somit die gängige Praxis die Blutstadien von Non-Falciparum Malaria, Malariamischinfektionen oder Malariafälle ohne Speziesdifferenzierung mit Artemether/Lumefantrin zu behandeln.



RESEARCH

Open Access

# Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon

Ghyslain Mombo-Ngoma<sup>1,2,3</sup>, Christian Kleine<sup>1,2,4</sup>, Arti Basra<sup>1,2</sup>, Heike Würbel<sup>1,2</sup>, Daisy A Diop<sup>1,2</sup>, Mesküre Capan<sup>1,2,5</sup>, Ayola A Adeginka<sup>1,2,6</sup>, Florian Kurth<sup>1,2,7</sup>, Benjamin Mordmüller<sup>1,2</sup>, Fanny Joanny<sup>1,2</sup>, Peter G Kremsner<sup>1,2</sup>, Michael Ramharter<sup>1,2,5\*</sup> and Sabine Bélard<sup>1,2,8</sup>

## Abstract

**Background:** The recommendation of artemisinin combination therapy (ACT) as first-line treatment for uncomplicated falciparum malaria is supported by a plethora of high quality clinical trials. However, their recommendation for the treatment of mixed-species malaria and the large-scale use for the treatment of non-falciparum malaria in endemic regions is based on anecdotal rather than systematic clinical evidence.

**Methods:** This study prospectively observed the efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated non-falciparum or mixed-species malaria in two routine district hospitals in the Central African country of Gabon.

**Results:** Forty patients suffering from uncomplicated *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* or mixed-species malaria (including *Plasmodium falciparum*) presenting at the hospital received artemether-lumefantrine treatment and were followed up. All evaluable patients (n = 38) showed an adequate clinical and parasitological response on Day 28 after oral treatment with artemether-lumefantrine (95% confidence interval: 0.91,1). All adverse events were of mild to moderate intensity and completely resolved by the end of study.

**Conclusions:** This first systematic assessment of artemether-lumefantrine treatment for *P. malariae*, *P. ovale* and mixed-species malaria demonstrated a high cure rate of 100% and a favourable tolerability profile, and thus lends support to the practice of treating non-falciparum or mixed-species malaria, or all cases of malaria without definite species differentiation, with artemether-lumefantrine in Gabon.

**Trial Registration:** ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00725777

**Keywords:** Malaria, Ovale, Malariae, Artemisinin-combination-therapy, Artemether-lumefantrine, Non-falciparum

## Background

Effective treatment of malaria is one of the main tools to control and eventually eradicate malaria. A plethora of clinical trials demonstrating high efficacy, satisfying effectiveness, and good tolerability and safety of artemisinin combination therapy (ACT) – the current first-line treatment of falciparum malaria – has been conducted and published over the past decade [1,2]. Treatment recommendations for non-falciparum malaria have however

remained virtually unchanged since the introduction of chloroquine more than five decades ago [3].

*Plasmodium falciparum* and to a lesser extent *Plasmodium vivax* have attracted more scientific interest compared to the other human plasmodial species due to their high incidence, virulence and the emergence of drug resistant isolates. Today *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* are among the most neglected tropical diseases particularly in sub-Saharan Africa. This fact is illustrated by an analysis of clinical trials on *P. ovale* and *P. malariae* malaria resulting in less than five interventional clinical trials over the past 10 years, compared to 930 reports of clinical trials for *P. falciparum* malaria [4]. More research activities

\* Correspondence: michael.ramharter@meduniwien.ac.at

<sup>1</sup>Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambaréné, Gabon

<sup>2</sup>Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

are, therefore, needed to boost the development of novel and improved control tools for these plasmodial infections.

Today chloroquine remains the standard of care for *P. malariae* and *P. ovale* malaria due to its low cost and sustained efficacy. ACT is recommended as first-line treatment for *P. falciparum* malaria and for mixed plasmodial infections [3]. Despite these official recommendations, ACT is used in many areas for the treatment of all forms of malaria including non-falciparum infections. This may be explained by the fact that non-falciparum species often occur concurrently with *P. falciparum* as mixed infections in sub-Saharan Africa [5-7], and that clinicians prefer the prescription of an ACT for malaria cases due to lacking or unreliable species differentiation. Finally, chloroquine treatment is unpopular in many parts of sub-Saharan Africa due frequently experienced adverse effects, e.g. induced pruritus.

At present, artemether-lumefantrine is the most widely used ACT worldwide with 130 million treatment courses procured in 2010 [8]. Anecdotal evidence indicates that artemether-lumefantrine may be highly efficacious against *P. malariae*, *P. ovale* and mixed-species malaria, however, a prospective evaluation is still lacking. Since artemether-lumefantrine is used on a large scale for these indications in sub-Saharan Africa we assessed the efficacy of artemether-lumefantrine in patients suffering from uncomplicated malaria due to non-falciparum species or mixed malaria species infections presenting at two district hospitals in the Central African country of Gabon.

## Methods

This prospective study was performed in Gabon at the Medical Research Unit of the Albert Schweitzer Hospital in Lambaréné [9] and the Regional Hospital of Fougamou. This Central African region is characterized by perennial transmission of *P. falciparum* [10] and co-endemicity of *P. ovale* and *P. malariae* [5]. Young children and pregnant women are at highest risk for malaria associated morbidity and mortality in this region [11-13]. *Plasmodium falciparum* isolates are highly resistant to chloroquine and sensitivity to antifolate anti-malarials has decreased [14-16], hence ACT has become the first-line treatment of malaria [17]. The study followed the principles of the Declaration of Helsinki (5th revision) and was approved by the regional ethics committee (CERIL). Written informed consent was obtained prior to inclusion in the study from adult participants or from a legal representative of children below 21 years of age, and assent was obtained where applicable.

Participants older than six months presenting with fever or with a history of fever during the previous four days and for whom malaria was confirmed by a thick blood smear were considered for inclusion. Thick and thin blood smears were performed and patients positive for *P. ovale*, *P. malariae* or a mixed infection with more

than one plasmodial species (including *P. falciparum*) at a density of below 200,000/ $\mu$ l blood were considered eligible for enrolment.

Patients were excluded from this study when presenting with a clinical condition requiring hospitalization, haemoglobin < 7 g/dl, history of hypersensitivity to artemether-lumefantrine, prior intake of any anti-malarial medication, or current pregnancy or breastfeeding. Demographic data, medical history, physical examination, and axillary temperature were recorded at inclusion. Blood was obtained for haemoglobin measurement (HemoCue AB, Ängelholm, Sweden), malaria diagnostics, and storage on filter papers for molecular analysis. Axillary temperature and blood films were sequentially taken twice daily (at hours 0, 8, 24, 36, 48 and 60) during the treatment period. Follow up visits were scheduled for clinical examination, haemoglobin measurement, and malaria diagnostics on Days 7, 14 and 28 after the start of treatment.

Oral treatment with the standard six doses artemether-lumefantrine regimen (Coartem<sup>®</sup> and Coartem Dispersible<sup>®</sup>) was administered on three consecutive days. Artemether-lumefantrine was given as tablets or dispersible tablets under supervision with a small amount of liquid and patients were encouraged to consume simultaneously fatty food following current recommendations by the manufacturer.

Due to the well-known limitations of microscopic malaria species differentiation in routine laboratories in sub-Saharan Africa, PCR analysis based on the sequence of the small subunit ribosomal RNA (ssrRNA) gene and optional sequencing were performed for final plasmodial species classification. Capillary blood was collected on filter paper (Whatmann<sup>®</sup>) for subsequent PCR analysis. DNA was extracted with a commercial extraction kit (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen) following manufacturer instructions and stored at -20°C for further analysis. Species-specific nested PCR for *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* was carried out as previously described [18-21]. In samples not showing an amplicon for further species differentiation, a fragment of caseinolytic protease C gene (c1pc) or cytochrome b gene was amplified by nested PCR [22] and subsequently sequenced on an ABI3100 Genetic Analyzer.

The primary objective was to assess the efficacy of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed plasmodial infections. The primary efficacy endpoint was the adequate clinical and parasitological response on Day 28. Re-appearing parasitaemia was further classified by PCR genotyping as treatment failure or newly acquired infection [19] except for *P. ovale* infections where potential relapse from liver hypnozoites precludes such a distinction. Secondary endpoints included descriptive assessment of safety, tolerability, parasite clearance time (PCT) and fever clearance time (FCT).

A sample size of 40 patients was shown to be sufficient to demonstrate a lower 90% confidence interval of adequate clinical and parasitological response of at least 90% with a power of 0.8 assuming more than 98% efficacy on day 28. The intention to treat population (ITT) was defined as primary outcome for tolerability and safety analysis and comprised of all patients included in the study. Per protocol population (PP) was defined as primary efficacy outcome and consisted of all patients having received a full course of study medication who were not prematurely withdrawn from follow up.

Data were captured on paper case record forms and transcribed to an electronic database. All data were checked manually and further statistical analysis was performed using JMP 5.0 (SAS Institute Inc., NC, USA). Descriptive statistics of baseline characteristics and outcome measures were computed.

## Results

Between July 2008 and July 2010, 40 patients were included in this study. One patient decided to withdraw consent before treatment initiation and another participant was excluded from the final analysis because of reported concomitant chloroquine intake. All 39 patients completed 28 day follow up and final analysis was done for 38 patients (15 female participants, 39%). The age of patients ranged from two to 50 years, with eight patients aged less than five years and 19 between five and 12 years of age. Baseline parasitaemia ranged from 31 – 100,680 trophozoites per microliter capillary blood (median 777/ $\mu$ l) (Table 1). Based on microscopy thirty-two patients had

mixed-species infections and 7 patients presented with a non-falciparum mono-infection.

Eight hours after initiation of anti-malarial treatment 12 (32%) patients had cleared parasites in peripheral blood. Further 19 patients (50%) showed parasite clearance at 24 hours and all patients (100%) had cleared parasites within 36 hours. Median parasite clearance time was 24 hours. Median parasite clearance time was comparable in children below 5 years of age and adults (Table 2). Patients with higher parasite densities on inclusion had longer parasite clearance times. Only a minority of patients presented with fever at inclusion (n = 5, 13%) and all cleared fever within 36 hours after initiation of treatment. All evaluable patients had an adequate clinical and parasitological response on Day 28 and the overall cure rate was therefore 100% (95% CI: 91-100%).

Tolerability and safety of the artemether-lumefantrine was assessed for all patients from inclusion to Day 28. No serious adverse event was recorded in the course of this clinical trial and eight patients experienced adverse events (diarrhoea, urinary tract infection, convulsion, vomiting, cephalgia, abdominal pain, fever, and lymphadenopathy). Five adverse events were of mild severity (urinary tract infection, vomiting, cephalgia, abdominal pain), the other three adverse events were of moderate severity, and all adverse events completely resolved by the end of follow-up. The only adverse event considered as possibly study drug related was the occurrence of one episode of vomiting on day 1 after first drug administration.

Capillary blood was obtained and further tested by PCR for molecular species differentiation. In this analysis 19 out of 39 samples were confirmed as non-falciparum or mixed species infection. In the remaining 20 samples PCR analysis demonstrated amplification of *P. falciparum* isolates only and no amplification of non-falciparum parasite-specific amplicons. Presence of *P. malariae* mono-

**Table 1 Patient characteristics**

Study flow		
Patients included	40	100%
Evaluable patients	38	95%
Baseline characteristics		
Females	15	39%
Age <sup>1</sup>	8	5-14
Children < 5 years of age	8	21%
Systolic blood pressure (mmHg) <sup>1</sup>	100	90-110
Heart rate (/min) <sup>1</sup>	88	68-104
Haemoglobin (g/dl) <sup>1</sup>	11.3	10.1-12.4
Haemoglobin in children < 5 years (g/dl) <sup>1</sup>	11.5	10.0-12.6
Haemoglobin in patients > 5 years (g/dl) <sup>1</sup>	11.3	10.2-12.6
Asexual parasitaemia <sup>1</sup>	777	266-3053
Asexual parasitaemia in children < 5 years <sup>1</sup>	480	278-742
Asexual parasitaemia in patients > 5 years <sup>1</sup>	849	225-6400
Participants presenting with fever	5	13%

<sup>1</sup> median, interquartile range.  
 ACPR adequate clinical and parasitological response.  
 95% CI 95% confidence intervals.

