

**Aktivitätsbestimmung von Chloroquin und  
Chloroquinderivaten in klinischen  
*Plasmodium falciparum*-Isolaten  
in Gabun/Zentralafrika**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Knittel, Sarah**

**2014**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Hartl

*Meinen Eltern Gisela und Franz*



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
1.Einleitung.....	1
1.1.Der Lebenszyklus der Parasiten .....	4
1.2.Symptome der Malaria .....	6
1.3.Klinische Pathophysiologie .....	7
1.4.Erworbene Immunität.....	8
1.5.Die Malaria-Hypothese .....	9
1.6.Malaria – die Geschichte der Krankheit .....	10
1.7.Aktuelle Therapieempfehlungen .....	12
1.8.Hintergrund und Bedeutung von Resistenzen von Plasmodien .....	13
1.8.1.Resistenz – eine Definition.....	13
1.8.2.Ursachen der Resistenzentwicklung .....	14
1.8.3.Resistenzmechanismen.....	16
1.8.4.Auswirkungen der Resistenzen .....	17
1.8.5.Bestimmungsmethoden.....	17
1.8.6.Prävention der Entstehung von Resistenzen .....	19
1.9.Vorstellung der getesteten Wirksubstanzen .....	21
1.9.1.Ferroquin – ein neues Medikament in Entwicklung.....	21
1.9.2.Chloroquin.....	25
1.9.3.Amodiaquin .....	28
1.9.4.Die Arylaminoalkohole Chinin und Mefloquin.....	29
1.9.5.Artesunat.....	32
1.10.Fragestellungen .....	36
2.Patienten, Material und Methoden .....	37

2.1. Material.....	37
2.2. Methoden .....	40
2.2.1. Die Studienpopulation .....	40
2.2.2. Kultivierung der Parasiten.....	46
2.2.3. Bestimmung der $IC_{50}$ mittels <i>ELISA</i> .....	48
2.2.4. Statistische Auswertung.....	50
3. Ergebnisse.....	52
3.1. Die Studienpopulation .....	52
3.2. Studienverlauf.....	53
3.3. Klinische Testung des Studienmedikamentes Ferroquin .....	54
3.4. Auswertung der Ergebnisse .....	55
3.4.1. Korrelationsanalyse der <i>in vitro</i> Wirksamkeit der getesteten Substanzen ...	57
3.4.2. Vergleich der <i>in vitro</i> Wirksamkeit mit der klinischen Wirksamkeit mittels T-Test .....	61
4. Diskussion .....	62
4.1. Suszeptibilität oder Resistenz? Eine Analyse der Hemmwerte .....	62
4.2. Korrelationsanalyse.....	65
4.3. Analyse der Therapieversager.....	68
4.4. Bedeutung und Grenzen der <i>in vitro</i> Sensitivitätstestung.....	69
4.5. Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Sensitivitätstestung.....	70
4.6. Bedeutung für die Gesundheitspolitik .....	71
4.7. Neue Ansätze im Kampf gegen die Malaria .....	72
Zusammenfassung.....	74
Abbildungsverzeichnis .....	76
Literaturverzeichnis .....	77

Erklärung zum Eigenanteil .....	88
Danksagung .....	89

## Abkürzungsverzeichnis

ACT	<i>artemisinin-based combination therapy</i> Artemisinin-basierte Kombinationstherapie
AQ	Amodiaquin
AS	Artesunat
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	<i>body mass index</i> Körpermasseindex
BSA	<i>bovine serum albumin</i> Rinderalbumin
C	Celsius
CQ	Chloroquin
CYP	Cytochrom P450
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
ELISA	<i>enzyme linked immuno assay</i> enzymgekoppelter Immunoabsorptionstest
et al.	<i>et alii</i> und andere
fl	femtoliter
FQ	Ferroquin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
$IC_{50}$	mittlere inhibitorische Konzentration
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
i. v.	intravenös
$\mu$ l	Mikroliter
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i> minimale Hemmkonzentration

Mio.	Million
MQ	Mefloquin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerasekettenreaktion
PCT	<i>parasite clearance time</i> Parasitenräumzeit
<i>P. f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PfCRT	<i>Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter</i> <i>Plasmodium-falciparum-Chloroquin-Resistenz-Transporter</i>
PfEMP1	<i>Plasmodium falciparum erythrocyte membrane proteine 1</i> <i>Plasmodium falciparum Erythrozyten Membranprotein 1</i>
PfHRP-2	<i>Plasmodium falciparum-histidine rich protein 2</i> histidinreiches Protein 2 von <i>Plasmodium falciparum</i>
PfMDR1	<i>Plasmodium falciparum multidrug resistant transporter 1</i> <i>Plasmodium falciparum multidrug Resistenz-Transporter 1</i>
PfMRP1	<i>Plasmodium falciparum multidrug resistance-associated protein</i> <i>Plasmodium falciparum multidrug Resistenz-assoziiertes Protein</i>
QN	<i>quinine</i> Chinin
QTcF	Nach Fridericia frequenzkorrigierte QT Zeit
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i> Umdrehungen pro Minute
SAG-Mannitol	<i>saline-adenine-glucose-mannitol</i> Lösung aus Kochsalz, Adenin, Glukose und Mannitol
TM	<i>trademark</i> Handelsmarke
TNF	Tumornekrosefaktor

u. a.	unter anderem
v. Chr.	vor Christus
WHO	<i>world health organization</i> Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Lege das Ruder erst dann nieder,  
wenn das Boot an Land ist. (*aus dem Gabun*)

## 1. Einleitung

Malaria ist eine von Protozoen hervorgerufene Infektionskrankheit von globaler Bedeutung. Auslöser der Krankheit sind Parasiten des Genus *Plasmodium*, von denen aktuell 5 verschiedene humanpathogene Arten bekannt sind: *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. knowlesii* und *P. malariae*. Die gefährlichste und häufigste Form der Malaria ist die durch *P. falciparum* verursachte Malaria tropica.<sup>1,2</sup>

Nach Schätzungen der WHO betrug die globale Malariainzidenz im Jahr 2010 216 Millionen Fälle. In 91 % der Fälle wurde die Malaria durch eine Infektion mit *P. falciparum* ausgelöst. Die Anzahl der in demselben Zeitraum durch Malaria verursachten Todesfälle wird mit 655 000 Personen pro Jahr angegeben.

Einundneunzig Prozent der Todesfälle kommen aus Afrika, etwa 86 % der globalen Todesfälle wurden bei Kindern unter fünf Jahren beobachtet.<sup>3</sup>

Die globale Malariainzidenz und die globale Mortalitätsrate sind – verglichen mit den Daten aus 2009 – leicht rückläufig.<sup>4</sup>

Diese Arbeit befasst sich mit der Wirksamkeit verschiedener Chemotherapeutika zur Behandlung einer Infektion mit *P. falciparum*.

Sie basiert auf Daten, die durch eine *in vitro* Resistenztestung in Lambaréné, Gabun im Zeitraum von Dezember 2009 bis Juni 2010 gewonnen wurden.

Lambaréné liegt wenige Kilometer südlich des Äquators in Zentralafrika. Zunächst bekannt durch Albert Schweitzer, der hier 1913 ein Krankenhaus gründete, ist es mittlerweile eine Stadt mit rund 25000 Einwohnern, am Ufer des Ogowes, mitten im tropischen Regenwald. Das tropische Klima ist geprägt von hoher Luftfeuchtigkeit (bis zu 98 %) und hohen Durchschnittstemperaturen. Die Jahresdurchschnittstemperatur von Gabun beträgt 25 °C.<sup>5</sup>



Abb. 1 Gabon<sup>6</sup>

Abdruck mit freundlicher Erlaubnis von Bourrichon, Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-3.0.

Gabon gehört zu den Hochendemielländern der Malaria. Neben *P. falciparum*, welches mit Abstand der dort am häufigsten angetroffene Malariaerreger ist, finden sich auch *P. malariae* und *P. ovale*.

Eine weitere medizinische Herausforderung ist die große Anzahl der an Tuberkulose und HIV erkrankten Menschen.

Die Verbreitung der Malaria steht in engem Zusammenhang mit der Armut: Vielen Menschen im Gabon fehlen die Mittel für die Fahrt und Behandlung im Krankenhaus,

den Kauf von Moskitonetzen, für den Bau von moskitoundurchlässigen Wänden oder gar einer Klimatisierung der Häuser.

In der Studie von Issifou und Kreamer wird dies verdeutlicht: Im Zeitraum 1998 bis 2003 wurde eine signifikante Reduzierung der ambulanten Patienten und der Malariafälle im Albert Schweitzer Krankenhaus festgestellt. Im Vergleich dazu steht die Statistik der Patienten des „*Hôpital général*“ aus Lambaréné, welche in diesem Zeitraum keine signifikante Änderung der Patientenzahl verzeichnete. In der oben genannten Periode wurden die Kosten für die Konsultation im Albert Schweitzer Krankenhaus zweimalig erhöht. Die Vermutung liegt nahe, dass dies der Anlass für viele Patienten war, sich an anderen Stellen Hilfe zu suchen.<sup>7</sup>

Allzu häufig verzögern sich Diagnose und Therapie wegen Geldmangel, Unwissen oder Verantwortungslosigkeit der Familienmitglieder. Die von der WHO empfohlenen Kombinationspräparate sind für afrikanische Verhältnisse teuer und nicht immer erhältlich. Im Gabun können Antimalariamedikamente in den Apotheken und Gesundheitsposten oder auf dem Schwarzmarkt zum größten Teil rezeptfrei erworben werden. Die aktuellen Empfehlungen sind in den Apotheken von Lambaréné und den Gesundheitsposten in den Dörfern nur unzureichend bekannt. Das führt häufig zu nicht adäquater Dosierung und kann die Resistenzentwicklung der Parasiten fördern. Außerdem begegnen viele Menschen der westlichen Medizin mit Misstrauen und ziehen die traditionelle Medizin vor. Dies kann vor allem für Patienten, die besonders vulnerabel sind (Kleinkinder und Schwangere), schnell dramatische Folgen haben.

Das Forschungslabor „*Unité des recherches médicales*“ forscht gemeinsam mit dem Tropeninstitut der Universität Tübingen an diversen Tropenkrankheiten, darunter neben Malaria auch an Schistosomiasis, HIV und Tuberkulose.

In der Malariaforschung werden unter anderem die Impfstoffe RTS,S und GM22 getestet, sowie das Ferroquin – ein neuer Wirkstoff zur Behandlung der Infektion mit *P. falciparum*.

FARM – „*Dose Ranging Study of Ferroquine With Artesunate in African Adults and Children With Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria*“ stellt eine Studie in der

klinischen Phase 2 dar, die seit 2009 in verschiedenen afrikanischen Zentren durchgeführt wird, darunter auch in Lambaréné.<sup>8</sup>

Die Daten für diese Arbeit wurden von Teilnehmern dieser Studie erhoben; die Resistenztestung ist im Studienprotokoll festgelegt. Die Phase 2 dieser Studie wurde für Lambaréné im August 2009 durch das nationale Ethikkomitee in Libreville, Gabun genehmigt und folgt den ethischen Richtlinien der medizinischen Forschung am Menschen, definiert in der Deklaration von Helsinki.

## 1.1. Der Lebenszyklus der Parasiten

Die Übertragung der Parasiten erfolgt in der Regel durch die weibliche Anophelesmücke, sehr selten auch durch eine Bluttransfusion oder perinatal.<sup>9</sup> Wasseransammlungen, die als Brutstätte für die Larven der Mücken dienen und vor allem in der Regenzeit zu finden sind, begünstigen die Vermehrung der Mücken; dies erklärt die zum Teil starken saisonalen Schwankungen der Malariaprävalenz in vielen endemischen Gebieten.<sup>10</sup> Gabun ist hochendemisch für Malaria.