**Table 2 Patient outcomes**

Outcome Parameters		
Patients with ACPR (n, 95% CI)	38	91-100%
Parasite clearance time (hours) <sup>1</sup>	24	8-24
Parasite clearance time in children < 5 years (hours) <sup>1</sup>	24	24-33
Parasite clearance time in patients > 5 years (hours) <sup>1</sup>	24	8-24
Fever Clearance Time (n = 5, hours) <sup>1</sup>	8	8-30
Patients experiencing any serious adverse event	0	0%
Patients experiencing any adverse event	8	20%
Haemoglobin D28 (g/dl) <sup>1</sup>	11.6	10.6-12.3
Haemoglobin D28 in children < 5 years (g/dl) <sup>1</sup>	11.1	10.6-12.5
Haemoglobin D28 in patients > 5 years (g/dl) <sup>1</sup>	11.7	10.5-12.2

<sup>1</sup> median, interquartile range.  
 ACPR adequate clinical and parasitological response.  
 95% CI 95% confidence intervals.



infection and mixed species infection was demonstrated in one and 18 samples, respectively. Mixed infections were confirmed by PCR analysis indicating co-infection with *P. falciparum* and *P. ovale* (n = 12, 63%), *P. falciparum* and *P. malariae* (n = 3, 16%) and concurrent occurrence of all three species in three samples (n = 3, 16%). *P. ovale curtisi* (n = 9) as well as *P. ovale wallikeri* (n = 10) isolates were present in the samples, concurrent presence of *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* was found in four patients.

## Discussion

This is the first prospective assessment of artemether-lumefantrine in the treatment of *P. ovale*, *P. malariae* and mixed-species infection with *P. falciparum*. The results demonstrate rapid parasite and fever clearance when assessed twice daily and a reassuringly high cure rate of 100% on Day 28. No clinical or parasitological treatment failure occurred during the 28 day follow up period. The primary hypothesis of an adequate clinical and parasitological response rate above 90% could, therefore, be confirmed. Although – at least in theory – the occurrence of recrudescence parasitaemia after Day 28 cannot be ruled out, a longer follow-up period was precluded due to the potential for relapse of *P. ovale* infections and associated problems in classification as treatment failure or reinfection in such circumstances. Anti-relapse therapy with primaquine in *P. ovale* infection is not commonly prescribed in Gabon due to the high risk for reinfection and safety concerns in G6PD deficient individuals.

A limitation of the study design may be seen in the lack of a control group. However, due to frequent occurrence of mixed infections including *P. falciparum*, a randomized controlled trial design comparing standard chloroquine treatment with artemether-lumefantrine was precluded due to concerns for patients' safety. Future randomized clinical trials evaluating different forms of ACT versus chloroquine in the treatment of *P. malariae* or *P. ovale* mono-infections would however be highly desirable. Despite recent reports of delayed parasite clearance of *P. malariae* and *P. ovale* to chloroquine the curative efficacy of this drug appears to be maintained [23]. In analogy to mixed malaria infections of *P. falciparum* with *P. malariae* and *P. ovale* in Africa, co-endemicity of *P. vivax* and *P. falciparum* in South East Asia requires more rigorous assessment of the use of ACT in general, and artemether-lumefantrine in particular, for the treatment of *P. vivax* malaria [24,25]. Solid evidence of the efficacy of ACT in the treatment of non-falciparum malaria is essential before removal of chloroquine from the market as a cheap over the counter drug taken for undiagnosed and undifferentiated malaria cases.

The discrepancy between microscopic and molecular species classification as observed in this study is striking

but not unexpected. Firstly, microscopic determination of mixed infections is prone to misclassification due to the relative predominance of *P. falciparum* trophozoites and often low parasitaemia of the non-falciparum species. Microscopic assessment may, therefore, underestimate mixed species infections. To minimize this source of misclassification internal and external quality control systems for microscopic malaria diagnosis are present in most African malaria research institutions, but not in smaller hospitals or other primary care facilities. In this study, microscopists were under external quality assessment and an expert senior microscopist was available to decide on discrepant results. However, despite these measures a significant proportion of patients showed discrepant results in microscopy and PCR. This discrepancy is likely to be even more important in routine laboratories without the additional quality control mechanisms. This fact further underlines potential advantages of a single treatment algorithm for all plasmodial species since misclassification may lead to the prescription of inadequate and potentially ineffective anti-malarials. Molecular determination of non-falciparum and mixed species infection may also lead to misclassification. The phenomenon of low sensitivity for the detection of mixed species and non-falciparum infections by PCR was previously described and may be explained by multiple factors [26]. DNA recovery of low-level parasitaemia in mixed infections may be too low, potentially leading to an underestimation of mixed infections. Use of frozen blood samples instead of filter paper sampling may improve the yield of DNA extraction and should be compared to dried blood samples in future studies of mixed infections. Most importantly, no difference in the clinical or parasitological response was noticed for PCR confirmed and un-confirmed cases. Hence, artemether-lumefantrine is as an excellent option for the treatment of patients with non-falciparum and mixed species infection. Since the prevalence of chloroquine resistance in Gabon is almost 100% [27], chloroquine treatment of those patients with sub-microscopic *P. falciparum* and microscopically detected non-falciparum mixed infection (n = 6 (15%) in this study) is likely to fail.

This data support the current practice of using artemisinin-combination therapy for the treatment of non-falciparum and mixed plasmodium infections or indeed clinically suspected malaria without prior species diagnosis in Central Africa. Besides high efficacy, proven safety and tolerability of artemether-lumefantrine, the use of this combination may also reduce the risk of treatment failure due to misdiagnosis of plasmodial species. However, contrary to our findings, two recent reports of clinical failures of artemether-lumefantrine treatment of *P. falciparum* and *P. malariae* mixed infections challenge this assumption [28,29]. Whether these reports are the rare

exception or whether late recurrence of *P. malariae* constitutes a significant problem needs further evaluation.

Non-falciparum infections and mixed plasmodial species infections constitute a common infectious disease entity in tropical regions. In the setting of this study these infections account for an estimated 5-10% of malaria cases indicating the importance of non-falciparum and mixed species infections. With the exception of the recently conducted clinical development program of pyronaridine-artesunate combination therapy for the treatment of vivax malaria [30], non-falciparum malaria has been utterly neglected in anti-malarial drug development until these days accounting for less than 1% of published anti-malarial trials [4]. The conduct of clinical trials providing more evidence on the appropriate treatment of such infections therefore seems mandatory.

## Conclusions

In conclusion, this report constitutes the first prospective assessment of artemether-lumefantrine in the treatment of *P. ovale*, *P. malariae*, and mixed-species malaria. The demonstrated high cure rate of 100% and the proven favourable tolerability profile of artemether-lumefantrine lend support to the approach of treating non-falciparum or mixed species malaria or indeed all cases of malaria without the possibility of species differentiation with artemether-lumefantrine combination therapy in the Central African country of Gabon.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

We acknowledge all the participants for their contribution to this study.

## Author details

<sup>1</sup>Medical Research Unit, Albert Schweitzer Hospital, Lambaréné, Gabon.

<sup>2</sup>Institute of Tropical Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

<sup>3</sup>Département de Parasitologie-Myologie, Faculté de Médecine, Université des Sciences de la Santé, Libreville, Gabon. <sup>4</sup>Department of Infectious Diseases, J.W. Goethe University Hospital, Frankfurt a. Main, Germany.

<sup>5</sup>Department of Medicine I, Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria. <sup>6</sup>Department of Parasitology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands.

<sup>7</sup>Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. <sup>8</sup>Centre for Paediatrics and Adolescent Medicine, University Medical Centre Freiburg, Freiburg, Germany.

## Authors contributions

GMN contributed to data collection, interpretation of results, production and revision of the manuscript. CK contributed to data collection, production and revision of the manuscript. AB contributed to data collection, production and revision of the manuscript. HW contributed to data collection, production and revision of the manuscript. DA contributed to data collection, production and revision of the manuscript. MC contributed to data collection, production and revision of the manuscript. AAA contributed to conception and design, interpretation of data and revision of manuscript. FK contributed to conception and design, interpretation of data and revision of manuscript. BM contributed to data collection, interpretation of results, production and revision of manuscript. FJ contributed to data collection, interpretation of results, production and revision of manuscript. PGK

contributed to conception and design and revision of manuscript. MR contributed to conception and design, interpretation of results, production and revision of manuscript. SB contributed to conception and design, data collection, interpretation of results, production and revision of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 16 February 2012 Accepted: 19 April 2012

Published: 19 April 2012

## References

1. Sinclair D, Zani B, Donegan S, Olliaro P, Garner P: Artemisinin-based combination therapy for treating uncomplicated malaria. *Cochrane Database Syst Rev* 2009, (3):CD007483. doi:10.1002/14651858.
2. Kurth F, Belard S, Adegnika AA, Gaye O, Kreamsner PG, Ramharther M: Do paediatric drug formulations of artemisinin combination therapies improve the treatment of children with malaria? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010, **10**:125-132.
3. WHO: *Guidelines for the treatment of malaria*. Secondth edition. Geneva: World Health Organization; 2010.
4. Pubmed: Accessed on September 29th 2011. For 2001-2011.
5. Borrmann S, Szlezak N, Binder RK, Missinou MA, Lell B, Kreamsner PG: Evidence for the efficacy of artesunate in asymptomatic *Plasmodium malariae* infections. *J Antimicrob Chemother* 2002, **50**:751-754.
6. May J, Mockenhaupt FP, Ademowo OG, Falusi AG, Olumese PE, Bienzle U, Meyer CG: High rate of mixed and subpatent malarial infections in southwest Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**:339-343.
7. Walker-Abbey A, Djokam RR, Eno A, Leke RF, Titanji VP, Fogako J, Sama G, Thuita LH, Beardslee E, Snounou G, Zhou A, Taylor DW: Malaria in pregnant Cameroonian women: the effect of age and gravidity on submicroscopic and mixed-species infections and multiple parasite genotypes. *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:229-235.
8. WHO. Global supply of AL. Access Date June 18th 2011. [http://www.who.int/malaria/diagnosis\_treatment/finance/MoU\_termination\_report.pdf]
9. Ramharther M, Adegnika AA, Agnandji ST, Matsigui PB, Grobusch MP, Winkler S, Graninger W, Krishna S, Yazdanbakhsh M, Mordmuller B, Lell B, Missinou MA, Mavoungou E, Issifou S, Kreamsner PG: History and perspectives of medical research at the Albert Schweitzer Hospital in Lambarene, Gabon. *Wien Klin Wochenschr* 2007, **119**(19-20 Suppl 3):8-12.
10. Sylla EH, Kun JF, Kreamsner PG: Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000, **94**:652-656.
11. Kurth F, Belard S, Mombo-Ngoma G, Schuster K, Adegnika AA, Bouyou-Akotet MK, Kreamsner PG, Ramharther M: Adolescence as risk factor for adverse pregnancy outcome in Central Africa—a cross-sectional study. *PLoS One* 2010, **5**:e14367.
12. Ramharther M, Schuster K, Bouyou-Akotet MK, Adegnika AA, Schmits K, Mombo-Ngoma G, Agnandji ST, Nemeth J, Afene SN, Issifou S, Onnas IN, Kombila M, Kreamsner PG: Malaria in pregnancy before and after the implementation of a national IPTp program in Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:418-422.
13. Adegnika AA, Ramharther M, Agnandji ST, Ateba Ngoa U, Issifou S, Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG: Epidemiology of parasitic co-infections during pregnancy in Lambarene, Gabon. *Trop Med Int Health* 2010, **15**:1204-1209.
14. Ramharther M, Noedl H, Winkler H, Graninger W, Wernsdorfer WH, Kreamsner PG, Winkler S: In vitro activity and interaction of clindamycin combined with dihydroartemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:3494-3499.
15. Binder RK, Borrmann S, Adegnika AA, Missinou MA, Kreamsner PG, Kun JF: Polymorphisms in the parasite genes for pfcrt and pfmdr-1 as molecular markers for chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* in Lambarene, Gabon. *Parasitol Res* 2002, **88**:475-476.
16. Mombo-Ngoma G, Oyakhire S, Ord R, Gabor JJ, Grootelaers KC, Profanter K, Grootelaers B, Kurth F, Lell B, Kun JF, Issifou S, Roper C, Kreamsner PG, Grobusch MP: High prevalence of dhfr triple mutant and correlation with high rates of sulphadoxine-pyrimethamine treatment failures in vivo in Gabonese children. *Malar J* 2011, **10**:123.
17. Ramharther M, Kurth FM, Belard S, Bouyou-Akotet MK, Mamfoumbi MM, Agnandji ST, Missinou MA, Adegnika AA, Issifou S, Cambon N, Heidecker JL, Kombila M, Kreamsner PG: Pharmacokinetics of two paediatric artesunate

- mefloquine drug formulations in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Gabon. *J Antimicrob Chemother* 2007, **60**:1091–1096.
18. Calderaro A, Piccolo G, Perandin F, Gorrini C, Peruzzi S, Zuelli C, Ricci L, Manca N, Dettori G, Chezzi C, Snounou G: **Genetic polymorphisms influence *Plasmodium ovale* PCR detection accuracy.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:1624–1627.
  19. Oyedjeji SI, Awobode HO, Monday GC, Kendjo E, Kreamsner PG, Kun JF: **Comparison of PCR-based detection of *Plasmodium falciparum* infections based on single and multicopy genes.** *Malar J* 2007, **6**:112.
  20. Singh B, Bobogare A, Cox-Singh J, Snounou G, Abdullah MS, Rahman HA: **A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **60**:687–692.
  21. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, Do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN: **High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **61**:315–320.
  22. Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, Ndjango JB, Sanz CM, Morgan DB, Locatelli S, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Delaporte E, Mpoudi-Ngole E, Georgiev AV, Muller MN, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Rayner JC, Hahn BH: **Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas.** *Nature* 2010, **467**:420–425.
  23. Siswanto H, Russell B, Ratcliff A, Prasetyorini B, Chalfein F, Marfurt J, Kenangalem E, Wuwung M, Piera KA, Ebsworth EP, Anstey NM, Tjitra E, Price RN: **In vivo and in vitro efficacy of chloroquine against *Plasmodium malariae* and *P. ovale* in Papua, Indonesia.** *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **55**:197–202.
  24. Bassat Q: **The use of artemether-lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium vivax* malaria.** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**: e1325.
  25. Douglas NM, Anstey NM, Angus BJ, Nosten F, Price RN: **Artemisinin combination therapy for vivax malaria.** *Lancet Infect Dis* 2010, **10**:405–416.
  26. Gatti S, Gramegna M, Bisoffi Z, Raglio A, Gulletta M, Klersy C, Bruno A, Maserati R, Madama S, Scaglia M: **A comparison of three diagnostic techniques for malaria: a rapid diagnostic test (NOW Malaria), PCR and microscopy.** *Ann Trop Med Parasitol* 2007, **101**:195–204.
  27. Kreidenweiss A, Kreamsner PG, Dietz K, Mordmüller B: **In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **75**:1178–1181.
  28. Smith A, Denholm J, Shortt J, Spelman D: ***Plasmodium* species co-infection as a cause of treatment failure.** *Travel Med Infect Dis* 2011, **9**:306–309.
  29. Franken G, Müller-Stöver I, Holtfreter MC, Walter S, Mehlhorn H, Labisch A, Haussinger D, Richter J: **Why do *Plasmodium malariae* infections sometimes occur in spite of previous antimalarial medication?** *Parasitol Res.* 2012 Feb 18 Epub ahead of print.
  30. Poravuth Y, Socheat D, Rueangwearayut R, Uthaisin C, Pyae Phyo A, Valecha N, Rao BH, Tjitra E, Purnama A, Borghini-Fuhrer I, Duparc S, Shin CS, Fleckenstein L: **Pyronaridine-artesunate versus chloroquine in patients with acute *Plasmodium vivax* malaria: a randomized, double-blind, non-inferiority trial.** *PLoS One* 2011, **6**:e14501.

doi:10.1186/1475-2875-11-120

**Cite this article as:** Mombo-Ngoma et al.: Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon. *Malaria Journal* 2012 **11**:120.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



### **2.2.3 Cochrane Review und Metaanalyse pädiatrischer Darreichungsformen Artemisinin-basierter Kombinationstherapien bei Kindern mit Malaria**

*Bélarđ S, Ramharter M, Kurth F. Paediatric formulations of artemisinin-based combination therapies for treating uncomplicated malaria in children. Cochrane Database of Systematic Reviews 2020, Issue 12. Art. No.: CD009568. DOI: 10.1002/14651858.CD009568.pub2.*

Nach Einführung der ACT als Erstlinientherapie für die unkomplizierte Malaria wurden, um die ambulante Therapie junger Kinder zu verbessern, zunehmend auch pädiatrische Darreichungsformen verschiedener ACT entwickelt. Zahlreiche Studien belegen gute Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit von ACT in pädiatrischer Darreichungsform. Die angenommene Überlegenheit von ACT in pädiatrischer Darreichungsform gegenüber ACT in Tablettendarreichungsform im Sinne einfacherer Verabreichung sowie besserer Verträglichkeit und Akzeptanz bei jungen Kindern wurde in den meisten Studien nicht untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es Wirksamkeit, Sicherheit und vorallem Verträglichkeit und Akzeptanz von ACT in pädiatrischer Darreichungsform zusammenzufassen und hinsichtlich einer möglichen Überlegenheit gegenüber ACT in Tablettendarreichungsform zu untersuchen. Eingeschlossen wurden randomisiert kontrollierte Studien (RCT), die eine pädiatrische Darreichungsform einer ACT mit einer konventionellen Tabletten-Darreichungsform der gleichen ACT für die Therapie der unkomplizierten Malaria bei Kindern bis zu einem Alter von 14 Jahren evaluierten.

Drei Studien aus Afrika konnten in die Arbeit eingeschlossen werden; zwei Studien verglichen eine pädiatrische lösliche Tablette und eine Studie verglich eine Suspension mit zermörserten Tabletten der jeweils gleichen ACT. In allen drei Studien zeigte sich weder für Therapieversagen an Tag 28 noch für schwerwiegende unerwünschte Ereignisse ein Unterschied zwischen pädiatrischen und nicht-pädiatrischen Darreichungsformen. Kinder die lösliche pädiatrische Tabletten erhielten erlitten weniger Medikamenten-assoziierte unerwünschte Nebenwirkungen als Kinder die zermörserte Tabletten erhielten (RR 0.78, 95% CI 0.62 to 0.99; 1197 Studienteilnehmer). Für Kinder die lösliche pädiatrische Tabletten erhielten zeichnete sich zudem eine Tendenz zu seltenerem Medikamenten-assoziierten Erbrechen ab. Die Akzeptanz von ACT in pädiatrischer Darreichungsform wurde in keiner Studie evaluiert.

Diese Arbeit zeigte, dass für die Therapie der unkomplizierten Malaria bei Kindern ACT als pädiatrische lösliche Tablette nicht nur genauso wirksam ist wie ACT als gemörserte konventionelle Tablette, sondern bei weniger Medikamenten-assoziierten Nebenwirkungen auch besser verträglich ist.

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD009568.pub2>



## 2.2.4 Intravenöse Artesunattherapie bei Kindern mit importierter schwerer Malaria

*Bélarđ S, Brand J, Schulze-Sturm U, Janda A, von Both U, Tacoli C, Alberer M, Kempf C, Stegemann MS, Krüger R, Varnholt V, Blohm M, Reiter K, Zoller T, Suttorp N, Mall M, von Bernuth H, Gratopp A, Hübner J, Hufnagel M, Kobbe R, Kurth F. Intravenous Artesunate for Imported Severe Malaria in Children Treated in Four Tertiary Care Centers in Germany: A Retrospective Study. *Pediatr Infect Dis J.* 2019 Nov;38(11):e295-e300. doi: 10.1097/INF.0000000000002417*

Malaria gehört zu den wichtigsten Differentialdiagnosen fiebernder Kinder nach Reiserückkehr aus Malariaendemiegebieten. Bei der lebensbedrohlichen schweren Falciparum-Malaria werden die Antimalariamedikamente intravenös verabreicht. Im Jahr 2010 änderte die Weltgesundheitsorganisation die Erstlinientherapieempfehlung für schwere Malaria von intravenösem Chinin zu intravenösem Artesunat, nachdem zwei RCTs eine Reduktion der Mortalität von 22 – 35% bei mit intravenösem Artesunat behandelten Patienten in Südostasien und Afrika zeigten.

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurde intravenöses Artesunat in Nichtendemiegebieten jedoch weiterhin, aufgrund mangelnder Evidenz zur Überlegenheit bei importierter Malaria, fehlender Zulassung in Europa und fehlender GMP-konformer Präparate, nicht standardmäßig zur Therapie der schweren Malaria eingesetzt. Die Datenlage zum Einsatz von intravenösem Artesunat bei Kindern mit schwerer importierter war besonders begrenzt.

Diese retrospektive Studie untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit intravenöser Artesunattherapie bei Kindern mit importierter schwerer Malaria in Deutschland. Der Behandlungsverlauf von 14 Kindern welche 1 – 10 Gaben intravenöses Artesunat und anschließend eine orale Antimalariatherapie erhielten wurde ausgewertet. Parasitenfreiheit wurde (mit einer Ausnahme) nach 2 – 4 Tagen erreicht; intravenöses Artesunat zeigte somit eine hohe Wirksamkeit in dieser Kohorte. Ein Drittel der Kinder erlitt eine PADH, jedoch ohne Bluttransfusionsbedarf.

Diese Arbeit unterstützt den Einsatz von intravenösem Artesunat bei importierter schwerer Malaria bei Kindern.

<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002417>

### 3 Diskussion

Diese Habilitationsschrift umfasst Arbeiten welche über den Zeitraum der vergangenen 15 Jahre (2006 – 2020) durchgeführt wurden. In den fünf Jahren vor der ersten Arbeit dieser Habilitationsschrift war der Einsatz zur Eindämmung der Malaria mit großangelegten internationalen Programmen, massiven Investitionen und neuen Institutionen neu aufgelegt worden. Trotz vieler wichtiger Entwicklungen in dieser Zeit war der Fortschritt in der Umsetzung der Maßnahmen zur Eindämmung der Malaria bescheiden: Ende 2004 schliefen nur 2% der Kinder unter 5 Jahren unter Moskitonetzen, suchten nur 42% der Kinder mit Fieber eine Behandlung auf und erfolgten die meisten Malariatherapien ohne parasitologische Diagnostik und mit von der WHO nicht mehr empfohlenem Chloroquin oder Sulfadoxin-Pyrimethamin (1, 34).

Im Jahr 2005 veröffentlichte die WHO den ersten World Malaria Report (34). Dieser zeigte auf, dass die Malariamortalität mit 1 Million Todesfälle weiterhin hoch war und dass sich der Zugang zu Malariaprävention und Malariatherapie 2005 gegenüber 2000 kaum verbessert hatte (1). Es folgten weitere Programme und Investitionen und 10 Jahre später, am Ende der Ära der Millennium Development Goals, war deren Ziel, die Zunahme der Malariainzidenz bis 2015 zu stoppen und die Malaria zurückzudrängen, erreicht (1, 35).

In dieser Dekade (2005 – 2015) stellten die meisten Länder mit endemischer *P. falciparum* Malaria schrittweise ihre oralen Behandlungsempfehlungen von Monotherapien mit Chloroquin, Sulfadoxin-Pyrimethamin oder Amodiaquin auf ACT um, in Einklang mit den WHO Empfehlungen (8, 36). Auch die Therapie der schweren Malaria wurde infolge entsprechender WHO Empfehlung von 2010 (37) zunehmend Artemisinin-basiert mit intravenösem Artesunat durchgeführt.

#### 3.1 Artemisinin-basierte Kombinationstherapie bei Kindern mit Malaria in Afrika

Die Entwicklung pädiatrischer Darreichungsformen von ACT ordnet sich vorwiegend in die Zeit des zunehmenden Einsatzes von ACT ein und verfolgte das Ziel die orale Malariabehandlung junger Kinder durch bereits etablierte sowie neue ACTs zu verbessern.