Die Transmission findet in den nördlichen Gegenden ganzjährig und im Süden des Landes von Oktober bis Juli statt.<sup>11</sup> Insgesamt wurden im Gabun 21 verschiedene Spezies der Anophelesmücke beschrieben. Hiervon sind *Anopheles arabiensis*, *A. coustani*, *A. funestus*, *A. gambiae*, *A. hancocki*, *A. hargreavesi*, *A. melas*, *A. nili*, *A. paludis* und *A. pharoensis* Vektoren für Plasmodien.<sup>12</sup> Malaria wird im Gabun hauptsächlich durch Infektion mit *P. falciparum* verursacht; als Hauptvektoren gelten *A. gambiae s. s.* und *A. funestus*.<sup>13</sup>

Im Darm der weiblichen Anophelesmücke findet die sexuelle Vermehrung im Entwicklungszyklus der Parasiten statt, hierbei entwickeln sich aus den Gametozyten die reifen Geschlechtsformen, die sich zur Zygote vereinigen. Die Zygote wächst, wird mobil und nistet sich als Oozyste im Darmgewebe ein. Schließlich platzt die Oozyste und setzt Sporozoiten frei, die in die Speicheldrüsen der Stechmücke wandern und bei einem Stich in die Blutbahn des Wirtes gelangen.<sup>10</sup> Über die Blutgefäße gelangen die Sporozoiten in die Leber; es folgt die Reifung zum Leberschizonten, aus dem etwa 30000 Merozoiten freigesetzt werden.<sup>10</sup>

Lange Zeit war nicht geklärt, wie die hepatischen Merozoiten der Phagozytose durch die Kupffer-Zellen entgehen können. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Merozoiten über sogenannte Merosomen durch die Lebersinusoide in die Blutbahn gelangen.<sup>14</sup> Die Merosomen dienen somit als „Trojanisches Pferd“, welches die Merozoiten vor den zahlreichen Kupffer-Zellen schützt. Die Merosomen selbst werden aus der Membran einer Wirtszelle gebildet.<sup>15</sup> Die Exposition von Phosphatidylserin, welches die Phagozytose einleiten würde, wird dabei von den Parasiten unterdrückt.<sup>14</sup> In der Blutbahn befallen die Merozoiten die Erythrozyten und entwickeln sich zu intrazellulären Trophozoiten.<sup>10</sup>

Der Trophozoit ernährt sich von einer Vielzahl von Wirtsmetaboliten und -proteinen, vor allem von Hämoglobin und Glukose. Hämoglobin wird zu Hämozoin abgebaut und bildet das mikroskopisch sichtbare Malariapigment.

Durch Kernteilung des Trophozoiten entwickelt sich ein mehrkerniger Schizont;<sup>16</sup> hieraus entstehen bis zu 32 Merozoiten. Der intraerythrozytäre Lebenszyklus dauert bei *P. falciparum* 48 Stunden.<sup>17</sup> Am Ende des Zyklus verlassen die Merozoiten den mittlerweile stark veränderten und verbrauchten Erythrozyten, zirkulieren sehr kurze Zeit frei und befallen neue, frische Erythrozyten.<sup>18</sup>

Da pro Schizont etwa zehn neue Erythrozyten befallen werden stellt die erythrozytäre Phase einen Vermehrungszyklus mit nahezu exponentiellem Wachstum der Parasiten innerhalb der roten Blutkörperchen dar.<sup>10</sup>

Nur in diesem Stadium sind bei den Patienten Symptome und Komplikationen der Krankheit Malaria zu beobachten.

Ein Kardinalsymptom der Malaria ist Fieber. Es ist vor allem zum Zeitpunkt der Merozoitenfreisetzung aus den Erythrozyten zu beobachten. Bei unbehandelten Patienten findet sich als Ausdruck der Synchronisierung der Merozoitenfreisetzung eine für die Plasmodienspezies typische Periodik des Fiebers (im Abstand von 48 Stunden bei *P. vivax* und *P. ovale* bzw. 72 Stunden bei *P. malariae*).<sup>1</sup>

Im Gegensatz hierzu wurde bei Infektion mit *P. falciparum* ein Fieberanstieg im zirkadianen Rhythmus beobachtet.<sup>19</sup>

Einige wenige Merozoiten werden zu weiblichen und männlichen Gametozyten, diese werden bei einem erneuten Stich durch die Stechmücke aufgenommen – der Kreis schließt sich.<sup>9</sup>

## 1.2.Symptome der Malaria

Die Inkubationszeiten der vier humanpathogenen Spezies von *Plasmodium* unterscheiden sich: Bei *P. falciparum* liegt die Inkubationszeit bei mindestens 6-15 Tagen. Bei *P. vivax* und *P. ovale* kommt es 10-18 Tage nach Infektion zum Krankheitsausbruch, bei *P. malariae* hingegen erst nach 18-40 Tagen. Bei einer Infektion, welche von den Hypnozoiten (*P. ovale* und *P. vivax*) ausgeht, kann die Inkubationszeit Monate bis Jahre dauern.<sup>1</sup>

Die Symptome und deren Ausmaß sind abhängig von der individuellen Immunitätslage und der Art bzw. dem Zeitpunkt des Beginns einer antiparasitären Therapie.

Bei Vorhandensein einer Semi-Immunität (in endemischen Gebieten) kann eine Infektion asymptomatisch oder mit milden Symptomen verlaufen.

Die Beschwerden ähneln häufig den Symptomen eines grippalen Infekts.<sup>1</sup>

Neben Fieber treten bei Malaria auch Schüttelfrost, Gliederschmerzen, Abgeschlagenheit und Erbrechen auf. Auch ein Ikterus als Zeichen der Hämolyse, der disseminierten intravasalen Koagulopathie oder Leberzellschädigung findet sich gelegentlich.<sup>20</sup> Laborchemisch spiegelt sich dies in einer erhöhten

Laktat -Dehydrogenase (LDH), einem erhöhten Bilirubin und einem erniedrigten

Haptoglobin wider.<sup>21</sup> Weitere laborchemische Auffälligkeiten sind eine

Thrombozytopenie und im Verlauf eine Anämie.<sup>21</sup>

Zeichen der schweren Malaria sind definiert durch das Auftreten eines oder mehrerer der folgenden Symptome: zerebrale Symptome (Koma, gehäufte Krampfanfälle), schwere Anämie, Lungenödem, Hypoglykämie, akutes Nierenversagen, metabolische Azidose, Hämorrhagie und Kreislaufschock.<sup>22</sup>

Bei längerdauernden Infektionen kommt es zu einer Splenomegalie, welche eine Panzytopenie bedingen kann.<sup>21</sup>

Malaria kann jedoch nicht klinisch diagnostiziert werden, da die Symptome nicht spezifisch für eine Malariaerkrankung sind und so nicht sicher zwischen einer Malaria und einer anderen (mitunter auch lebensbedrohlichen) Tropenerkrankung unterschieden werden kann.<sup>23</sup> Die alleinige Anwendung klinischer Algorithmen zur Diagnose einer Malaria führt zu einem inakzeptablen hohen Prozentsatz an Behandlungsfehlern durch Fehldiagnose.<sup>24</sup>

Der Goldstandard in der Diagnostik ist nach wie vor der dicke Tropfen als Anreicherungsverfahren bzw. der Blutausstrich zur Speziesdifferenzierung. Schnelltests basieren in der Regel auf einem Proteinnachweis (z. B. *HRP2*). Sie erlauben eine schnelle Diagnosestellung ohne Vorhandensein eines Labors, haben jedoch eine niedrigere Sensitivität und können die Standarddiagnostik nicht ersetzen.<sup>1</sup>

### **1.3.Klinische Pathophysiologie**

Die pathophysiologischen Mechanismen der Symptome und Komplikationen der Malaria sind nicht vollständig bekannt. Einige, z. T. gut untersucht Modelle schlagen vor, dass sie u. a. durch Expression von Oberflächenrezeptoren an infizierten Erythrozyten, Hämolyse von Erythrozyten, Freisetzung von Parasiten- und Zellmaterial in den Kreislauf und der daran anschließenden Reaktion des Immunsystems des Wirts entstehen.<sup>10</sup>

Infizierte Erythrozyten exprimieren an der Oberfläche ein spezielles Membranprotein. Dieses *P. falciparum* Erythrozyten Membranprotein (*PfEMP1 = P. falciparum erythrocyte membrane proteine 1*) ist ein Rezeptor und vermittelt die Rosettenbildung, die Verklumpung von infizierten Erythrozyten und die Anheftung an Gefäßwände. Dies hat eine Störung der Mikrozirkulation zur Folge.<sup>25</sup>

Die Rosettenbildung entsteht durch Verbindung von infizierten und nichtinfizierten Erythrozyten. Sie spielt möglicherweise bei der zerebralen Malaria eine Rolle.<sup>26</sup>

Durch die rezeptorvermittelte Anheftung von infizierten Erythrozyten an Endothelzellen gelingt es den Parasiten zudem, der Sequestration durch die Milz zu entgehen.<sup>25</sup>

Anämie entsteht durch intravasale Hämolyse von infizierten und nicht infizierten Erythrozyten, Eliminierung deformierter Erythrozyten durch die Milz und Störung der Erythropoese.<sup>27,28</sup> Beim Zerfall von Erythrozyten im Rahmen der Merozoitenfreisetzung gelangen Glykolipide und andere parasitäre Moleküle in den Kreislauf und werden von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Diese können eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen produzieren (z. B. TNF, IL-6, IL-1 beta und Gamma-Interferon). Dies kann zur Aktivierung einer Zytokinkaskade führen, die Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Schüttelfrost auslöst.<sup>10</sup>

Die Anämie, die Dehydratation mit einhergehendem erniedrigten Perfusionsdruck und körpereigene Entzündungsprozesse wirken sich ebenfalls negativ auf die Oxygenierung der Gewebe aus. Die verminderte Oxygenierung, eine vermehrte Produktion von Laktat durch die Parasiten und eine verminderte Elimination von Laktat durch die Leber führen zu einer metabolischen Azidose. Diese metabolische Azidose (häufig Laktatazidose) ist ein wichtiges Zeichen der schweren Malaria. Als Konsequenz können aus dieser Azidose eine respiratorische Insuffizienz und Koma entstehen.<sup>25</sup>

Basierend auf den Symptomen und Entzündungsprozessen der Malaria wurden *scores* entwickelt, die der Prognose und somit der gezielten Anwendung von Ressourcen bei der schweren Malaria dienen sollen. Einer dieser *scores* ist der *Lambaréné Organ Dysfunction Score (LODS)*, der aus den Symptomen Koma, Erschöpfung und vertiefte Atmung besteht. Der *LODS* ist einfach anzuwenden und besitzt eine hohe Aussagekraft bezüglich der Mortalität bei der schweren Malaria bei Kindern.<sup>29</sup>

## 1.4. Erworbene Immunität

Lebensbedrohliche Ausprägungen bei Malaria finden sich – abgesehen von Reisenden, Immigranten und Immunsupprimierten – besonders bei Kindern und Schwangeren.<sup>30</sup>

In endemischen Gebieten treten selten schwere Ausprägungen einer Malaria mit hoher Parasitämie oder Fieber bei Säuglingen auf. Dies geht vermutlich auf einen synergistischen Effekt von fetalem Hämoglobin, Ernährung durch Muttermilch und maternalen Antikörpern zurück.<sup>31</sup>

In den ersten Lebensjahren nimmt das Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf kontinuierlich ab. Erwachsene aus hochendemischen Gebieten haben fast ausschließlich milde oder asymptomatische Krankheitsverläufe.<sup>30,32</sup>

Unter holoendemischen Bedingungen kann sich nach zahlreichen Infektionen und kontinuierlicher Exposition eine Teil-Immunität ausbilden.

Die Mechanismen dieser Immunität sind bislang noch nicht bis ins Detail geklärt.<sup>1,33</sup>

Ein Mechanismus der erworbenen Immunität ist die IgG-vermittelte Erkennung von Antigenen an der Oberfläche infizierter Erythrozyten (u.a. *PfEMP-1*)<sup>34</sup> und auf Merozoiten. In Experimenten zur passiven Immunisierung konnte die entscheidende Rolle der Antikörper bei der Entwicklung einer natürlichen Immunität gezeigt werden. Hierbei wurden Patienten aus Asien IgG-Antikörper von erwachsenen Afrikanern übertragen. Dies führte zu einer Wachstumshemmung der Parasiten *in vivo*.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde Impfstoff GMZ2 als Fusionsprotein zweier wichtiger Antigene entwickelt.<sup>35,36</sup>

## 1.5. Die Malaria-Hypothese

Charles Darwin beschreibt in seinem Werk „Die Entstehung der Arten“ 1859 den Überlebensvorteil der Lebewesen, welche sich am besten angepasst haben.

Darwin war der erste, der ein plausibles Modell für die Evolution der Lebewesen aufstellte; mittlerweile wurden einige seiner Grundprinzipien durch Erkenntnisse um molekularbiologische Vorgänge innerhalb der Genetik erweitert.<sup>37</sup>

Die Evolutionstheorie von Darwin und die Voraussetzung, dass Merkmale gemäß den mendelschen Regeln vererbt werden, führten J. B. S. Haldane zu dem Schluss, dass bestimmte Erkrankungen, welche vererbt werden, einen gewissen Schutz vor Malaria bieten.<sup>10,38,39</sup>

Krankheiten der Erythrozyten wie die Sichelzellanämie, Thalassämien, Ovalozytose und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel sichern den heterozygoten Trägern einen bis zu 90-prozentigen Überlebensvorteil bei Erkrankung an Malaria. Einen besonders ausgeprägten Schutz vor Malaria findet man bei heterozygoten Trägern des Sichelzellgens.<sup>10,39</sup>

Der Mechanismus, durch den dieser Polymorphismus vor Malaria schützt, ist noch nicht detailliert bekannt.

Lange Zeit wurde hierfür allein das „Aussicheln“ der Erythrozyten durch den durch Parasiten verursachten Sauerstoffmangel in den Zellen und in der Konsequenz die Sequestration der deformierten Erythrozyten durch die Milz verantwortlich gemacht.<sup>10,40</sup>

Ein „definitives“ Modell des durch das Sichelzellan vermittelten Schutzes gibt es jedoch bis heute nicht. Möglicherweise spielen indirekt vermittelte Prozesse eine bedeutendere Rolle als bisher angenommen.<sup>41</sup>

Der genetisch bedingte Überlebensvorteil in Malaria-endemischen Gebieten scheint trotz der höheren Mortalität homozygoter Träger zu existieren und wird als balancierter Polymorphismus bezeichnet.

Diese Hypothese ist kongruent zu den Prävalenzen dieser Krankheiten in den Endemiegebieten der Malaria.<sup>10,39</sup>

## 1.6.Malaria – die Geschichte der Krankheit

Es wird angenommen, dass *Plasmodien* und Menschen seit vielen tausend bis mehreren zehntausend Jahren zusammenleben.<sup>42</sup>

Ein in der Dominikanischen Republik gefundener Bernstein, welcher aus dem Tertiär stammt (vor etwa 65 Mio. Jahren) ist einer der ersten Nachweise für die frühe Existenz des Parasiten. In seinen Einschlüssen findet man eine Stechmücke der Gattung *Culex*, in deren Darm sich Stadien von Malaria übertragenden Parasiten der Gattung *Plasmodium* nachweisen ließen.<sup>43</sup>

Das Zeitalter Eozän (vor 55 Mio. Jahren) brachte eine große Anzahl neuer Säugetiere hervor. Mit hoher Wahrscheinlichkeit war dies der Anlass für die Entstehung neuer *Plasmodien*-Spezies.<sup>42</sup>

Es wird angenommen, dass sich die Art *P. falciparum* erst viel später aus den Vorgängern (Vögel und Reptilien befallende *Plasmodien*) abzweigte.

Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass *P. falciparum* ein „sensibler Parasit“ ist, welcher die letzte Kaltzeit nicht überlebt hätte.<sup>39</sup>

Interessanterweise finden sich in Afrika südlich der Sahara – im Gegensatz zu anderen Kontinenten – Stechmücken, welche überwiegend beim Menschen Blut saugen.<sup>44</sup>

Dies geht vermutlich darauf zurück, dass diese Stechmücken seit der Zeit, als die Menschen sesshaft wurden und somit sowohl Menschen in hoher Dichte als auch geeignete Brutstätten (= Wasseransammlungen) an einem Ort vorhanden waren, gegenüber anderen Stechmücken einen Selektionsvorteil hatten.<sup>39</sup>

Zu Beginn der Sesshaftigkeit, also am Ende der letzten Kaltzeit (vor 10000 Jahren), gab es eine starke Expansion der Parasiten. Es wird angenommen, dass das Auftreten von *P. falciparum* in diesen Zeitraum fällt.<sup>39</sup>

Erste Berichte über Erkrankungen, die möglicherweise Malaria waren, finden sich bereits in chinesischen Schriften von 2700 Jahren v. Chr. Auch schriftliche Dokumente aus Mesopotamien (2000 v. Chr. ), ägyptische Papyrusschriften (1570 v. Chr.) und Hinduschriften (6. Jahrhundert v. Chr) belegen die frühe Existenz von Malaria.<sup>45</sup>

Schon Hippokrates (ca. 400 v. Chr.) wusste um den Zusammenhang von Fieber und Splenomegalie bei Menschen, die in Feuchtgebieten lebten. Über 2500 Jahre wurde vermutet, dass die Krankheit durch giftige Dämpfe aus den Sümpfen verursacht wird – das spiegelt sich auch im Namen wider: *mal-aria*, ital.: schlechte Luft.<sup>45</sup>

Die Entdeckung der Parasiten im Jahr 1880 von Charles Louis Alphonse Laveran war ein Meilenstein, der das heutige Verständnis der Malaria als Infektionskrankheit begründete. Im Jahr 1897 entdeckte Ronald Ross, dass bei der Übertragung der Parasiten auf Vögel eine Stechmücke als Vektor fungierte.<sup>45</sup> In dieser Zeit war Malaria auch in Europa, insbesondere in Portugal, Andalusien und Italien verbreitet.<sup>46</sup>

Die italienischen Forscher Bignami und Grassi hatten somit direkten Zugang zu den Malariaregionen und konnten durch ihre Experimente am Menschen die Stechmücke der Gattung *Anopheles* als Vektor für die Infektion mit Parasiten des Genus *Plasmodium* identifizieren.<sup>45</sup>

Die oben genannte Gruppe italienischer Forscher beschrieb im Jahr 1900 schließlich die Blutphase des Lebenszyklus für *P. vivax*, *P. falciparum* und *P. malariae*. Diese Erkenntnisse erlaubten eine Prophylaxe vor Malaria mittels Moskitonetzen, larvivoren

Fischen, Trockenlegung von Feuchtgebieten und der Anwendung von Repellentien.<sup>45</sup> Weiterhin unbekannt waren der Verlauf und das Organ der exoerythrozytären Entwicklung der Parasiten.

Ende der 40er Jahre fanden Henry Shortt, Cyril Garnham und deren Kollegen exoerythrozytäre Formen der Malariaparasiten in der Leber und 1982 entdeckte Wojciech Krotoski die Hypnozoiten als das Ruhestadium des *P. vivax*.<sup>45,47</sup>

## 1.7. Aktuelle Therapieempfehlungen

Die WHO empfiehlt zur Therapie einer unkomplizierten *P. falciparum* Infektion in Chloroquinresistenzgebieten bei Kindern und Erwachsenen ein artemisininhaltendes Kombinationspräparat (*Artemisinin-based combination therapy – ACT*). Die Artemisininpräparate wirken schnell und haben eine sehr kurze Halbwertszeit, beides wirkt einer Resistenzentwicklung entgegen. Als Kombinationspartner werden Substanzen mit einer längeren Halbwertszeit eingesetzt. Durch diese Kombination wird das Risiko einer Resistenzentwicklung beider Substanzen reduziert.<sup>22</sup>

Die ACT-Präparate sollten über mindestens 3 Tage verabreicht werden.

Verfügbare Präparate sind Kombinationen aus Artemether/Lumefantrin, Artesunat/Amodiaquin, Artesunat/Mefloquin, Artesunat/Sulfadoxin-Pyrimethamin, und Dihydroartemisinin/Piperaquin.<sup>22</sup>

Chinin gilt als Reservemedikament und sollte nur für eine schwere Malaria und im Fall einer Schwangerschaft verwendet werden. Im ersten Trimester der Schwangerschaft wird eine Kombinationstherapie aus Chinin und Clindamycin empfohlen, ab dem zweiten Trimester kann alternativ ein ACT-Präparat (mit Ausnahme von Dihydroartemisinin/Piperaquin) verabreicht werden. Neben der intravenösen Gabe von Chinin besteht mittlerweile die Möglichkeit bei einer schweren Malaria Artesunat (i. v. und i. m.) oder Artemether (i. m.) zu verabreichen. Artesunat i. v. gilt bei der Therapie der komplizierten *P. falciparum* Malaria mittlerweile als Medikament der ersten Wahl.<sup>22</sup> Wissenschaftlich belegt wurde dies in den multizentrischen Studien AQUAMAT (*Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children*) und SEAQUAMAT (*South East Asian Quinine Artesunate Malaria Trial*).

In der Studie AQUAMAT wurde die Sterblichkeit von an komplizierter Malaria tropica erkrankten Kindern in Afrika bei unterschiedlicher Therapie untersucht. Es zeigte sich eine signifikant geringe Mortalität der mit Artesunat intravenös behandelten Patienten im Vergleich zu den mit Chinininjektionen therapierten Patienten.<sup>48</sup> In der Studie SEAQUAMAT wurden die Wirksamkeiten von Artesunat und Chinin bei Kindern und Erwachsenen mit schwerer Malaria verglichen.