Artemether/Lumefantrin gehörte zu den ersten von der WHO empfohlenen ACTs (36) und wurde in vielen afrikanischen Ländern als Erstlinientherapie eingeführt. Diese wirksame und sichere ACT war auch für Kinder ab 5 kg Körpergewicht empfohlen; für die orale 3-tägige Therapie mit insgesamt 6 Dosen standen jedoch zunächst nur Präparate in Tablettenform zur Verfügung. Zur Verabreichung von Artemether/Lumefantrin an junge Kinder wurde die Tablettenform von Artemether/Lumefantrin meist zermörsert; dies bedeutete neben einem erhöhten Zubereitungsaufwand auch eine Gefahr für Verluste bei Wirkung und Dosierung des Medikamentes (38). Die Entwicklungen und klinischen Prüfungen in den Jahren 2006/2007 von Artemether/Lumefantrin als Suspension (39) oder als lösliche Tablette (38) zeigten, dass bei Kindern mit unkomplizierter Falciparum-Malaria Wirksamkeit und Sicherheit dieser pädiatrischen Darreichungsformen mit der konventionellen zermörserten Tablettendarreichungsform vergleichbar waren. Die lösliche Tablettenform von

Artemether/Lumefantrin (Handelsname Coartem Dispersible), welche im Rahmen eines Public-private partnership zwischen Medicines for Malaria Venture und Novartis entwickelt wurde, war die erste pädiatrische ACT in löslicher Tablettenform und ist nach ihrer Einführung 2009 heute in 40 Ländern zum Selbstkostenpreis registriert (40).

Artesunat/Mefloquin gehörte ebenfalls zu den ersten von der WHO empfohlenen ACTs (36); Kinder hatten jedoch kaum Zugang zu dieser ACT da wenig pädiatrische Daten zu Verträglichkeit, Sicherheit und Pharmakokinetik vorlagen und keine pädiatrische Darreichungsform verfügbar war. In einer 2005/2006 in Gabun durchgeführten Phase IV Studie fanden wir, sowohl für eine innovative pädiatrische Granulat-Darreichungsform von Artesunat/Mefloquin als auch für Artesunat/Mefloquin in Tabletten-Darreichungsform in pädiatrischer Dosierung eine exzellente Wirksamkeit, gute Verträglichkeit und Sicherheit sowie eine pharmakokinetische Gleichwertigkeit beider Darreichungsformen (41, 42). Die Akzeptanz der Medikamentenverabreichung wurde in der Gruppe der jungen Kinder, welche die Granulat-Darreichungsform erhielten, bei 78% als „exzellent“ bewertet und spiegelt damit die erzielte Kinderfreundlichkeit der Granulat-Darreichungsform wider. Die Bewertung dieser Daten ist jedoch limitiert, da die Kinder in der Kontrollgruppe im Durchschnitt doppelt so alt waren. Weitere Studien bei afrikanischen Kindern bestätigten die gute Wirksamkeit, Verträglichkeit und Sicherheit der pädiatrischen Artesunat/Mefloquin Darreichungsform (43-45) und beendeten damit die Vorbehalte dieser ACT bei Kindern.

Die klinische Prüfung von Artesunat/Pyronaridin, eine damals neue und noch nicht zugelassene ACT, war Teil der frühen klinischen Entwicklung im Rahmen eines Public-private partnership zwischen Medicines for Malaria Venture und Shin Poong Pharmaceuticals. Pyronaridin war als Partnersubstanz für eine neue ACT aufgrund hoher antiplasmodialer Aktivität (welche wir in Lambaréné parallel zur klinischen Prüfung auch für Feldisolate in-vitro bestätigen konnten (46)), vielversprechender Sicherheit und Verträglichkeit, vorteilhaftem Dosierungsschema, sowie Kostengünstigkeit und Stabilität ausgewählt worden. Das klinische Entwicklungsprogramm sollte zur Zulassung dieser neuen fixed-dose ACT für die Behandlung der unkomplizierten Falciparum- und Vivax-Malaria führen und beinhaltete, nennenswerterweise, von Anfang an die Entwicklung einer pädiatrischen Darreichungsform (47). Die 2006 in Lambaréné an Kindern durchgeführte Phase II Dosisfindungsstudie zeigte für alle drei Dosierungsstufen eine sehr gute Wirksamkeit, Sicherheit und Verträglichkeit; die pädiatrische Granulat-Darreichungsform von Artesunat/Pyronaridin (mittlere Dosierungsstufe) zeigte sich der entsprechenden Tablettenform vergleichbar (48). In einer multizentrischen Phase III Studie bei Kindern mit Malaria, welche unter anderem auch in Lambaréné, Gabun, durchgeführt wurde, zeigte sich die dreitägige Therapie mit einmal täglich Artesunat/Pyronaridin in Granulat-Darreichungsform der dreitägigen Kontrolltherapie mit zweimal täglich Artemether/Lumefantrin als zermörserte Tabletten nicht unterlegen und vergleichbar in Sicherheit und Verträglichkeit (49). Auch weitere doppelblinde Phase III Studien belegten die hohe Wirksamkeit von Artesunat/Pyronaridin (50, 51). Eine Phase IIIB/IV Studie bei Kindern und Erwachsenen prüfte die Sicherheit von Artesunat/Pyronaridin in Tabletten- und Granulat-Darreichungsform bei wiederholter Anwendung und konnte die Bedenken bezüglich möglicher Hepatotoxizität nach wiederholter Anwendung ausräumen

(52, 53). Artesunat/Pyronaridin (Handelsname *Pyramax*) wurde dann 2015 von der European Medicines Agency (EMA) zur Anwendung bei Falciparum- und Vivax-Malaria außerhalb Europas zugelassen (52) und wurde 2017 in die Liste Essentieller Medikamente der WHO aufgenommen und von dieser zur Anwendung bei Kindern und Erwachsenen empfohlen (25). Eine Metaanalyse von 2019 mit 10 RCTs zeigte, dass Artesunat/Pyronaridin für die Behandlung der unkomplizierten Falciparum-Malaria mindestens so wirksam oder wirksamer als andere zugelassene ACTs ist, jedoch das Risiko für einen leichten Medikamenten-induzierten Leberschaden gegenüber anderen ACT erhöht ist (54).

Neben den oben beschriebenen pädiatrischen Darreichungsformen von Artemether/Lumefantrin, Artesunat/Mefloquin und Artesunat/Pyronaridin sind über die Zeit weitere pädiatrische Darreichungsformen verschiedener ACTs entwickelt worden und auf den Markt gekommen. Im Jahr 2011 zeigte eine Umfrage zur Anwendung von ACT in pädiatrischer Darreichungsform in sieben West-, Zentral- und Ostafrikanischen Ländern, dass ACTs in pädiatrischer Darreichungsform in über 80% als Erstlinientherapie bei kleinen Kindern eingesetzt wurden (55). Das Spektrum der Präparate umfasste 15 verschiedene Produkte, von welchen allerdings nur zwei von der WHO mit internationalem Qualitätsstandard präqualifiziert waren (Coartem® dispersible tablets (Artemether/Lumefantrin) und Coarsucam® dispersible tablets (Artesunat/Amodiaquin)). Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2011 zum damaligen Stand der klinischen Entwicklung und der Verfügbarkeit pädiatrischer Darreichungsformen von ACT in Subsahara-Afrika zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt alle von der WHO empfohlenen ACTs auch in pädiatrischen Darreichungsformen (als Suspension, lösliche Tablette, Sirup oder Granulat) existierten, für die meisten dieser Präparate jedoch keine Daten zu deren klinischer Entwicklung erhoben wurden oder vorlagen (56). Laut WHO verdoppelte sich der Einsatz von ACT bei Kindern unter 5 Jahren in Subsahara-Afrika von 2005 – 2011 bis 2015 – 2019 und es erhielten im Median zuletzt 80,4% eine Therapie mit ACT (1); aktuellste Daten zum Einsatz von ACT in pädiatrischer Darreichungsform stehen jedoch nicht zur Verfügung.

Interessanterweise wurden in den meisten Studien, die ACTs in pädiatrischer Darreichungsform prüften, die angenommenen Vorteile pädiatrischer Darreichungsformen nicht direkt evaluiert. In einer Metaanalyse von 2010 mit 2515 Kindern aus sieben Studien, konnten wir erstmals zeigen, dass die Verträglichkeit von ACT in pädiatrischer Darreichungsform der Verträglichkeit von ACT in konventioneller Tablettenform überlegen war; Kinder die ACT in pädiatrischer Darreichungsform erhielten erlitten signifikant weniger häufig medikamenten-induziertes Erbrechen (RR 0.78, 95% CI 0.61-0.99) und medikamenten-induzierte Magendarmbeschwerden (RR 0.36, 95% CI 0.15-0.85) (15). Diese Arbeit erbrachte zwar einen ersten Hinweis auf eine tatsächlich verbesserte orale Behandlung durch pädiatrische Darreichungsformen, die Aussagekraft war jedoch durch den Einschluss von nicht-RCT Studien und Studien, welche eine pädiatrische Darreichungsform gegen eine nicht-pädiatrische Darreichungsform unterschiedlicher ACTs prüften, eingeschränkt.

Der Cochrane Review mit Metaanalyse von 2020 fasst die Evidenz möglicher Vorteile pädiatrischer Darreichungsformen von ACT unter strikteren Einschlusskriterien und 10 Jahre später erneut zusammen (14). Um allein die Effekte der Darreichungsform zu erfassen,

wurden nur randomisiert kontrollierte Studien eingeschlossen, welche eine pädiatrische Darreichungsform gegen eine nicht-pädiatrische Darreichungsform der gleichen ACT evaluierten. Nur drei Studien erfüllten die Einschlusskriterien und nur zwei konnten für die Metaanalyse berücksichtigt werden. Die Ergebnisse bestätigten die vorausgehenden Ergebnisse für ACT in pädiatrischer Darreichungsform als lösliche Tablette; Kinder, welche die pädiatrische lösliche Tablette (Artemether/Lumefantrin und Dihydroartemisinin/Piperaquin) erhielten hatten weniger medikamenten-assoziierte Nebenwirkungen (RR 0.78, 95% CI 0.62 to 0.99) und weniger medikamenten-assoziiertes Erbrechen (RR 0.75, 95% CI 0.56 to 1.01) als Kinder, welche die gleiche ACT als gemörserte Tablette erhielten. Die bessere Verträglichkeit pädiatrischer Darreichungsformen verspricht eine bessere Behandlungssadhärenz sowie Dosierungsgenauigkeit und damit eine verbesserte ambulante Therapie; es obliegt zukünftigen Studien die angenommene verbesserte ambulante Therapie unter realen Bedingungen zu verifizieren (14). Die niedrige Anzahl an Studien mit adäquatem Studiendesign um die Vorteile von ACT in pädiatrischer Darreichungsform zu evaluieren, steht in großer Diskrepanz zur Bedeutung einer für Kleinkinder optimierten Malariatherapie.

Die Arbeit zum Einsatz von ACT bei Non-Falciparum Malaria und Malariamischinfektionen verstand sich als Grundlage für den effektiven und sicheren Einsatz von ACT jenseits der Falciparum-Malaria. Der Großteil der weltweiten Forschung konzentrierte sich auf die potentiell lebensbedrohliche Falciparum-Malaria und in zunehmendem Maße auch auf die Vivax-Malaria. Die humanpathogenen Plasmodienspezies *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisii* oder *P. malariae*, welche in der Regel milde Malariaverläufe mit niedrigen Parasitämien verursachen, fanden in der Malariaforschung nur wenig Beachtung. In Endemiegebieten sind gleichzeitige Infektionen mit verschiedenen Plasmodienspezies und/oder verschiedenen Genotypen einer Plasmodienspezies nicht selten; Komplexität und Interaktionen zwischen Spezies und Genotypen sowie Spezies- und Genotypen-abhängiger Immunantwort von Malaria und auch anderen parasitologischen Koinfektionen auf den Krankheitsverlauf sind noch nicht vollständig verstanden (57, 58).

Zur Zeit der Arbeit zu ACT bei Non-Falciparum Malaria und Malariamischinfektionen (2008 – 2010) (59) war es in Gabun gängige Praxis die Non-Falciparum Malaria mit ACT zu behandeln, obwohl Chloroquin empfohlenes Medikament der Wahl war und ohne dass klinische Studien die Wirksamkeit und Sicherheit von ACT für Non-Falciparum Malaria belegten. Die gängige Praxis ergab sich unter anderem aus der diagnostischen Herausforderung der mikroskopischen Speziesbestimmung und der vorliegenden hohen Chloroquinresistenz bei *P. falciparum*; Diagnosefehler mit daraus resultierender Chloroquinbehandlung chloroquinresistenter potentiell lebensbedrohlicher Falciparum-Malaria hätten fatal enden können. Die prospektive Studie in Gabun zeigte mit einer Blutstadien-Heilungsrate von 100% an Tag 28 eine exzellente Wirksamkeit von Artemether/Lumefantrin bei unkomplizierter Malaria von *P. malariae*, *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisii* oder Mischinfektion mit *P. falciparum* bei pädiatrischen und erwachsenen Patienten. Diese ersten systematischen prospektiven Daten zu ACT bei unkomplizierter Malaria durch *P. malariae*, *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisii* oder Mischinfektion mit *P. falciparum* unterstützten somit die gängige Praxis

Blutstadien der Non-Falciparum Malaria, Malariamischinfektionen oder Malariafälle ohne Speziesdifferenzierung mit Artemether/Lumefantrin zu behandeln.