Diese Studie wurde in asiatischen Ländern mit niedriger oder instabiler Übertragungsrate durchgeführt (Bangladesch, Myanmar, Indien und Indonesien). Verglichen mit Chinin reduzierte die parenterale Verabreichung von Artesunat die Mortalität um mehr als ein Drittel.<sup>49</sup>

## **1.8.Hintergrund und Bedeutung von Resistenzen von Plasmodien**

### **1.8.1.Resistenz – eine Definition**

Die WHO definiert die Medikamentenresistenz bei Plasmodien als die Fähigkeit zu überleben oder sich gar zu vermehren trotz Vorhandensein eines antiplasmodialen Medikamentes in therapeutischer Dosierung und angemessener Wirkzeit am Wirkort.<sup>50,51</sup>

Eine Medikamentenresistenz kann zu einem Therapieversagen führen, allerdings kann ein Therapieversagen auch durch andere – nicht parasitenbezogene – Faktoren verursacht werden. Es wird definiert als das Unvermögen, die Parasitenvermehrung ausreichend zu hemmen und die Symptome zu verringern, trotz Verabreichung einer geeigneten Substanz. Dies kann auch Folge eines zu geringen Medikamentenspiegels sein (Erbrechen, falsche Dosierung, Resorptionsprobleme).<sup>22,52</sup>

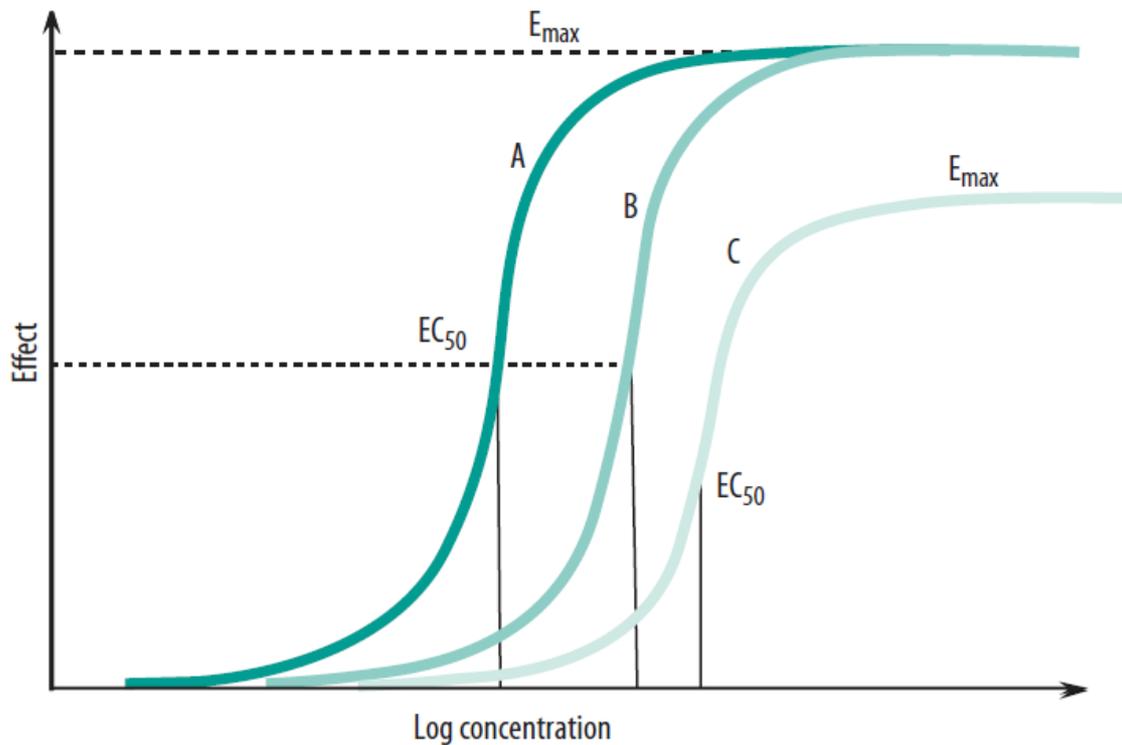


Abb. 2 Resistenz als Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve<sup>22</sup>  
 $EC_{50}$  = mittlere effektive Dosis,  $E_{max}$  = Maximaleffekt  
 mit freundlicher Erlaubnis der WHO

Aus mathematischer Sicht besteht Resistenz in einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve (s. auch Abb. 2) – entweder nur nach rechts (B) oder mit einer zusätzlichen Kurvenabflachung und Reduzierung der Maximalwirkung (C).<sup>22</sup>

### 1.8.2. Ursachen der Resistenzentwicklung

Legt man die Resistenzentwicklung analog zum darwinschen Modell der Evolutionstheorie aus, so setzt dies das Vorhandensein von Selektion, Variabilität und Vererbung von Merkmalen voraus. Der Selektionsdruck wird hierbei durch die Einführung eines Medikamentes ausgeübt.<sup>53</sup>

Subtherapeutische Dosen und lange Halbwertszeiten unterstützen die Entstehung von Resistenzen.<sup>54</sup> Sind die Parasiten anschließend höheren Dosen ausgesetzt, findet weitere Selektion statt. Dies kann – auch durch Schwankungen der Medikamentenspiegel zwischen den Individuen – zu einer „kontinuierlich gerichteten Selektion“ führen und erlaubt den Übergang zu einer hochgradigen Resistenz.<sup>53</sup>

Die Entwicklung der Resistenzen wird neben dem Selektionsdruck durch antiparasitäre Chemotherapeutika (im Besonderen bei Medikamenten mit langsamer Elimination) auch durch die genetische Vielfalt der Parasiten bestimmt. Eine hohe Übertragungsrate hat zur Konsequenz, dass viele Parasitenstämme einen Wirt infizieren und in der Folge von einer Anophelesmücke aufgenommen werden können. Die dadurch entstehende „genetische Vielfalt“ erlaubt eine ausgeprägte meiotische Rekombination in der sexuellen Phase im Darm der Anophelesmücke und erhöht – gemeinsam mit dem Selektionsdruck durch Medikamente – die Wahrscheinlichkeit, dass ein resistenter Klon selektiert wird.<sup>55</sup>

Genfluss und genetischer Drift sowie der Flaschenhalseffekt mit der anschließenden Entstehung einer Gründerpopulation in Wirt und Zwischenwirt sind weitere Einflussfaktoren der äußerst komplexen Resistenzentwicklung.<sup>53</sup>

In Gebieten mit einer niedrigeren Übertragungsrate besteht eine größere Wahrscheinlichkeit, dass sich Resistenzen entwickeln und festigen, da viele Bewohner der Hochendemiegebiete eine Semi-Immunität entwickelt haben und viele Infektionen mit wenigen oder keinen Symptomen ablaufen. Es werden also in den Hochendemiegebieten proportional weniger Medikamente eingesetzt, was den durch Medikamente hervorgerufenen Selektionsdruck reduziert.<sup>56</sup> Resistenzen ohne Selektionsdruck wirken sich für die Parasiten in der Regel nachteilig aus, da der Parasit zur Bildung von Resistenzen Energie „investieren“ muss und die Resistenzbildung die „fitness“ des Parasiten gegenüber dem Rest der Population in der Abwesenheit von Selektionsdruck beeinträchtigt.<sup>57</sup>

Wichtige Faktoren, welche die Entstehung von Resistenzen durch ihren Effekt auf den Selektionsdruck fördern sind das Nichtbeachten der WHO-Leitlinien (Monotherapie, zu kurze Therapiedauer, falsche Dosis, traditionelle Medizin, *Non-compliance*, gefälschte Medikamente) und ein uneingeschränkter und unkontrollierter Zugang zu Malariamedikamenten, die rezeptfrei in den Apotheken oder auf dem Markt verkauft werden.

### **Medikamentenfälschungen**

Vor allem in Südostasien, aber zunehmend auch in Afrika begünstigen die hohe Prävalenz der Malaria zum einen und die kaum vorhandene Medikamentenkontrolle zum anderen den Markt der Medikamentenfälschungen oder *counterfeit drugs*.<sup>58</sup>

Die WHO definiert diese als Medikamente, die hinsichtlich Name und Herkunft in betrügerischer Absicht falsch deklariert sind. Diese Fälschungen können sich auf den Wirkstoff selbst (Inhaltstoffe, Dosierung) oder auf die Verpackung beziehen.<sup>59</sup>

Die Folgen sind eine Qualitätsminderung der medizinischen Versorgung und – über eine Reduzierung der Medikamentenspiegel im Körper – eine Verstärkung der Resistenzentwicklung.<sup>58</sup>

### **1.8.3. Resistenzmechanismen**

Das Genom von *P. falciparum* ist mit seinen 60 Millionen Basenpaaren äußerst komplex.<sup>60</sup> Etwa 2,5 % dieses Genoms kodieren für Transporterproteine.

Für einen Teil der klinisch bedeutsamen Resistenzen werden Punktmutationen in diesen Genen verantwortlich gemacht. Beispiele für solche Transporterproteine sind *PfCRT* (Chloroquin, Chinin, Amodiaquin, Halofantrin und vermutlich Mefloquin), *PfMDR1* (Chloroquin, Chinin, Halofantrin, Mefloquin, Artemisinin) und *PfMRP* (Chloroquin, Chinin, Artemisinin).<sup>61</sup> Bei manchen Medikamenten wird nur eine einzige Punktmutation benötigt, für andere gleich mehrere Mutationen.<sup>62</sup>

Für die Mefloquinresistenz beispielsweise wird eine erhöhte Kopienanzahl im *PfMDR1* Gen verantwortlich gemacht.<sup>63</sup> Schadet die Mutation dem Parasiten (in Bezug auf Überleben und Fortpflanzung) nicht, wird der Selektionsdruck durch Medikamente nur die sensiblen Parasiten beseitigen.<sup>62</sup>

Ein anderer Resistenzmechanismus liegt den Substanzen Atovaquon und dem Kombinationspräparat Sulfadoxin-Pyrimethamin zugrunde. Atovaquon findet in Kombination mit Proguanil als Malarone® breite Anwendung in der Prophylaxe der Malaria.<sup>64</sup> Unter Monotherapie fiel eine rasche Resistenzentwicklung auf. Atovaquon hemmt die mitochondriale Zellatmung, indem es den Elektronentransport verhindert und somit das Membranpotential stört.

Es wird angenommen dass es dadurch zu einer vermehrten Bildung von Radikalen kommt und dass diese Radikale als Mutagene auf die Cytochrom B Einheit (dem Angriffspunkt von Atovaquon) wirken.<sup>65</sup>

Sulfadoxin und Pyrimethamin hemmen die Biosynthese der Folsäure. Punktmutationen an den für die Enzyme Dihydrofolatreduktase und Dihydropteroat-Synthetase kodierenden Genen führen zu Resistenzen gegen diese Kombination.<sup>66</sup>

Die genauen Resistenzmechanismen werden bei den einzelnen Medikamenten noch detaillierter besprochen.

#### **1.8.4. Auswirkungen der Resistenzen**

Die variierende Antwort der Parasiten auf die Medikamente ist für die Therapie der Malaria – sei es nun prophylaktisch oder kurativ – einer der bedeutendsten limitierenden Faktoren.<sup>52</sup> Die Medikamentenresistenz bringt zum einen eine erhöhte Mortalität mit sich, trägt zur Vermehrung und Ausbreitung der Malaria bei und erschwert die Malariakontrolle.<sup>52,62,67</sup>

#### **1.8.5. Bestimmungsmethoden**

##### **Sensitivitätstestung *in vivo***

Die *in vivo* Sensitivitätstestung ist die älteste unter den Bestimmungsmethoden.<sup>52</sup>

Die Wirkung der Substanz wird an infizierten und symptomatischen Patienten geprüft.<sup>62</sup> Im ursprünglich von der WHO standardisierten *in vivo* Sensitivitätstest wird eine definierte Dosis an Chloroquin verabreicht und die Parasitenelimination ausgewertet. Hierbei wird zwischen 3 Resistenzgraden und „empfindlich“ unterschieden.<sup>51</sup>

Der Vorteil der *in vivo* Testung liegt darin, dass die klinische Antwort direkt getestet wird. Somit wird auch die Immunität des Patienten berücksichtigt.<sup>52</sup>

Die *in vivo* Sensitivitätstestung gilt daher, trotz der relativ langen Beobachtungszeit, möglicher Einflussfaktoren wie Vormedikation oder Unterschiede in der Aufnahme und Verstoffwechslung des Medikamentes, immer noch als Goldstandard unter den

Sensitivitätstestungen.<sup>56</sup> Ein wichtiger Bestandteil der klinischen Testung sind pharmakokinetische Untersuchungen, welche der Unterscheidung zwischen wirtsbezogenen Einflussfaktoren und (parasitenbezogener) Resistenz dienen. Eine quantitative Messung der Sensitivität ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich.<sup>52</sup> Weitere Nachteile sind, dass die pharmakologischen Untersuchungen teuer und aufwändig sind, und dass diese Art der Testung kein Screening auf neue Substanzen erlaubt.<sup>52</sup>

### **Sensitivitätstestung *in vitro***

Die *in vitro* Testung stellt einen komplett anderen Ansatz zur Sensitivitätstestung von Medikamenten dar. Sie ermöglicht eine objektivere Bestimmung unter weitestgehendem Ausschluss wirtsbezogener Einflussfaktoren wie Resorption und Immunität und stellt keine Gefahr für den Patienten dar. Dieses Verfahren ermöglicht die Testung der Sensitivität einer Parasitenpopulation gegenüber mehreren Wirkstoffen. Im Gegensatz zur *in vivo* Testung lassen sich mit dieser Methode auch neue Substanzen ohne weiteres und in großer Anzahl untersuchen. Allerdings lässt sich aus einem Ergebnis der *in vitro* Testung nicht ohne weiteres auf seine Wirkung *in vivo* schließen.<sup>52</sup>

Für die *in vitro* Testung stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Sie basieren allesamt auf einer Kultur von *P. falciparum*, welche relativ einfach und ohne große technische Anforderungen möglich ist. Hämatokrit, Parasitämie und stadienabhängige Wirkung der Medikamente haben einen großen Einfluss auf das Ergebnis und sollten kontrolliert werden. Wird bei dem Verfahren eine Verdünnungsreihe angewendet, so erhält man nach Auswertung in der Regel eine sigmoide Dosis-Wirkungskurve.<sup>52</sup>

Die eigentliche Sensitivitätstestung beruht auf der Bestimmung des Parasitenwachstums bzw. deren Hemmung. Je nach Verfahren wird dies mikroskopisch (*WHO Microtest*), mittels radioaktiver Marker (*Isotopic Assay*), anhand der Enzymaktivität (*pLDH enzymatic assay*) oder durch einen *ELISA*, *enzyme linked immuno assay* (*pLDH DELI assay/ HRP2 Assay*) ermittelt.<sup>52</sup>

In unseren Untersuchungen wurde die Sensitivitätstestung mittels *HRP2 Sandwich ELISA* durchgeführt.

Die Vorzüge dieses Tests liegen zum einen in der großen Stabilität und Beständigkeit des nachgewiesenen Proteins *HRP2*, zum anderen in der hohen Sensitivität und in der relativ einfachen Handhabung. Bei dieser Methode wird ein histidin- und alaninreiches Protein (*HRP2*) des Parasiten nachgewiesen; die Menge dieses Proteins korreliert mit der Anzahl und Entwicklung der Parasiten. Die Parasiten werden über 72 Stunden kultiviert; dies hat den Vorteil, dass zusätzlich auch langsam wirkende Substanzen (wie Antibiotika) getestet werden können. Das Wachstum der Parasiten wird durch die *HRP2*-Messung im *ELISA* beurteilt.<sup>52</sup> *HRP2* wird gegen Ende des Zyklus gebildet. Ein weiterer Vorteil der Inkubation über 72 Stunden ist, dass sie physiologische Bedingungen besser nachahmt als Assays mit kürzeren Inkubationszeiten. Zudem führt eine längere Inkubation zu mehr Parasitenwachstum und somit auch zu mehr Produktion von *HRP2*. Dies impliziert deutlichere Ergebnisse in den Dosis-Wirkungskurven des auf *HRP2* basierenden Assays.<sup>68</sup>

Die Funktion des histidinreichen Proteins *HRP2* ist bislang noch nicht detailliert bekannt. Plasmodien exprimieren eine Reihe von histidinreichen Proteinen, welche – mit Ausnahme des *HRP2* – bei der Zytoadhärenz parasitenhaltiger Erythrozyten, den Mikrozirkulationsstörungen und der damit folgenden Ischämie verschiedener Organe eine Rolle spielen könnten.<sup>68</sup>

Für *HRP2* wird angenommen, dass es als Katalysator der  $\beta$ -Hämatinbildung fungiert und dadurch in den Häm-Entgiftungsprozess eingebunden ist.<sup>69</sup>

### **1.8.6. Prävention der Entstehung von Resistenzen**

Maßnahmen, welche der Malariakontrolle dienen, haben einen indirekten Einfluss auf die Ausbildung von Resistenzen. Erkranken weniger Menschen an Malaria, so werden unter Umständen weniger Medikamente benötigt und der Medikamentendruck sinkt. Zu diesen Maßnahmen gehören die Vektorkontrolle durch Anwendung von imprägnierten Moskitonetzen, Einschränkung der Brutmöglichkeiten, der persönliche Schutz (z. B. durch Repellentien), die Chemoprophylaxe und die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes.<sup>62</sup>

Eckpfeiler der Resistenzprävention sind die Reduktion des Medikamentendrucks und die Kombinationstherapie. Die Reduktion des Medikamentendrucks setzt eine gute Diagnostik und einen sinnvollen und kontrollierten Umgang mit den verfügbaren Medikamenten voraus. Da medizinische Anordnungen im Rahmen der Therapie der Malaria häufig nicht befolgt werden (*Non-Compliance*), wird ein Vorgehen nach dem Prinzip der „direkt beobachteten Therapie“ (*DOT = directly observed therapy*) diskutiert, wie es bei Kontrollprogrammen der Tuberkulose, der Geschlechtskrankheiten und AIDS durchgeführt wird.<sup>62</sup>

Eine Verlaufsbeobachtung bereits therapierter Patienten könnte frühzeitig ein Therapieversagen oder Rückfälle aufzeigen und die Patienten könnten erneut behandelt werden, was die Ausbreitung von resistenten Stämmen verringern würde.<sup>62</sup>

Bei der Kombinationstherapie mit einem Artemisinin (*ACT*) verlangsamt der unabhängige Wirkmechanismus der Medikamente die Entstehung einer Resistenz<sup>60</sup>, jedoch kann die Kombination mit einem bereits ineffizienten Medikament die Entstehung und Ausbreitung der Artemisininresistenz unterstützen.<sup>4</sup>

Eine kontinuierliche Sensitivitätstestung der antiparasitären Wirkstoffe ist zwingend notwendig, um Resistenzen frühzeitig zu erkennen und Leitlinien anzupassen.

Weitere Herangehensweisen sind die Umkehrung von Resistenzen (*resistance reversal*) und die chemische Veränderung bereits erprobter Medikamente.

Verapamil zählt zu den am besten erforschten Chemosensitoren für Chloroquin. Bekannt wurde die Substanz durch seine frequenzmodulierende und antihypertensive Wirkung mittels Blockade von Calciumkanälen. Die Umkehr der Chloroquinresistenz basiert jedoch auf einem davon unabhängigen Mechanismus: Man nimmt an, dass Verapamil und die meisten anderen Chloroquinresistenzumkehrstoffe mit dem Chloroquin um die Bindungsstelle des Transporters *PfCRT* konkurrieren und so die Chloroquinaktivität erhöhen. Diese Chemosensitoren sind weiterhin Gegenstand der Forschung und wurden bisher nicht im Menschen erprobt. Sowohl die Extrakosten, die zur normalen Therapie dazukommen würden, als auch die Toxizität der Wirkstoffe stellen eine Herausforderung dar.<sup>70</sup>

Ein Fortschritt in diese Richtung wurde mit der Entwicklung von T 3.5 gemacht, einem Acridon, das zum einen chemosensitivierend auf Chinolinmedikamente wirkt und zum anderen einen ausgeprägten Synergismus zu Chinin und Piperaquin aufweist.<sup>71</sup>

## **1.9.Vorstellung der getesteten Wirksubstanzen**

### **1.9.1.Ferroquin – ein neues Medikament in Entwicklung**

In den letzten Jahren hat das Interesse an metallhaltigen Chemotherapeutika zugenommen. Diese Entwicklung kann zum Teil durch den Erfolg metallhaltiger Medikamente (z. B. Cisplatin oder Ferrocifen) im Bereich der Tumorthherapie erklärt werden.<sup>72,73</sup>

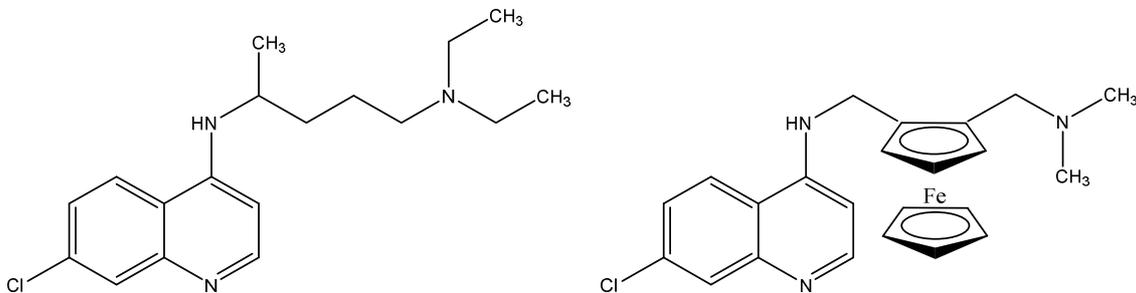
Ferroquin ist das erste metallhaltige Medikament gegen Malaria. Bei der Erforschung metallhaltiger Malariamedikamente wurde das in Ferroquin verwendete Ferrocen auch mit anderen gängigen Antimalariamedikamenten kombiniert; einige 7-Chloro-4-Aminochinolinderivate waren erfolgversprechend, jedoch ist Ferroquin unter all diesen Ferrocenkonjugaten das potenteste Medikament.<sup>73</sup> Folgende Idee liegt der Entwicklung des Ferroquins zugrunde: Ein bereits in seiner Wirkung erforscht und erprobtes Antimalariamittel (Chloroquin) wird mit einer Metalleinheit kombiniert, welche im Idealfall die Wirkung des Grundmedikamentes verbessert und bei ähnlicher Verträglichkeit auch in resistenten Parasiten wirkt.<sup>73,74</sup> In den laufenden Studien zählt Ferroquin zu den aussichtsreichsten Kandidaten, da es auch bei chloroquinresistenten *P. falciparum* Stämmen wirksam ist.<sup>73,75</sup>

Ferroquin {7-chloro-4-[(2-N,N'-imethylaminomethyl)ferrocenylmethylamino]quinolin} wurde 1994 von Brocard, Biot und Kollegen entdeckt.<sup>73,76</sup>

Es wird von Sanofi-Aventis produziert und befindet sich (in Kombination mit Artesunat) zurzeit in der klinischen Entwicklung der Phase 2.<sup>vgl. 77</sup>

### **Aufbau und Eigenschaften**

Ferroquin ist ein Chloroquinderivat, das eine Ferroceneinheit in der Seitenkette enthält.<sup>72</sup> Es weist eine geringe Zytotoxizität auf, gilt als stabiles Molekül und ist sehr lipophil, was zum einen eine gute Membranpassage und zum anderen eine hohe Affinität zu Hämatin zu begünstigen scheint.<sup>72,75,78</sup> Das Molekül wird durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke stabilisiert.<sup>79</sup> Die Ferrocengruppe erhöht die Lipophilie, verändert die Basizität und ist ein Elektronendonator.<sup>80</sup> Die Flexibilität der Seitenkette wird durch die starre Ferroceneinheit reduziert, was mit einer erhöhten Entropie einhergeht.<sup>79</sup>



**Abb. 3 Chloroquin vs. Ferroquin**  
gezeichnet mit ChemBioDraw Ultra Trial

Brocard et al. zeigten, dass die Einbindung des Ferrocenrestes in die Seitenkette eine höhere Wirksamkeit hat, als bei Analoga in welchen sich der Ferrocenrest am Ende der Seitenkette oder am Chinolinmolekül befindet.<sup>72,81</sup>

Mit Hilfe des 4-Aminochinolinrings erreicht das Molekül eine hohe Konzentration am Wirkort der Substanz, der Nahrungsvakuole des Parasiten.<sup>82</sup>