Eine aus der Studie folgende Arbeit zur Spezies- und Genotypen-Diversität (60) untersuchte molekulargenetisch die Komplexität der Plasmodieninfektionen der Patienten mit mikroskopisch diagnostizierter Non-falciparum Malaria oder Malariamischinfektion oben diskutierter Studie (59). Die diagnostische Wertigkeit der Mikroskopie ist für die Detektion von Mischinfektionen, insbesondere bei niedrigen Parasitämien, begrenzt und Infektionen mit verschiedenen Genotypen der gleichen Spezies lassen sich mikroskopisch nicht identifizieren. Mittels next generation sequencing (NGS) können Mischinfektionen unterschiedlicher Spezies sowie Mehrfachinfektionen derselben Spezies mit hoher Auflösungskapazität identifiziert werden (61). Mittels NGS wurde eine hohe Prävalenz an Mehrfachinfektionen und Mischinfektionen identifiziert; es fanden sich in Patientenproben bis zu 4 verschiedene Spezies (*P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, und *P. ovale wallikeri*) und multiple Genotypen einzelner Spezies in über einem Drittel der Proben (60). Die besonders hohe Anzahl an Mehrfachinfektionen bei *P. malariae*, *P. ovale curtisi*, und *P. ovale wallikeri* deutete auf eine unterschätzte Krankheitslast durch Non-Falciparum Malaria hin. Eine spätere PCR-basierte Querschnittsstudie in Gabun fand auch in überwiegend gesunden Teilnehmern eine hohe Prävalenz von Mischinfektionen durch verschiedene Plasmodienspezies und zusätzlich häufige Koinfektionen mit Filarien (62). Klärung und Verständnis der Interaktionen zwischen Parasiten und zwischen Parasit und Wirt stellt eine multidisziplinäre Herausforderung dar; die zugrundeliegende Komplexität unterstreicht mögliche Auswirkungen von Kontrollprogrammen für einzelne Parasiten auf koendemische Parasitenerkrankungen (63). Die Ergebnisse der hohen Wirksamkeit von ACT bei Non-Falciparum wurden später durch eine weitere prospektiven Studie an 72 Patienten mit Non-Falciparum oder Malariamischinfektionen in Gabun bestätigt; Artemether/Lumefantrin erzielte eine hohe Heilungsrate (> 90%) an Tag 42 sowohl für die einzelnen Spezies als auch für Mischinfektionen (64). Auch wenn *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisii* sowie *P. malariae* weiterhin als generell chloroquinempfindlich gelten, änderten sich 2015 die Behandlungsempfehlungen der WHO; die Erstlinientherapie für Blutstadien der unkomplizierten Malaria durch *P. ovale wallikeri*, *P. ovale curtisii* sowie *P. malariae* in Gegenden mit chloroquinempfindlichen Parasiten ist nun ACT oder Chloroquin und in Gegenden mit chloroquinresistenten Parasiten ACT (8). Die leitlinienkonforme einheitliche Behandlung aller Malariaformen mit ACT vereinfacht nicht nur die Therapie der Malaria sondern macht sie auch sicherer.

Der umfassende Ersatz der alten und großteils unwirksam gewordenen Malariamedikamente durch ACT trug wesentlich zum weltweiten Rückgang der Malaria-assoziierten Morbidität und Mortalität bei. Für die der neuartigen Artemisinin-basierten Malariatherapie zugrundeliegenden Entdeckungen wurde die chinesische Forscherin Tu Youyou 2015 mit dem Medizinnobelpreis geehrt (24).

### **3.2 Artemisinin-basierte Therapie der importierten Malaria bei Kindern**

Während die Artemisinin-basierte Malariatherapie im Zeitraum der Arbeiten dieser Habilitationsschrift zum praktisch alternativlosen Pfeiler der Malariabehandlung in

Endemiegebieten wurde, erfolgte der zunehmende Einsatz Artemisinin-basierter Malariatherapie zur Behandlung der importierten Malaria in Europa und Deutschland nur zögerlich. Hindernis für die Etablierung von intravenösem Artesunat als Erstlinientherapie der schweren importierten Malaria war nicht nur der Mangel an Behandlungsdaten für Patienten in Nichtendemiegebieten sondern auch der Mangel eines zugelassenen GMP-konformen Artesunatpräparates; zudem erregten Berichte über pathophysiologisch unverstandene späte Hämolyse nach intravenösem Artesunat bei nicht-immunen Patienten Besorgnis. Die Arbeit dieser Habilitationsschrift zu Artemisinin-basierter Malariatherapie bei importierter Malaria in Deutschland fokussierte sich auf den Gewinn an Behandlungsdaten zu intravenösem Artesunat bei Kindern mit schwerer importierter Malaria und Daten zu später Hämolyse nach intravenöser Artesunattherapie (65).

Die retrospektive Studie zu intravenösem Artesunat bei Kindern mit schwerer importierter Malaria in Deutschland zeigte, wie erwartet, eine hohe Wirksamkeit von Artesunat; die Patienten waren rasch parasitenfrei und die meisten konnten innerhalb einer Woche entlassen werden (65). Zum Zeitpunkt der Studie war die Datenlage zu intravenösem Artesunat bei Kindern mit importierter Malaria mangelhaft; abgesehen von einem Letter to the Editor zu intravenösem Artesunat bei 29 Kindern in Frankreich und ebenfalls guten Therapieergebnissen (66) waren nur vereinzelte Fallberichte mit oft kombinierten intravenösen Therapien verfügbar. In Reaktion auf die aktuelle Studie, erschien ein weiterer Letter to the Editor mit Behandlungsdaten zu 19 Kindern in Italien mit schwerer importierter Malaria und intravenöser Therapie mit Artesunat kombiniert mit Chinin und vergleichbaren Behandlungsergebnissen (67). Alle Patienten der beiden Fallserien aus Frankreich (66) und Italien (67) sowie alle Patienten unserer Studie aus Deutschland (65) waren afrikanischen Ursprungs. Reisende mit Migrationshintergrund welche in ihre Heimatländer reisen um Freunde und Familie zu besuchen (VFR) haben ein erhöhtes Risiko für importierte Malaria (68, 69) unter anderem aufgrund von Aufhalten in Gebieten mit höherem Infektionsrisiko, längeren Aufhalten und geringerer Anwendung prophylaktischer Maßnahmen (70). Kinder von Eltern mit Migrationshintergrund aus Malariaendemiegebieten und welche selbst nie in Malariaendemiegebieten gelebt haben scheinen ein besonders hohes Risiko für schwere Malaria zu haben (65); bei Erwachsenen mit Migrationshintergrund aus Malariaendemiegebieten ist das Risiko für eine schwere importierte Malaria möglicherweise mit dem Rückgang einer vor Migration erworbenen Immunität verbunden (71). Niedrige Adhärenz bei Reiseempfehlungen, inklusive Malariaprophylaxe, vorallem bei VFR Kindern und Erwachsenen (72), untermauern den Bedarf an gezielten Strategien um in besonders vulnerablen Kohorten reiseassoziierte Risiken zu reduzieren.

In der retrospektiven Studie zu intravenösem Artesunat bei Kindern mit schwerer importierter Malaria in Deutschland erlitt ein Drittel der Kinder eine späte, jedoch nicht transfusionspflichtige, Hämolyse (PADH) (65). Das Phänomen der späten Hämolyse (post-artemisinin delayed hemolysis, PADH) wurde erstmals in einer Fallserie aus Deutschland als verzögerte Nebenwirkung nach intravenöser Artesunattherapie bei schwerer importierter Malaria beschrieben (73); bei nicht-immunen Patienten kam es zu einem teils transfusionsbedürftigen Hämoglobinabfall bei gleichzeitigem Auftreten von



Hämolyseparametern. Seither folgten weitere Berichte über PADH aus verschiedenen Ländern und Kontinenten (71, 74, 75). Auch bei afrikanischen Kindern wurde schließlich PADH beobachtet, mit jedoch seltenerer Häufigkeit und milderem Verläufen (76-78). Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist weiterhin nicht geklärt; eine kürzere Lebensdauer und ein Zerfall ehemals infizierter Erythrozyten (once infected erythrocytes, oi-E) nach der Therapie (79, 80) oder auch Medikamenten-induzierte Immunreaktionen (81) wurden als mögliche Erklärungen der PADH vorgeschlagen. Bei den pädiatrischen Patienten in Italien trat eine nicht transfusionspflichtige Hämolyse nur bei einem von 19 Patienten auf. Das seltenere Vorkommen von PADH in der Studie aus Italien (5% versus 30%) ist möglicherweise durch die niedrigere mediane Parasitämie in der italienischen Kohorte (3% versus 9,5%) zu erklären (67); in der Studie aus Deutschland trat eine späte Hämolyse vorallem bei jungen Kindern mit höheren Parasitämien auf (65). Diese Daten zu PADH bei Kindern unterstreichen die Wichtigkeit der aktiven Nachsorge auch von pädiatrischen Patienten nach intravenöser Artesunattherapie schwerer importierter Malaria.

In einer Studie zu PADH bei Kindern und Erwachsenen nach oraler Artemisinin-basierter Therapie bei unkomplizierter importierter Malaria in Berlin fanden sich bei einem Drittel der Patienten verzögerte hämolytische Ereignisse (82). Ein damit verbundener Hämoglobinabfall war jedoch nur bei kaukasischen Patienten zu beobachten, afrikanische Patienten kompensierten den Hämoglobinabfall mit gesteigerter Erythropoese. Zu beobachten war auch ein geringerer Hämoglobinabfall während der Therapie bei Patienten mit verzögerter Hämolyse und Hämoglobinabfall nach der Therapie. Diese Beobachtungen könnten darauf schließen lassen, dass eine kompensatorische Erythropoese von vorausgehenden Malariainfektionen und Herkunft abhängen könnte und dass durch oi-E der Hämoglobinverlust bis nach die akute Erkrankungsphase verzögert wird (82). In dieser Studie zeigte keines der drei Kinder eine hämolytische Aktivität (82); eine Studie aus Nigeria berichtet jedoch über Hämatokritabfall 14 – 28 Tage nach ACT bei unkomplizierter Malaria bei einem Viertel der pädiatrischen Patienten (83). Auch wenn in dieser Studie (68) keine transfusionsbedürftige Hämolyse auftrat, sind seitdem schwere und transfusionspflichtige Hämolysen nach oraler ACT beschrieben worden (84). Eine Nachsorge mit Blutbildkontrollen zum Ausschluss einer Hämolyse bei Malariapatienten nach oraler ACT, analog der Nachsorge von Patienten nach intravenöser Artesunattherapie (22), ist bisher nicht Bestandteil von Leitlinien, wird jedoch für Patienten mit hohen Parasitämien diskutiert (85).

Die Studie zu intravenöser Artesunattherapie bei Kindern mit schwerer importierter Malaria in Deutschland (65) stellt bisher die einzige Originalarbeit mit Behandlungsdaten für diese Kohorte dar und unterstützt dessen Anwendung; die Datenlage, insbesondere auch für Kinder nicht afrikanischer Abstammung, bleibt daher weiter dünn. Neben dem Gewinn an Behandlungsdaten stellen die Zulassung von intravenösem Artesunat für die Therapie der schweren Malaria bei Erwachsenen und Kindern in den USA durch die Food and Drug Administration (FDA) (86) sowie die Erteilung des Orphan-Drug-Status von intravenösem Artesunat in der Europäischen Union durch die EMA (87) im Jahr 2020 wichtige Schritte für den Abbau der Hürden einer intravenösen Artesunattherapie ausserhalb von Malariaendemiegebieten dar.