Biot, Chavain et al. gehen in ihrer Studie von einer 50fach höheren Konzentration von Ferroquin in der Nahrungsvakuole im Vergleich zu Chloroquin aus.<sup>83</sup>

### **Wirkmechanismus**

Ferroquin ist mit Chloroquin verwandt; die Verwandtschaft spiegelt sich zumindest teilweise in seinem Wirkmechanismus wider<sup>80</sup>: Ferroquin bindet ebenso wie Chloroquin an Häm und hemmt die Hämoglobinbildung, was dann vermutlich durch das toxische Häm zu Membranschäden und dem Absterben der Parasiten führt.<sup>80</sup>

Die  $\beta$ -Hämatin Hemmaktivität von Ferroquin liegt deutlich über der des Chloroquins.<sup>80</sup> Die Existenz einer Kreuzresistenz zwischen Ferroquin und Chloroquin wird kontrovers diskutiert. In mehreren Studien wurde eine signifikante Korrelation zwischen den  $IC_{50}$ -Werten von Ferroquin und Chloroquin festgestellt.<sup>84-87</sup> Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine erhöhte Ausgangsparasitämie eine Korrelation der beiden Wirkstoffe bedingen kann. Die 2004 in Lambaréné durchgeführte *in vitro* Testung erbrachte keinen Hinweis auf eine Kreuzresistenz zu Chloroquin.<sup>88</sup> Sowohl bei chloroquinsensiblen als auch bei chloroquinresistenten Stämmen zeigte Ferroquin eine höhere antiparasitäre Aktivität als Chloroquin, was vermuten lässt, dass der Ferrocengruppe eine eigenständige Rolle zufällt und diese nicht nur – wie zunächst angenommen – die Wirkung des Chloroquins verstärkt.<sup>85,89</sup>

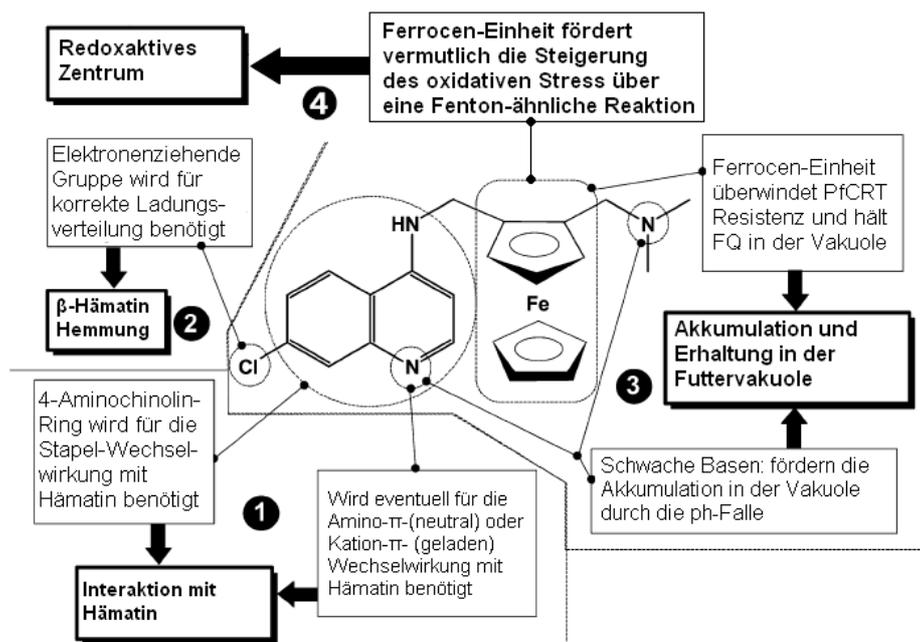


Abb. 4 Ferroquin: Strukturbezogener Wirkmechanismus<sup>73,80</sup>  
Abdruck mit freundlicher Erlaubnis von John Wiley and Sons und American Chemical Society,  
Übersetzung von Sarah Knittel

Ferroquin unterscheidet sich von Chloroquin auch durch sein Redoxverhalten. Möglicherweise wirkt die Ferrocengruppe durch Bildung von Hydroxylradikalen mittels einer Fenton-ähnlichen Reaktion im sauren Milieu der Nahrungsvakuole direkt antiparasitisch.<sup>90,91</sup>

Allerdings benötigt die Ferrocengruppe zur Entfaltung ihrer Wirkung das Aminochinolingerüst, welches den Transport in die Nahrungsvakuole gewährleistet.<sup>82</sup> Ferroquin wird hauptsächlich über eine Oxidation (mittels CYP Isoenzyme 2C9, 2C19, 3A4 und vermutlich 2D6) metabolisiert. Dabei entstehen Mono-N-demethyl Ferroquin und Di-N,N-demethyl Ferroquin.<sup>92</sup>

### **Resistenzen**

In chloroquinresistenten Stämmen führt ein Transportprotein (*P. falciparum* Chloroquin Resistenztransporter, kurz *PfCRT*) den Transport von Chloroquin aus der Nahrungsvakuole durch und reduziert auf diese Weise dessen Ansammlung in der Vakuole.

Zurzeit wird angenommen, dass Ferroquin durch die lipophile Metalleinheit eine geringere Affinität für dieses Transportprotein besitzt, oder dieses sogar blockiert, was eine wirksame Ansammlung in der Nahrungsvakuole ermöglicht.<sup>72,80</sup>

In der Studie von Henry, Briolant, Fontaine, die sich mit den Polymorphismen der verschiedenen Transportproteine befasste, wurde gezeigt, dass Ferroquin im Gegensatz zu Monodesethylamodiaquin, Chinin, Chloroquin und Mefloquin keine Verringerung der Wirkung bei Polymorphismen dieser Transporter zeigte.<sup>76</sup>

Bisher konnte keine Resistenz gegen Ferroquin im *in vitro* Experiment induziert werden.<sup>93</sup>

Eine Resistenzentwicklung ist jedoch möglich. Eine erhöhte  $IC_{50}$  wurde vor allem in Multiresistenzgebieten beobachtet.<sup>94</sup> In mehreren Studien konnten Korrelationen zwischen der Wirksamkeit von Chloroquin und Ferroquin gezeigt werden. Allerdings waren diese Korrelationen zu schwach, als dass man von einer Kreuzresistenz sprechen könnte.<sup>85,86</sup> Eine mögliche Erklärung für die Korrelation ist, dass die Ausgangsparasitämie und nicht der Parasitenstamm der entscheidende Faktor ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine variable Ausgangsparasitämie mit einer starken Korrelation zwischen Ferroquin und Chloroquin bezüglich der Wirksamkeit einhergeht, wenn die Assoziation nicht für die Ausgangsparasitämie korrigiert wird. Umso wichtiger ist es, die *in vitro* Testung zu standardisieren um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.<sup>88</sup>

Die lange Halbwertszeit von 20 Tagen<sup>95</sup> begünstigt eine Resistenzentwicklung, allerdings vereinfacht sie die Gabe und es bleibt zu hoffen, dass Mutationen, die eine Ferroquinresistenz erzeugen sich aufgrund der Nachteile für den Parasiten in Bezug auf „fitness“ nicht durchsetzen können.<sup>73</sup>

## 1.9.2.Chloroquin

### ***Geschichte***

Chloroquin zählt neben Chinin und den Artemisininen zu den bedeutsamsten antiparasitären Wirkstoffen. Es wurde 1934 – zunächst unter dem Namen Resochin – aus einer Verknüpfung von Chinolinen mit einer Diethylaminopentylaminseitenkette von Bayer synthetisiert. Nach ersten klinischen Studien wurde das Medikament für zu toxisch erklärt und erst nach dem zweiten Weltkrieg durch die USA wiederentdeckt, umbenannt, erneut getestet und schließlich vielfach verwendet. In den 1950er und 1960er Jahren stand es in den Leitlinien der WHO für die Therapie der Malaria an erster Stelle. Die Vorteile dieses Medikamentes liegen in seiner einfachen Anwendung, guten Verträglichkeit, Wirksamkeit und nicht zuletzt in der Verfügbarkeit aufgrund des geringen Preises. Durch die Pinotti-Methode (Verabreichung von Chloroquin oder Pyrimethamin in Kochsalzlösung) fand Chloroquin breite Anwendung in der Prophylaxe der Malaria.<sup>96,97</sup> Es wurde jedoch vermutet, dass die breite Anwendung und unzureichende Wirkspiegel die Resistenzentwicklung gegen Chloroquin begünstigten. Außerdem wurde eine fehlende Wirkung hinsichtlich des ursprünglichen Ziels – der Eradikation der Malaria – beobachtet. Dies geht vermutlich darauf zurück, dass die Pinotti-Methode bei Säuglingen und Schwangeren keine Anwendung fand und bei Kindern häufig keine ausreichenden Wirkspiegel erreicht wurden.<sup>98</sup>

In den 50er und 60er Jahren wurde von der WHO ein Programm gegen die Ausbreitung der Malaria begonnen. Ziel war die Ausrottung der Malaria durch Vektorbekämpfung mittels DDT und Behandlung von infizierten Personen mit Chloroquin.<sup>99</sup>

Der Anstieg der Resistenz gegen Chloroquin und DDT, wachsende toxikologische Bedenken gegenüber DDT und im Anschluss daran das Verbot seiner Anwendung führten zum Scheitern der Kampagne.<sup>72,99</sup>

Heute hat *P. falciparum* vor allem in hoch- und holoendemischen Gebieten Resistenzen gegen Chloroquin entwickelt und das Medikament wird dort kaum noch verwendet.

### **Wirkmechanismus**

Der Wirkmechanismus der 4-Aminochinoline beruht auf einer pH-abhängigen Konzentration in der Nahrungsvakuole.<sup>100</sup> Chloroquin wirkt auf die erythrozytäre Phase der Parasiten.<sup>101</sup> In diesem intraerythrozytären Stadium wird Hämoglobin in der Nahrungsvakuole abgebaut; dabei werden für den Parasiten lebenswichtige Aminosäuren freigesetzt.<sup>102</sup> Während des Hämoglobinabbaus entsteht als Nebenprodukt Ferriprotoporphyrin IX (Häm), das zu Hämozoin (Malariapigment) komplexiert, welches für den Parasiten ungiftig ist. Chloroquin hemmt diesen Entgiftungsprozess, was – vor allem durch Membranschäden und oxidativen Stress – zum Absterben der Parasiten führt.<sup>96</sup>

### **Metabolismus**

Chloroquin wird zum großen Teil über die Isoenzyme CYP2C8, CYP3A4 und CYP2D6 abgebaut. Dabei entsteht sein Hauptmetabolit N-desethylchloroquin.<sup>103</sup>

### **Resistenzen**

Die ersten Chloroquinresistenzen wurden bereits 1957 an der Grenze von Kambodscha zu Thailand entdeckt.<sup>104</sup> Faktoren, wie z. B. der hohe Selektionsdruck durch Chloroquin, die hohe Übertragungsrate und ein hoher Anteil malarianaiver Individuen in der Bevölkerung begünstigten das Auftreten und die Ausbreitung der Chloroquinresistenz.<sup>105</sup> Fast zeitgleich traten Resistenzen in Kolumbien und Venezuela auf. In Asien beschränkte sich die Resistenz zunächst auf die indochinesische Halbinsel. Während der nächsten Jahrzehnte breitete sie sich rasch aus über die hochendemischen Malariagebiete in Asien, Südamerika und Afrika.<sup>104</sup>

Trotz intensiver Forschung sind die genauen Mechanismen, die zur Resistenz bei *P. falciparum* gegenüber Chloroquin führen nicht im Detail geklärt.

Sicher ist jedoch, dass Mutationen in den beiden Genen *PfMDR1* und in *PfCRT* dabei eine Rolle spielen. *PfCRT* und *PfMDR1* kodieren für membranständige Proteine der Nahrungsvakuole. In chloroquinresistenten Parasiten findet sich für *PfCRT* eine K76T Mutation – die Aminosäure Lysin (K), die sich an Position 76 der Polypeptidkette befindet, wird durch die Aminosäure Threonin (T) ersetzt.<sup>63,106,107</sup>

Chloroquinresistente Parasiten zeigen eine etwa 4-10fach geringere Konzentration von Chloroquin in der Nahrungsvakuole im Vergleich zu den sensiblen *P. falciparum*-Stämmen, was dem Aufbau einer effektiven Chloroquinkonzentration am Wirkort entgegenwirkt.<sup>107</sup>

Folgende Theorien existieren:

1. Chloroquin wird über einen Kanal passiv aus der Vakuole transportiert. Dieser Kanal wird bei chloroquinsensiblen Parasiten durch die positiv geladene Aminosäure Lysin blockiert.<sup>107</sup>

2. *PfCRT* ist eine membranständige Pumpe, die Chloroquin primär oder sekundär aktiv aus der Vakuole transportiert.<sup>107</sup>

3. *PfCRT* funktioniert nach dem Kotretransporter Prinzip und befördert in einem Symport Wasserstoffprotonen und

Chloroquin entlang dem Protonengradienten aus der Vakuole.

Bei den chloroquinsensiblen Parasiten kann der Transporter nur Chloroquin aus der Vakuole befördern, wenn dafür wieder ein Chloroquin in die Vakuole befördert wird.

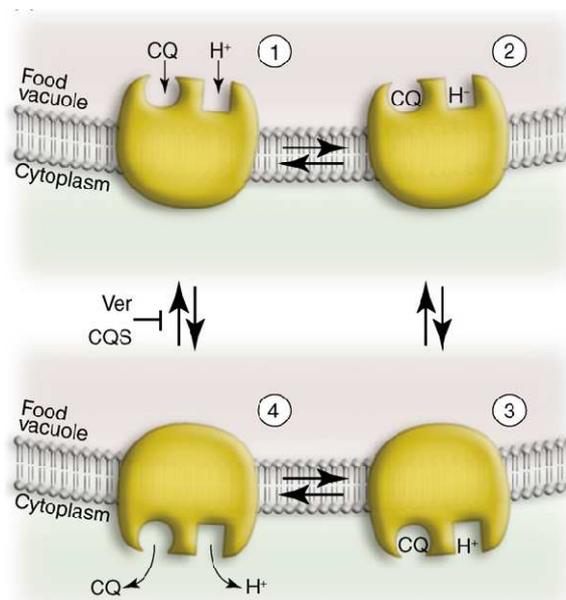


Abb. 5 Modell eines Kotreportes<sup>107</sup>  
mit freundlicher Erlaubnis von Elsevier

Bei den resistenten Stämmen allerdings kann der Transporter von der unbeladenen Form 4 in die unbeladene Form 1 übergehen (Abb. 5) und ermöglicht so einen Nettoausstrom von Chloroquin.<sup>107</sup> Nach welchem Model das *PfCRT*-Protein nun definitiv funktioniert bleibt noch zu klären.

Die Chloroquinresistenz kann durch eine Reihe von Substanzen, wie z. B. Verapamil, zum Teil wieder aufgehoben werden. Allerdings liegt die Effektivdosis dieses „Resistenzumkehrers“ außerhalb seiner therapeutischen Breite für die Anwendung im Menschen.<sup>108</sup>

### **1.9.3.Amodiaquin**

Amodiaquin ist ein Chloroquinderivat mit einem Phenylsubstituenten an der 4-Aminogruppe. Es wird angenommen, dass die dadurch entstehende aromatische Seitenkette zu einer erniedrigten Bindungsaffinität zum Chloroquinresistenz-Transportprotein führt. In nicht endemischen Ländern wird es aufgrund der gravierenden, aber sehr seltenen Nebenwirkungen wie Leberschäden und Agranulozytose, die vor allem bei der länger andauernden prophylaktischen Gabe auftreten können, kaum mehr verwendet.<sup>96</sup> In den afrikanischen Ländern wird das Medikament jedoch weiterhin zur Therapie von akuten Infektionen verabreicht – häufig in Kombination mit Artesunat oder Sulfadoxin/Pyrimethamin.<sup>96</sup>

#### ***Wirkmechanismus***

Amodiaquin ist ein Prodrug; seine Wirkung beruht auf dem wirksamen Metaboliten Monodesethylamodiaquin.<sup>109</sup>

Amodiaquin reichert sich – eventuell unterstützt durch eine spezifische Bindungsstelle – in der Nahrungsvakuole an. Die im Vergleich zu Chloroquin stärkere Anreicherung wird für die größere Aktivität gegenüber *P. falciparum* verantwortlich gemacht.<sup>110</sup>

Vermutet wird ein Chloroquin-ähnliches Wirkprinzip: Amodiaquin soll in den Hämoglobinabbau eingreifen und die Polymerisierung von Häm (Ferriprotoporphyrin IX) zu Hämozoin verhindern.<sup>111</sup>

### **Resistenzen**

Trotz einer bekannten Kreuzresistenz zu Chloroquin besitzt Amodiaquin zurzeit noch eine befriedigende Wirksamkeit in den Chloroquinresistenzgebieten. Eine breite Anwendung in diesen Gebieten lässt jedoch einen schnellen Wirkungsverlust befürchten. Ein klinisches und parasitologisches Therapieversagen unter Amodiaquinmonotherapie wurde in Studien in Afrika, Asien und Südamerika beobachtet.<sup>104</sup>

Genetische Studien über *P. falciparum* zeigen, dass unterschiedliche mutierte *PfCRT* Haplotypen mit den individuellen Wirkstärken von Chloroquin und Amodiaquin assoziiert sind. Die *PfCRT* Haplotypen *CVIET* und *SVMNT* (benannt nach den Aminosäuren der Kodons 72-76) zeigen eine ausgeprägte Resistenz gegen Monodesethylamodiaquin. Während *CVIET* in fast allen Malariaendemiegebieten zu finden ist, ist das Vorkommen von *SVMNT* (bislang beschränkt auf Brasilien, Indien, Papua Neu Guinea und die Philippinen) erst seit wenigen Jahren auch für Afrika bekannt.<sup>109,112</sup>

## **1.9.4. Die Arylaminoalkohole Chinin und Mefloquin**

### **Chinin**

Schon im 17. Jahrhundert wurde die Rinde des Baumes *Cinchona peruviana* in pulverisierter Form zur Therapie gegen Malaria eingesetzt. 1820 gelang es, das Alkaloid Chinin aus der Chinabaumrinde zu isolieren.

Die Malaria stellt eine der ersten Krankheiten dar, die mit einem reinen chemischen Mittel (Chinin) und Ende des 19. Jahrhunderts mit einem synthetisierten Wirkstoff (Methylenblau) therapiert wurde. Konsequenterweise gehören Plasmodien auch zu den ersten Spezies, die Resistenzen gegen die Therapeutika entwickelten und somit die Wirkstrategien der Medikamente überlisteten.<sup>96,97</sup>

Obwohl Chinin schon sehr lange verwendet wird, zählt es heute immer noch zu den wichtigsten Antimalariamedikamenten. Wegen seiner guten Wirksamkeit wird es insbesondere in der Therapie der komplizierten *P. falciparum* Malaria häufig parenteral angewendet.<sup>96</sup>

In den Leitlinien der WHO wurde Chinin im Jahr 2006 bei der schweren Malaria bei Erwachsenen durch Artesunat (i. v. oder i. m. verabreicht) ersetzt.<sup>22</sup> In klinischen Studien, wie SEAQUAMAT in Asien und AQUAMAT bei afrikanischen Kindern wurden Artesunat und Chinin in der Therapie der schweren Malaria verglichen. Es zeigten sich signifikant weniger Todesfälle und Komplikationen bei den mit Artesunat behandelten Patienten.<sup>48</sup>

### **Mefloquin**

Mefloquin zählt als Chininderivat zu den synthetischen Arylaminoalkoholen.

Seit 1985 wird es in der Behandlung der Malaria eingesetzt.<sup>96</sup> Heute findet es wegen seiner langen Halbwertszeit vor allem in der Malariaprophylaxe Verwendung. Es wirkt blutschizontozid auf die erythrozytäre Phase aller humanpathogenen Plasmodien, inklusive *P. knowlesi*.<sup>113</sup>

### **Wirkmechanismus**

Für Chinin und Mefloquin wird ein ähnlicher Wirkmechanismus angenommen.

Es wurde vorgeschlagen, dass diese Substanzen an Phospholipidstrukturen der Parasiten binden und den zellulären Transport durch Hemmung der Andockung von Vesikeln verhindern.<sup>114</sup>

Darüberhinaus wird angenommen, dass Chinin und Mefloquin das Membranrecycling hemmen und dadurch zum Absterben der Parasiten führen.<sup>114</sup> Der genaue molekulare Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht bekannt.

Interessanterweise verhalten sich die Hemmwerte von Mefloquin und Chloroquin häufig reziprok, d. h. eine Chloroquinresistenz geht oft einher mit einer erhöhten Suszeptibilität für Mefloquin. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass der Wirkort von Mefloquin nicht in der Nahrungsvakuole liegt – wie bei Chloroquin – sondern zum Beispiel im Zytosol der Parasiten oder an *PfCRT* bzw. *PfMDR1* direkt.<sup>115</sup>

## **Resistenzen**

### **Chinin**

Erste Chininresistenzen wurden bereits 1910 in Brasilien beschrieben.<sup>116</sup>

Zurzeit gibt es jedoch keine genauen Werte, die Aussagen über die Häufigkeit der Chininresistenz zulassen. Da die Einnahme von Chinin über 7 Tage – oder gegebenenfalls länger – erfolgt und sehr häufig von Nebenwirkungen wie Tinnitus, vorübergehender Gehörlosigkeit und Schwindel begleitet wird, ist es schwierig zwischen Therapieversagen wegen einer Chininresistenz oder auf Grund von mangelnder Compliance zu unterscheiden. In Afrika ist die Chininresistenz trotz jahrzehntelanger Anwendung nur schwach ausgeprägt. Die meisten Fälle eines Therapieversagens sind nicht korrekt dokumentiert oder lassen sich durch zu niedrige Dosierungen erklären.<sup>104</sup>

Eine kürzlich in Thailand durchgeführte Studie zeigt jedoch einen deutlichen Anstieg der  $IC_{50}$ -Werte für Chinin, Mefloquin und Artemisinin im Vergleich zu den Ergebnissen der vergangenen Jahre. Bei 20 von 44 Parasitenisolaten konnte eine hochgradige Chininresistenz nachgewiesen werden. Diese Resistenz ist wahrscheinlich ein Nebeneffekt des Anstiegs der Mefloquinresistenz, zumal Chinin in dieser Gegend schweren und komplizierten Malariafällen vorbehalten ist.<sup>117</sup>

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass es neben dem bisher angenommenen Resistenzmechanismus durch *PfCRT* noch weitere Faktoren gibt, die bei der Resistenz für Chinin eine Rolle spielen: So wurde eine Region eines quantitativen Merkmals (*quantitative trait Locus*) auf Chromosom 7 von *P. falciparum* identifiziert, ein für eine Ubiquitintransferase kodierendes Gen, das eine zu *PfCRT* synergistische Funktion bei der Chininresistenz haben soll.<sup>118</sup>

### **Mefloquin**

Der erste Bericht über eine Mefloquinresistenz kam schon 1982 aus Thailand, als Mefloquin sich noch in der klinischen Testung befand.<sup>116,119</sup> Die Region um die thai-kambodianische und thai-burmesische Grenze bleibt einer der Brennpunkte der Mefloquinresistenz.<sup>113</sup> In manchen Gegenden in Thailand finden sich mittlerweile Therapieversagerraten von über 60 % unter Mefloquintherapie.<sup>104</sup>