### 3.3 Prävention der Malaria im Kindesalter durch Impfung

Zur Zeit der Phase I Studie des Malariaimpfstoffkandidaten GMZ2 im Jahr 2008 (88), befanden sich zahlreiche weitere Malariaimpfstoffkandidaten in den verschiedenen Phasen präklinischer und klinischer Entwicklung. Der begrenzte Erfolg der Malariaelimination durch vektorgerichtete, chemopräventive und therapeutische Maßnahmen bestärkte die Bestrebungen einen wirksamen Malariaimpfstoff zu entwickeln. Ein potentieller effektiver Malariaimpfstoff erhielt in der Konzeption erfolgreicher Programme zur Eindämmung und Elimination der weltweiten Malaria zunehmende Bedeutung. Erstes Ziel eines Zweistufenplans zur Malariaimpfstoffentwicklung sah bis 2015 die Entwicklung eines für Kinder zugelassenen Malariaimpfstoffs vor, welcher über 50% Schutz vor schwerer Malaria und Tod durch Malaria sowie eine Schutzdauer von über einem Jahr aufweisen sollte (89). Herausforderungen wie der komplexe Lebenszyklus und die Antigendiversität des Parasiten, ungeklärte Mechanismen protektiver Immunität oder das Fehlen von Surrogatmarkern für Malariaimmunität, erschwerten die Entwicklung eines hochwirksamen Malariaimpfstoffes (90).

Die Malariaimpfstoffentwicklung verfolgt verschiedene Strategien: i) Transmission-blockierende Impfung mit Hemmung der Parasitenentwicklung im Mückenvektor und ohne immunisierenden Effekt für den Impfling und ii) Impfung zur Reduktion der Parasitenlast im Impfling mit direktem Effekt für den Impfling durch Hemmung der Parasitenentwicklung entweder in der Leber (prä-erythrozytärer Impfansatz) oder im Blut (Blutstadien Impfansatz) (90). Ein weiterer prä-erythrozytärer Impfansatz zielt auf Immunisierung durch attenuierte Sporozoiten ab (91).

Impfansätze zur Hemmung der Blutstadien zielen auf extra-erythrozytär exprimierte Oberflächenantigenen des Parasiten oder parasitierter Erythrozyten. GLURP und MSP3, beides Oberflächenantigene von *P. falciparum*, wurden als Zielstrukturen natürlich erworbener Immunität identifiziert (92, 93); Antikörper gegen GLURP und MSP3 korrelierten mit protektiver Immunität für Malaria (90). GMZ2 wurde als rekombinantes Protein aus GLURP und MSP3 entwickelt mit dem Ziel natürlich erworbene Immunität zu imitieren. Die klinische Entwicklung von GMZ2 begann 2006 im Rahmen eines European and Developing Countries Clinical Trials Partnership (EDCTP) geförderten GMZ2 Consortiums besetzt aus dem African Malaria Network Trust und weiteren afrikanischen und europäischen Forschungsinstituten. In einer ersten Phase I Dosisescalations-Studie bei 30 Malaria-naiven gesunden Europäern zeigten 3 Gaben GMZ2 (mit Aluminiumhydroxid-Adjuvanz) eine Induktion und Persistenz Antigen-spezifischer Antikörper und B-Gedächtniszellen über die Studiendauer von einem Jahr sowie ein gutes Sicherheitsprofil (94). Auch eine folgenden doppelblinde randomisiert kontrollierte Phase I Studie bei Malaria-exponierten Probanden in Lambaréné, Gabun, zeigte für GMZ2 mit Aluminiumhydroxid-Adjuvanz eine gute Sicherheit sowie Verträglichkeit und auch eine Immunogenität mit Boosterung der Baseline IgG gegen die Impfantigene im Interventionsarm (95).

Die in diese Schrift eingebundene doppelblinde randomisiert kontrollierte Phase I Studie bei Kindern in Gabun zeigte nach den vorausgegangenen Phase I Studien bei Erwachsenen nun auch für die Zielpopulation des Impfstoffes eine gute Sicherheit und Verträglichkeit dreimaliger GMZ2 Immunisierung in 30µg und 100µg Dosierung (88). Die lokalen und systemische Impfreaktionen während der Impfphase waren vorwiegend mild; drei Grad 3 systemische Impfreaktionen mit Fieber > 39°C (ein Fall je Studienarm) standen in Relation mit Atemwegsinfekten. Unerwünschte Ereignisse waren mild oder moderat und wurden sämtlich als nicht mit der Impfung assoziiert bewertet. Die zwei schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse im GMZ2 30 µg Studienarm (schwere Malaria und Hospitalisierung bei Fieber zur Diagnostik) waren im Verlauf vollständig regredient und wurden nicht mit der Impfung assoziiert. GMZ2 induzierte eine robuste Immunantwort in der Zielpopulation. Die Konzentration sowie area under the curves (AUCs) der Antikörper gegen GMZ2, GLURP und MSP3 waren vor Impfung in allen drei Gruppen niedrig und zeigten nur nach GMZ2 Impfung einen Anstieg. Ein Jahr nach Impfung waren die Antikörperkonzentrationen jedoch bei Kindern im Kontrollarm und im GMZ2 100µg Arm gleich, bei Kindern des GMZ2 30µg Arms waren die Antikörperkonzentrationen 1,2 (1,1-4,2)-fach höher als bei Kindern des Kontrollarms. Ein Rückgang der antigenspezifischen IgG Konzentrationen nach einem Jahr war bei den Malaria-naiven Probanden der Studie in Tübingen (94) nicht gesehen worden; in der Kinderstudie waren die Konfidenzintervalle jedoch weit und die Fallzahl klein. Die B-Gedächtniszellantwort stieg zwar im Verlauf der Impfungen in den GMZ2 Studienarmen an, ein Anstieg von GMZ2-spezifischen B-Gedächtniszellen war jedoch bei mehreren Kindern einen Monat nach der letzten Impfung nicht mehr zu sehen. Andere Dosierungs- oder Verabreichungsschemata oder alternative Adjuvantien könnten die Dauer der Immunantwort möglicherweise verstärken und verlängern (88). Auch Helminthosen können die immunologische Impfantwort beeinflussen, wie es die Studie in Gabun für *Trichuris trichiura* zeigte (96). Antikörperantworten auf GMZ2 waren 3,4-fach höher in *T. trichiura* negativen Kindern im Vergleich zu *T. trichiura* positiven Kindern.

Die biologische Aktivität der impfinduzierten Antikörper von GMZ2 gegenüber *P. falciparum* konnte an Serumproben der drei Phase I Studien gezeigt werden (97). In einer multizentrischen doppelblinden randomisiert kontrollierten Phase II Studie mit 1849 afrikanischen Kindern zeigte GMZ2 mit Aluminiumhydroxid-Adjuvanz in den ersten sechs Monaten nach Impfung eine Impfwirksamkeit gegenüber klinischer Malaria von 14% (95% KI: 3.6%, 23%) und gegenüber schwerer Malaria von 27% (95% CI -44%, 63%) (98). Auch wenn die Impfwirksamkeit niedrig ausfiel, war GMZ2 immerhin der erste Blutstadien-Malariaimpfstoffkandidat mit überhaupt messbarer Schutzwirkung (90). Die Wirksamkeit von GMZ2 mit Aluminiumhydroxid-Adjuvanz sowie Liposom-basiertem GMZ2 wurde in einer weiteren doppelblinden randomisiert kontrollierten Studie bei 50 gesunden Malaria-exponierten Probanden in Lambaréné mittels kontrollierter humaner Malariainfektion (controlled human malaria infection, CHMI) überprüft ohne dass sich für GMZ2 ein protektiver Effekt zeigte (99). Die niedrige Wirksamkeit von GMZ2 ist möglicherweise auf die hohe Variabilität von GLURP zurückzuführen (100). Nach der Enttäuschung von GMZ2, sowie auch anderen Blutstadienimpfstoffkandidaten, richten sich die Bestrebungen nun auf die

Identifizierung neuer Blutstadienimpfstoffantigene oder Weiterentwicklung bereits vorhandener Zielstrukturen (101).

Während sich GMZ2 damals noch in einer sehr frühen Phase der klinischen Entwicklung befand, beflügelten kurz zuvor veröffentlichte vielversprechende Daten zur Sicherheit und Wirksamkeit des in der klinischen Prüfung am weitesten vorangeschrittenen Malariaimpfstoffkandidaten RTS,S, ein auf *P. falciparum* ausgerichteter prä-erythrozytärer Impfstoffkandidat, die Aussichten auf die zukünftige Verfügbarkeit eines wirksamen Malariaimpfstoffes (102). Phase III Studien zu RTS,S wurden 2014 abgeschlossen und RTS,S zeigte nach viermaliger Verabreichung eine partielle Immunität gegen klinische Malaria von 36% (95% KI: 32 – 41) und gegen schwere Malaria von 32% (95% KI: 14 – 47) bei 5 – 17 Monate alten Kindern über eine Nachbeobachtungszeit von 48 Monaten (28). 2015 wurde RTS,S (Handelsname Mosquirix) von der EMA zur Zulassung empfohlen (103); in Pilotimplementierungsprogrammen in Afrika wird der Schutz von RTS,S nun unter Alltagsbedingungen überprüft um Entscheidungsgrundlagen für seine Einführung in zukünftige nationale Impfprogramme zu schaffen (104).

Neueste vielversprechende Ergebnisse stammen von einem innovativen Impfansatz: direkte venöse Inokulation von *P. falciparum* Sporozoiten (PfSPZ-CVac) verhinderte bei 9 von 9 (100%) Malaria-naiven Probanden mit Chloroquin-Chemoprophylaxe eine Malariainfektion nachdem diese sich einer kontrollierten humanen Malariainfektion (CHMI) unterzogen hatten (91).

#### **4 Zusammenfassung**

Trotz mehr als 100 Jahre andauernden Anstrengungen die Malaria einzudämmen, zu eliminieren oder gar zu eradizieren, bleibt die Malaria eine Bedrohung für die Gesundheit von Millionen von Menschen in tropischen und subtropischen Ländern der Welt. Die Artemisinin-basierte Malariatherapie konnte die ersten durch Medikamentenresistenzen bedingten Rückschläge der Malariakontrollprogramme wieder ausgleichen und stellt mit hoher Wirksamkeit und guter Verträglichkeit seit über 10 Jahren das Rückgrat in der Therapie der unkomplizierten und komplizierten Falciparum-Malaria dar. Die Therapiestudie zu ACT bei Patienten mit Non-Falciparum Malaria und Malariamischinfektionen in Gabun zeigte, dass ACT auch eine wirksame Therapie gegen die Blutstadien der Non-Falciparum Malaria ist.

Malaria in Hochendemiegebieten betrifft vorallem junge Kinder. ACT in pädiatrischer Darreichungsform wurde entwickelt um die ambulante Malariatherapie bei jungen Kindern zu verbessern. Studien zu pädiatrischen Darreichungsformen bereits zugelassener ACT und der neuen noch nicht zugelassenen ACT Artesunat/Pyronaridin zeigten für die pädiatrischen Darreichungsformen eine den konventionellen Tabletten-Darreichungsformen vergleichbare Wirksamkeit und gleichwertige Pharmakokinetik. Die Cochrane Metaanalyse zeigte, dass Kinder mit unkomplizierter Malaria die mit einer pädiatrischen ACT in Form einer löslichen Tablette behandelt werden weniger Medikamenten-assoziierte Nebenwirkungen und weniger Medikamenten-induziertes Erbrechen erleiden als Kinder, welche die gleiche ACT in Form zermörserter Standardtabletten erhalten. Für die meisten der weiteren verfügbaren ACT Präparate in pädiatrischer Darreichungsform sind keine Daten vorhanden, welche deren

angenommene verbesserte orale Verabreichung bei Kleinkindern evaluieren. Eine Verbesserung der ambulanten Therapie der unkomplizierten Malaria bei jungen Kindern erscheint durch pädiatrische ACT in löslicher Tabletten-Darreichungsform möglich, ob dies unter Alltagsbedingungen zutrifft ist aber nicht belegt.

Die Therapie der schweren Malaria mit intravenösem Artesunat führt zu einem Überlebensvorteil gegenüber Chinin. Mangels Behandlungsdaten zu intravenösem Artesunat bei importierter Malaria und eines zugelassenen sowie GMP-konformen Präparats, etablierte sich intravenöses Artesunat in Europa und Deutschland nur zögerlich zur Standardtherapie der schweren importierten Malaria. Die Studie zu schwerer importierter Malaria bei Kindern in Deutschland zeigte eine hohe Wirksamkeit und Sicherheit von intravenösem Artesunat. Ein Drittel der Kinder zeigte eine nicht-transfusionspflichtige späte Hämolyse, eine bekannte und erstmals bei erwachsenen Reiserückkehrern beschriebene Nebenwirkung von intravenösem Artesunat. Die Pathophysiologie der späten Hämolyse nach Therapie mit Artemisinin-Derivaten ist bisher noch nicht vollständig geklärt.

Nach jahrzehntelanger Malariainfektstoffentwicklung gelang 2015 mit der Zulassung von RTS,S für Kinder in Endemiegebieten ein erster Durchbruch. Inwieweit die protektive Teilimmunität dieses auf prä-erythrozytäre Parasitenstadien gerichteten Impfstoffes, welcher aktuell nur im Rahmen von Pilot-Implementierungsprogrammen eingesetzt wird, zur Eindämmung der Malaria beitragen kann wird sich zeigen müssen. GMZ2, ein auf erythrozytäre Parasitenstadien gerichteter Malariainfektstoffkandidat, zeigte in der frühen klinischen Entwicklung, und so auch in der Phase I Studie bei afrikanischen Kindern in Gabun, vielversprechende Immunogenität und Sicherheit. Wie bei vielen weiteren Impfstoffkandidaten vermittelten die in der frühen klinischen Entwicklung von GMZ2 gemessenen Immunantworten jedoch in späteren Wirksamkeitsstudien keinen Schutz vor klinischer Malaria.

Den vielen erfolgreichen Innovationen und Fortschritten bei der weltweiten Eindämmung der Malaria stehen neue Herausforderungen und Bedrohungen, wie die Ausbreitung Artemisinin-resistenter *P. falciparum* Stämme oder der im Zuge rückläufiger Transmissions-Intensitäten einsetzende zu erwartende epidemiologische Wandel der Malaria bevor.

„... die Eradikation der Malaria bis 2050 ist ein kühnes aber erreichbares Ziel.“ (105)

## 5 Literaturangaben

1. World Health Organization. World Malaria Report 2020. Geneva, 2020.
2. Robert Koch Institut. Epidemiologisches Bulletin 28. November 2019 / Nr. 48. Zugriff am: 22.01.2021. Verfügbar unter: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/48\\_19.html](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2019/Ausgaben/48_19.html).
3. Brejt JA, Golightly LM. Severe malaria: update on pathophysiology and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(5):413-8.
4. Rowe JA, Claessens A, Corrigan RA, Arman M. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e16.
5. Adams Y, Kuhnrae P, Higgins MK, Ghumra A, Rowe JA. Rosetting Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind to human brain microvascular endothelial cells in vitro, demonstrating a dual adhesion phenotype mediated by distinct P. falciparum erythrocyte membrane protein 1 domains. *Infect Immun.* 2014;82(3):949-59.
6. Rahimi BA, Thakkestian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokeyindachai W. Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900. *Malar J.* 2014;13:481.
7. Kotepui M, Kotepui KU, Milanez GD, Masangkay FR. Prevalence of severe Plasmodium knowlesi infection and risk factors related to severe complications compared with non-severe P. knowlesi and severe P. falciparum malaria: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty.* 2020;9(1):106.
8. World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria 3rd Edition. Geneva, 2015.
9. Danwang C, Bigna JJ, Nzalie RNT, Robert A. Epidemiology of clinical congenital and neonatal malaria in endemic settings: a systematic review and meta-analysis. *Malar J.* 2020;19(1):312.
10. Ashley EA, Poespoprodjo JR. Treatment and prevention of malaria in children. *Lancet Child Adolesc Health.* 2020;4(10):775-89.
11. D'Acremont V, Kilowoko M, Kyungu E, Philipina S, Sangu W, Kahama-Marro J, et al. Beyond malaria--causes of fever in outpatient Tanzanian children. *N Engl J Med.* 2014;370(9):809-17.
12. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen IC, Gomes E, Seni A, Chhaganlal KD, et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet.* 2010;376(9753):1647-57.
13. Warrel D, Gilles H. (Eds.). *Essential Malariology.* 4th Edition. 2002. CRC Press.
14. Belard S, Ramharter M, Kurth F. Paediatric formulations of artemisinin-based combination therapies for treating uncomplicated malaria in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;12:CD009568.
15. Kurth F, Belard S, Adegnika AA, Gaye O, Kreamsner PG, Ramharter M. Do paediatric drug formulations of artemisinin combination therapies improve the treatment of children with malaria? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(2):125-32.
16. Das S, Muleba M, Stevenson JC, Pringle JC, Norris DE. Beyond the entomological inoculation rate: characterizing multiple blood feeding behavior and Plasmodium falciparum multiplicity of infection in Anopheles mosquitoes in northern Zambia. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):45.

17. European Centre for Disease Prevention and Control. Malaria - Annual Epidemiological Report for 2018. Zugriff am: 09.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/malaria-annual-epidemiological-report-2018>.
18. Rodulfo H, De Donato M, Mora R, Gonzalez L, Contreras CE. Comparison of the diagnosis of malaria by microscopy, immunochromatography and PCR in endemic areas of Venezuela. *Braz J Med Biol Res.* 2007;40(4):535-43.
19. Abba K, Deeks JJ, Olliaro P, Naing CM, Jackson SM, Takwoingi Y, et al. Rapid diagnostic tests for diagnosing uncomplicated *P. falciparum* malaria in endemic countries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(7):CD008122.
20. Frickmann H, Wegner C, Ruben S, Behrens C, Kollenda H, Hinz R, et al. Evaluation of the multiplex real-time PCR assays RealStar malaria S&T PCR kit 1.0 and FTD malaria differentiation for the differentiation of Plasmodium species in clinical samples. *Travel Med Infect Dis.* 2019;31:101442.
21. Roth JM, Korevaar DA, Leeflang MM, Mens PF. Molecular malaria diagnostics: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(2):87-105.
22. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit e.V. Leitlinie Malaria (2016). Zugriff am: 09.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.dtg.org/index.php/empfehlungen-und-leitlinien/leitlinien.html>.
23. Kitz C, Bélard S, Bialek R, Kobbe R, Pfeil J. Malaria. (2018) In: DGPI - Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie; Berner, Reinhard; Bialek, Ralf; Forster, Johannes; Härtel, Christoph; Heininger, Ulrich; Huppertz, Hans-Iko; Liese, Johannes G; Nadal, David; Simon, Arne. DGPI Handbuch Infektionen bei Kindern und Jugendlichen (7., vollständig überarbeitete Auflage). Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S. 604-613.
24. The Nobel Prize. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2015. Zugriff am: 21.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2015/summary/>.
25. World Health Organization. The use of artesunate-pyronaridine for the treatment of uncomplicated malaria. 2019. Zugriff am: 09.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-GMP-2019.13>.
26. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, Day N, White N, South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial g. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet.* 2005;366(9487):717-25.
27. Partnership A-S. Effectiveness of seasonal malaria chemoprevention at scale in west and central Africa: an observational study. *Lancet.* 2020;396(10265):1829-40.
28. RTS,S Clinical Trials Partnership. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet.* 2015;386(9988):31-45.
29. Gatton ML, Chaudhry A, Glenn J, Wilson S, Ah Y, Kong A, et al. Impact of Plasmodium falciparum gene deletions on malaria rapid diagnostic test performance. *Malar J.* 2020;19(1):392.
30. Kayiba NK, Yobi DM, Tshibangu-Kabamba E, Tuan VP, Yamaoka Y, Devleeschauwer B, et al. Spatial and molecular mapping of Pfcy13 gene polymorphism in Africa in the era of emerging Plasmodium falciparum resistance to artemisinin: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2020.
31. Hemingway J, Ranson H, Magill A, Kolaczinski J, Fornadel C, Gimnig J, et al. Averting a malaria disaster: will insecticide resistance derail malaria control? *Lancet.* 2016;387(10029):1785-8.
32. Arora T, Sharma S. Global scenario of counterfeit antimalarials: A potential threat. *J Vector Borne Dis.* 2019;56(4):288-94.
33. Sasidharan S, Dhillon HS. Ebola, COVID-19 and Africa: What we expected and what we got. *Dev World Bioeth.* 2020. Online ahead of print. doi: 10.1111/dewb.12292.

34. World Health Organization. World Malaria Report 2005. Geneva, 2005.
35. World Health Organization. World malaria report 2015. Geneva, 2015.
36. World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria. Geneva, 2006.
37. World Health Organization. Guidelines for the Treatment of Malaria 2nd Edition. Geneva, 2010.
38. Abdulla S, Sagara I, Borrmann S, D'Alessandro U, Gonzalez R, Hamel M, et al. Efficacy and safety of artemether-lumefantrine dispersible tablets compared with crushed commercial tablets in African infants and children with uncomplicated malaria: a randomised, single-blind, multicentre trial. *Lancet*. 2008;372(9652):1819-27.
39. Juma EA, Obonyo CO, Akhwale WS, Ogutu BR. A randomized, open-label, comparative efficacy trial of artemether-lumefantrine suspension versus artemether-lumefantrine tablets for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children in western Kenya. *Malar J*. 2008;7:262.
40. Medicines for Malaria Venture. Coartem® Dispersible Facts. Zugriff am: 19.02.2021. Verfügbar unter: <https://www.mmv.org/access/products-projects/coartem-dispersible-artemether-lumefantrine/coartem-dispersible-facts>.
41. Bouyou-Akotet MK, Ramharter M, Ngoungou EB, Mamfoumbi MM, Mihindou MP, Missinou MA, et al. Efficacy and safety of a new pediatric artesunate-mefloquine drug formulation for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Gabon. *Wien Klin Wochenschr*. 2010;122(5-6):173-8.
42. Ramharter M, Kurth FM, Belard S, Bouyou-Akotet MK, Mamfoumbi MM, Agnandji ST, et al. Pharmacokinetics of two paediatric artesunate mefloquine drug formulations in the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Gabon. *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(5):1091-6.
43. Tietche F, Chelo D, Mina Ntoto NK, Djoukoue FM, Hatz C, Frey S, et al. Tolerability and efficacy of a pediatric granule formulation of artesunate-mefloquine in young children from Cameroon with uncomplicated *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(6):1034-40.
44. Faye B, Ndiaye JL, Tine R, Sylla K, Gueye A, Lo AC, et al. A randomized trial of artesunate mefloquine versus artemether lumefantrine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Senegalese children. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82(1):140-4.
45. Sagara I, Diallo A, Kone M, Coulibaly M, Diawara SI, Guindo O, et al. A randomized trial of artesunate-mefloquine versus artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79(5):655-61.
46. Kurth F, Pongratz P, Belard S, Mordmüller B, Kremsner PG, Ramharter M. In vitro activity of pyronaridine against *Plasmodium falciparum* and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays. *Malar J*. 2009;8:79.
47. Kurth F, Belard S, Basra A, Ramharter M. Pyronaridine: a new 'old' drug on the verge of entering the antimalarial armamentarium. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9(4):393-6.
48. Ramharter M, Kurth F, Schreier AC, Nemeth J, Glasenapp I, Belard S, et al. Fixed-dose pyronaridine-artesunate combination for treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in pediatric patients in Gabon. *J Infect Dis*. 2008;198(6):911-9.
49. Kayentao K, Doumbo OK, Penali LK, Offianan AT, Bhatt KM, Kimani J, et al. Pyronaridine-artesunate granules versus artemether-lumefantrine crushed tablets in children with *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized controlled trial. *Malar J*. 2012;11:364.
50. Tshetu AK, Gaye O, Kayentao K, Thompson R, Bhatt KM, Sesay SS, et al. Efficacy and safety of a fixed-dose oral combination of pyronaridine-artesunate compared with artemether-lumefantrine in



children and adults with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria: a randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2010;375(9724):1457-67.