Zwei Ursachen haben vor allem zur schnellen Entwicklung der Mefloquinresistenz beigetragen: (1) die lange Halbwertszeit von durchschnittlich 20 Tagen und (2) "die intensive Anwendung des chemisch verwandten Chinins vor der Einführung von Mefloquin."<sup>117</sup>

Neben dem asiatischen Raum sind Resistenzen für Mefloquin auch in Afrika und Südamerika beobachtet worden.<sup>104</sup> Die Mefloquinresistenz geht mit einer erhöhten Anzahl der Kopien des *PfMDR1* Gens einher. Dieses Gen kodiert für einen ATP-abhängigen Transporter, der in der Nahrungsvakuole der Parasiten lokalisiert ist.<sup>63</sup> Bestimmte Mutationen im *PfMDR1* Gen führen zu erhöhten Hemmwerten bei Mefloquin, Artesunat, Halofantrin, Chinin und Dihydroartemisinin.<sup>63</sup>

### **1.9.5.Artesunat**

Der Wirkstoff Artesunat ist ein semisynthetisches Artemisininderivat und gehört somit zu einer Wirkstoffgruppe, die sowohl blutschizontozide als auch gametozide Eigenschaften besitzt. Artemisinin wird aus dem einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) isoliert. Seine heilende Wirkung bei fieberhaften Erkrankungen war den Chinesen schon vor rund 2000 Jahren bekannt. Nach seiner Wiederentdeckung und klinischen Entwicklung wurde es 2001 als Kombinationspartner für langsam wirkende Chemotherapeutika (*ACT*) in die Therapieempfehlungen der WHO aufgenommen.<sup>9,96,120</sup>

Die Artemisinin-basierte Kombinationstherapie soll durch den Einsatz zweier Medikamente mit unterschiedlichen Wirk- und Resistenzmechanismen die Resistenzentwicklung reduzieren. Parasiten müssten also, um zu überleben, gleichzeitig Resistenzen gegen zwei Medikamente entwickeln; die Wahrscheinlichkeit dafür ist im besten Fall das Produkt der beiden einzelnen Wahrscheinlichkeiten und somit deutlich geringer als bei einer Monotherapie.<sup>22,121</sup>

Artesunat zeichnet sich zum einen durch seinen schnellen Wirkeintritt aus, zum anderen durch die kurze Eliminationszeit, die einer Resistenzbildung entgegenwirkt. Nachteilig sind die relativ hohen Therapiekosten, die sich durch die aufwändige Kultur und Extraktion von *Artemisia annua* erklären lassen.

Die kurze Halbwertszeit bedingt eine lange Therapiedauer (7 Tage) insbesondere bei der (von der WHO nicht mehr empfohlenen) Monotherapie.<sup>22</sup>

Das Medikament kann intravenös, intramuskulär, rektal oder oral verabreicht werden. Es gilt als ein sicheres und gutverträgliches Medikament und wird derzeit zu den potentesten Antimalariamitteln gezählt.<sup>9,96,121</sup>

### **Wirkmechanismus**

Neben der antiplasmodialen Aktivität, für die die Endoperoxidbrücke der Artemisinine unverzichtbar ist, zeigen sie auch eine potente antiproliferative Wirkung in Tumorzellen.<sup>121,122</sup>

Auch für die Artemisinine ist der genaue Wirkmechanismus noch nicht bekannt.

Es wird angenommen, dass die Artemisinine durch Häm oder freie Eisenionen aktiviert werden.<sup>123</sup> Für die daraufhin eintretende antiplasmodiale Wirkung existieren zurzeit mehrere Modelle:

1. Artemisinine verhindern die Bildung von ungiftigen Hämозoinkomplexen aus Häm,<sup>123-125</sup>
2. sie alkylieren *PfTCTP* (translationell kontrolliertes Tumorprotein) und andere Proteine,<sup>123,126-128</sup>
3. sie verursachen eine spezifische Hemmung der membranständigen Calcium-ATPase (*PfATP6*),<sup>129</sup>
4. sie beeinträchtigen über eine Membrandepolarisation der Mitochondrien deren Funktionen<sup>123,130</sup>
5. oder führen über eine Akkumulation in den Membranlipiden zu einer Zerstörung der Parasitenmembran.<sup>122,131,132</sup>

Keines dieser Modelle ist unter Malariaforschern vorbehaltlos akzeptiert.

### **Resistenzen**

In letzter Zeit häufen sich die Meldungen von artesunateresistenten *P. falciparum* Stämmen in Kambodscha und Thailand. Kann man hier schon von einer Resistenz sprechen?

Noedl war einer der ersten, der in seiner Studie (durchgeführt 2006-2007 in Westkambodscha) resistente Parasiten beschrieb. Bei diesen Parasiten fanden sich sowohl eine verlängerte Parasiteneliminationszeit als auch erhöhte  $IC_{50}$ -Werte für Artesunat.<sup>133</sup>

Zunächst wurde ein Versagen der Therapie im Zusammenhang mit Resistenzen gegenüber den Kombinationspartnern gesehen. Das häufig angewandte Mefloquin zeigt in der Gegend der thai-kambodschanischen Grenze ein hohes Resistenzvorkommen. Eine deutlich verlängerte Parasiteneliminationszeit ( $PCT = parasite\ clearance\ time$ ) der Kombinationstherapie und ein Isolat mit erhöhten  $IC_{50}$ -Werten für Artesunat und Mefloquin waren jedoch ernste Anzeichen einer drohenden Artesunatresistenz.<sup>134</sup>

Dondorp, Nosten et al. verglichen in ihrer Studie die Therapieverläufe (Artesunatmonotherapie und Artesunat gefolgt von Mefloquin) zweier Zentren – eines in Westkambodscha, das andere in Nordwestthailand. Bei den Patienten in Pailin, Kambodscha konnte eine reduzierte Artesunatempfindlichkeit *in vivo* und eine signifikant längere Parasiteneliminationszeit beobachtet werden. Diese korrelierte überraschenderweise nicht mit den  $IC_{50}$ -Werten der Parasiten. Das lässt sich durch die Tatsache erklären, dass die reduzierte Empfindlichkeit auf Artesunat nur die jungen, ringförmigen Stadien der Parasiten betrifft; da die Parasiten *in vitro* über einen ganzen Zyklus dem Medikament ausgesetzt sind, spiegelt sich das nicht zwingend in den  $IC_{50}$ -Werten wider. Die Autoren der Studie sprechen von einer Resistenz gegen Artesunat, die durch die deutlich verlängerte Parasiteneliminationszeit charakterisiert ist.<sup>135</sup> Im Gegensatz zu früheren Studien, in denen ein Zusammenhang zu einer Resistenz bei Mefloquin vermutet werden konnte, weisen sie daraufhin, dass die Kombinationstherapie Artesunat/Mefloquin trotz Artesunatresistenz sehr gute Ergebnisse erzielte. In Kambodscha sind die Artemisinine seit mehr als 30 Jahren als Monotherapie erhältlich und werden trotz Bemühungen des Gesundheitsministeriums von Kambodscha immer noch zum Großteil in Monotherapie verwendet. Dies und die genetischen Eigenschaften der Parasiten aus Kambodscha sind als bedeutende Faktoren bei der Entstehung und Verbreitung der Artesunatresistenz zu sehen.<sup>135</sup>

Reduzierte Empfindlichkeiten der Parasiten gegenüber Artemisininderivaten wurden schon 2005 aus Französisch-Guyana berichtet. Interessanterweise ist dies das einzige Land Südamerikas, in welchem eine Infektion mit *P. falciparum* häufiger diagnostiziert wird als die mit *P. vivax*. Seit 2002 gilt dort die Kombinationstherapie Arthemeter/Lumefantrin als Goldstandard in der Therapie der Malaria. Es überrascht nicht, dass sämtliche Isolate, die eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber den Artemisininderivaten zeigten, aus Gebieten stammten, in denen ein unkontrollierter Einsatz von Artemisininen stattfindet.<sup>136,137</sup>

Ob und wie die niedrige Empfindlichkeit im Genom kodiert wird, war bislang nicht bekannt.<sup>138</sup> Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass die Resistenz von Artemisininderivaten durch eine Mutation im Gen für das Kelch-Protein K13 zustande kommt. Dies wurde durch eine Analyse des Genoms gezüchteter artemisinresistenter Parasiten und den genetischen Vergleich mit Parasitenstämmen aus Gebieten mit hohem Resistenzvorkommen festgestellt. In Zukunft könnte diese Mutation als molekularer Marker für eine Artemisininresistenz dienen.<sup>139</sup>

Im Januar 2011 lancierte die WHO einen Plan zur Eindämmung der Artesunatresistenz („*Global Plan for Artemisinin Resistance Containment*“), dessen Ziel es ist, die weitere Ausbreitung dieser Resistenz zu verhindern und die ACT als wirksame Therapie der unkomplizierten Malaria sowie Artesunat i. v. zur Behandlung der schweren Malaria zu erhalten.<sup>138</sup>

## 1.10.Fragestellungen

### **Resistenzlage und Untersuchung auf Kreuzresistenzen**

In dieser Arbeit stelle ich den aktuellen Stand der Resistenzlage in Lambaréné dar und untersuche die getesteten Medikamente auf Korrelationen untereinander. Die Hemmwerte der Wirkstoffe werden hierbei im Zusammenhang zu Testungen der letzten Jahre betrachtet und bewertet.

Dies ist besonders für Chloroquin interessant: Hat sich die Resistenzlage nach Modifizierung der Leitlinien zur Malariatherapie in Gabun verändert?

### **Gegenüberstellung $IC_{50}$ vs. Parasiteneliminationszeit**

Die Parasiteneliminationszeit (*PCT*) und die  $IC_{50}$ -Werte der beiden Studienarme (Ferroquinmonotherapie und Artesunat-Ferroquin-Kombinationstherapie) werden gesondert einer Korrelationsanalyse unterzogen. Die mittels *in vitro* Testung gewonnenen Daten ( $IC_{50}$ ) werden somit einer klinischen Variable (Parasiteneliminationszeit) gegenübergestellt. Dies soll aufzeigen, in wieweit *in vivo* Ergebnisse mit *in vitro* Daten assoziieren bzw. ob die einfachere *in vitro* Testung die *PCT* prognostizieren kann.

### **Analyse der Therapieversager**

Die  $IC_{50}$ -Werte der Therapieversager unter Ferroquinmonotherapie ( $n = 3$ ) werden gesondert betrachtet, sie können Aufschluss über die Resistenzen gegen Ferroquin geben.

### **Hypothesen:**

1. Die Gruppe der Kombinationstherapie weist eine deutlich kürzere Parasiteneliminationszeit auf.
2. Es findet sich weiterhin eine ausgeprägte Resistenz für Chloroquin.
3. Es können keine Resistenzen für Amodiaquin, Artesunat, Chinin, und Ferroquin nachgewiesen werden, insbesondere findet sich kein Hinweis auf eine Kreuzresistenz von Ferroquin zu Chloroquin.
4. Die  $IC_{50}$ -Werte der Wirkstoffe Artesunat und Ferroquin stehen in Zusammenhang mit der Parasiteneliminationszeit.

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1. Material

**Tabelle 1: Plastikmaterialien und anderes Verbrauchsmaterial**

Einmalhandschuhe aus Latex	Cooper Cooperation pharmaceutique française
Einmallynzetten ACCU-CHECK®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
ELISAplatten 96 well Costar 3590	corning incorporated USA
Filterpapier für Giemsa MN 615 ¼ Ø 240 mm	Machery-Nagel, Deutschland
Multifly®-Set sterile 21 G	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Multifly®-Set sterile