51. Rueangweerayut R, Phyo AP, Uthaisin C, Poravuth Y, Binh TQ, Tinto H, et al. Pyronaridine-artesunate versus mefloquine plus artesunate for malaria. *N Engl J Med*. 2012;366(14):1298-309.
52. Belard S, Kurth F. Pyronaridine-artesunate retreatment for malaria. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):136-7.
53. Sagara I, Beavogui AH, Zongo I, Soulama I, Borghini-Fuhrer I, Fofana B, et al. Safety and efficacy of re-treatments with pyronaridine-artesunate in African patients with malaria: a substudy of the WANECAM randomised trial. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):189-98.
54. Pryce J, Hine P. Pyronaridine-artesunate for treating uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;1:CD006404.
55. Agnandji ST, Kurth F, Fernandes JF, Soulanoudjinger SS, Abossolo BP, Mombo-Ngoma G, et al. The use of paediatric artemisinin combinations in sub-Saharan Africa: a snapshot questionnaire survey of health care personnel. *Malar J*. 2011;10:365.
56. Agnandji ST, Kurth F, Belard S, Mombo-Ngoma G, Basra A, Fernandes JF, et al. Current status of the clinical development and implementation of paediatric artemisinin combination therapies in Sub-Saharan Africa. *Wien Klin Wochenschr*. 2011;123 Suppl 1:7-9.
57. Bruce MC, Donnelly CA, Alpers MP, Galinski MR, Barnwell JW, Walliker D, et al. Cross-species interactions between malaria parasites in humans. *Science*. 2000;287(5454):845-8.
58. Goncalves RM, Lima NF, Ferreira MU. Parasite virulence, co-infections and cytokine balance in malaria. *Pathog Glob Health*. 2014;108(4):173-8.
59. Mombo-Ngoma G, Kleine C, Basra A, Wurbel H, Diop DA, Capan M, et al. Prospective evaluation of artemether-lumefantrine for the treatment of non-falciparum and mixed-species malaria in Gabon. *Malar J*. 2012;11:120.
60. Lalremruata A, Jeyaraj S, Engleitner T, Joanny F, Lang A, Belard S, et al. Species and genotype diversity of *Plasmodium* in malaria patients from Gabon analysed by next generation sequencing. *Malar J*. 2017;16(1):398.
61. Assefa SA, Preston MD, Campino S, Ocholla H, Sutherland CJ, Clark TG. estMOI: estimating multiplicity of infection using parasite deep sequencing data. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1292-4.
62. Sandri TL, Kreidenweiss A, Cavallo S, Weber D, Juhas S, Rodi M, et al. Molecular epidemiology of *Mansonella* species in Gabon. *J Infect Dis*. 2020. Oct 25;jiaa670.
63. Belard S, Gehringer C. High prevalence of *Mansonella* spp. and parasitic co-infections in Gabon calls for an end to the neglect of *Mansonella* research. *J Infect Dis*. 2020. Oct 25;jiaa671.
64. Groger M, Veletzky L, Lalremruata A, Cattaneo C, Mischlinger J, Zoleko-Manego R, et al. Prospective Clinical Trial Assessing Species-Specific Efficacy of Artemether-Lumefantrine for the Treatment of *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, and Mixed *Plasmodium* Malaria in Gabon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(3).
65. Belard S, Brand J, Schulze-Sturm U, Janda A, von Both U, Tacoli C, et al. Intravenous Artesunate for Imported Severe Malaria in Children Treated in Four Tertiary Care Centers in Germany: A Retrospective Study. *Pediatr Infect Dis J*. 2019;38(11):e295-e300.
66. Levy M, Pham LL, Faye A, de Suremain N, Rambaud J, Angoulvant A, et al. Parenteral Artesunate for Severe Imported *Plasmodium falciparum* Malaria in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(9):1053-4.

67. Venturini E, Zammarchi L, Bianchi L, Montagnani C, Tersigni C, Bortone B, et al. Efficacy and Safety of Intravenous Artesunate in Children With Severe Imported Malaria. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(8):e220.
68. Antinori S, Napolitano M, Grande R, Passerini S, Ridolfo AL, Malaria study g, et al. Epidemiological and clinical characteristics of imported malaria in adults in Milan, Italy, 2010-2015. *Eur J Intern Med*. 2018;57:e13-e6.
69. Brophy J, Committee to Advise on Tropical M, Travel. Summary of the Statement on International Travellers Who Intend to Visit Friends and Relatives. *Can Commun Dis Rep*. 2015;41(5):89-99.
70. Neave PE, Behrens RH, Jones CO. "You're losing your Ghanaianess": understanding malaria decision-making among Africans visiting friends and relatives in the UK. *Malar J*. 2014;13:287.
71. Kurth F, Develoux M, Mechain M, Malvy D, Clerinx J, Antinori S, et al. Severe malaria in Europe: an 8-year multi-centre observational study. *Malar J*. 2017;16(1):57.
72. Fong EKK, Pell LG, Faress A, Nguyen JH, Ma XW, Lam RE, et al. Adherence to recommendations at a Canadian tertiary care Family Travel Clinic - A single centre analysis. *Travel Med Infect Dis*. 2020;34:101579.
73. Zoller T, Junghanss T, Kapaun A, Gjorup I, Richter J, Hugo-Persson M, et al. Intravenous artesunate for severe malaria in travelers, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(5):771-7.
74. Paczkowski MM, Landman KL, Arguin PM, Centers for Disease C, Prevention. Update on cases of delayed hemolysis after parenteral artesunate therapy for malaria - United States, 2008 and 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014;63(34):753-5.
75. Savargaonkar D, Das MK, Verma A, Mitra JK, Yadav CP, Srivastava B, et al. Delayed haemolysis after treatment with intravenous artesunate in patients with severe malaria in India. *Malar J*. 2020;19(1):39.
76. Rolling T, Agbenyega T, Issifou S, Adegnika AA, Sylverken J, Spahlinger D, et al. Delayed hemolysis after treatment with parenteral artesunate in African children with severe malaria--a double-center prospective study. *J Infect Dis*. 2014;209(12):1921-8.
77. Fanello C, Onyamboko M, Lee SJ, Woodrow C, Setaphan S, Chotivanich K, et al. Post-treatment haemolysis in African children with hyperparasitaemic falciparum malaria; a randomized comparison of artesunate and quinine. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):575.
78. Hawkes MT, Opoka RO, Conroy AL, Elphinstone RE, Hume HA, Namasopo S, et al. Anemia and transfusion requirements among Ugandan children with severe malaria treated with intravenous artesunate. *Pediatr Hematol Oncol*. 2020;37(2):140-52.
79. Jaureguiberry S, Ndour PA, Roussel C, Ader F, Safeukui I, Nguyen M, et al. Postartesunate delayed hemolysis is a predictable event related to the lifesaving effect of artemisinins. *Blood*. 2014;124(2):167-75.
80. Wojnarski M, Mouri O, Chambrion C, Roussel C, Chartrel N, Smith B, et al. Plasmodium falciparum Clearance Is Pitting-Dependent With Artemisinin-Based Drugs but Pitting-Independent With Atovaquone-Proguanil or Mefloquine. *J Infect Dis*. 2019;220(3):535-9.
81. Camprubi D, Pereira A, Rodriguez-Valero N, Almuedo A, Varo R, Casals-Pascual C, et al. Positive direct antiglobulin test in post-artesunate delayed haemolysis: more than a coincidence? *Malar J*. 2019;18(1):123.
82. Kurth F, Lingscheid T, Steiner F, Stegemann MS, Belard S, Menner N, et al. Hemolysis after Oral Artemisinin Combination Therapy for Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(8):1381-6.

83. Sowunmi A, Akano K, Ayede AI, Ntadom G, Fatunmbi B, Aderoyeje T, et al. Temporal changes in haematocrit following artemisinin-based combination treatments of uncomplicated falciparum malaria in children. *BMC Infect Dis.* 2015;15:454.
84. Conlon CC, Stein A, Colombo RE, Schofield C. Post-artemisinin delayed hemolysis after oral therapy for *P. falciparum* infection. *IDCases.* 2020;20:e00741.
85. Roussel C, Caumes E, Thellier M, Ndour PA, Buffet PA, Jaureguiberry S. Artesunate to treat severe malaria in travellers: review of efficacy and safety and practical implications. *J Travel Med.* 2017;24(2).
86. Food and Drug Administration. FDA Approves Only Drug in U.S. to Treat Severe Malaria. FDA News Release May 26, 2020. Zugriff am: 21.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-only-drug-us-treat-severe-malaria>.
87. European Medicines Agency. Orphan Designation EU/3/20/2251. Zugriff am: 21.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu3202251>.
88. Belard S, Issifou S, Hounkpatin AB, Schaumburg F, Ngoa UA, Esen M, et al. A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children. *PLoS One.* 2011;6(7):e22525.
89. Targett GA, Greenwood BM. Malaria vaccines and their potential role in the elimination of malaria. *Malar J.* 2008;7 Suppl 1:S10.
90. Theisen M, Adu B, Mordmuller B, Singh S. The GMZ2 malaria vaccine: from concept to efficacy in humans. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(9):907-17.
91. Mordmuller B, Surat G, Lagler H, Chakravarty S, Ishizuka AS, Lalremruata A, et al. Sterile protection against human malaria by chemoattenuated PfSPZ vaccine. *Nature.* 2017;542(7642):445-9.
92. Oeuvray C, Bouharoun-Tayoun H, Gras-Masse H, Bottius E, Kaidoh T, Aikawa M, et al. Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes. *Blood.* 1994;84(5):1594-602.
93. Theisen M, Soe S, Oeuvray C, Thomas AW, Vuust J, Danielsen S, et al. The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro. *Infect Immun.* 1998;66(1):11-7.
94. Esen M, Kreamsner PG, Schleucher R, Gassler M, Imoukhuede EB, Imbault N, et al. Safety and immunogenicity of GMZ2 - a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate. *Vaccine.* 2009;27(49):6862-8.
95. Mordmuller B, Szywon K, Greutelaers B, Esen M, Mewono L, Treut C, et al. Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambarene, Gabon. *Vaccine.* 2010;28(41):6698-703.
96. Esen M, Mordmuller B, de Salazar PM, Adegnika AA, Agnandji ST, Schaumburg F, et al. Reduced antibody responses against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in the presence of *Trichuris trichiura*. *Vaccine.* 2012;30(52):7621-4.
97. Jepsen MP, Jogdand PS, Singh SK, Esen M, Christiansen M, Issifou S, et al. The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas. *J Infect Dis.* 2013;208(3):479-88.
98. Sirima SB, Mordmuller B, Milligan P, Ngoa UA, Kironde F, Atuguba F, et al. A phase 2b randomized, controlled trial of the efficacy of the GMZ2 malaria vaccine in African children. *Vaccine.* 2016;34(38):4536-42.

99. Dejon-Agobe JC, Ateba-Ngoa U, Lalremruata A, Homoet A, Engelhorn J, Nouatin OP, et al. Controlled Human Malaria Infection of Healthy Adults With Lifelong Malaria Exposure to Assess Safety, Immunogenicity, and Efficacy of the Asexual Blood Stage Malaria Vaccine Candidate GMZ2. *Clin Infect Dis*. 2019;69(8):1377-84.
100. Pance A. Diversify and Conquer: The Vaccine Escapism of *Plasmodium falciparum*. *Microorganisms*. 2020;8(11).
101. Duffy PE, Patrick Gorres J. Malaria vaccines since 2000: progress, priorities, products. *NPJ Vaccines*. 2020;5:48.
102. Aponte JJ, Aide P, Renom M, Mandomando I, Bassat Q, Sacarlal J, et al. Safety of the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in a highly endemic area of Mozambique: a double blind randomised controlled phase I/IIb trial. *Lancet*. 2007;370(9598):1543-51.
103. European Medicines Agency. First malaria vaccine receives positive scientific opinion from EMA. Press release 24/07/2015. Zugriff am: 21.01.2021. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-malaria-vaccine-receives-positive-scientific-opinion-ema>.
104. ClinicalTrials.gov. Malaria Vaccine Evaluation Programme (MVPE). NCT03806465. 2019. Zugriff am: 21.01.2021. Verfügbar unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03806465>.
105. Feachem RGA, Chen I, Akbari O, Bertozzi-Villa A, Bhatt S, Binka F, et al. Malaria eradication within a generation: ambitious, achievable, and necessary. *Lancet*. 2019;394(10203):1056-112.

## **6 Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die direkt oder indirekt zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne ein großes internationales Team hätte diese Arbeit nicht entstehen können.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Horst von Bernuth und Prof. Marcus Mall für ihre Unterstützung und Begleitung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Ich danke auch Prof. Peter Kremsner, Prof. Michael Ramharter und PD Dr. Florian Kurth für die vielen lehrreichen und bereichernden gemeinsamen Arbeiten auf dem Gebiet der klinischen Malariaforschung.

## 7 Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift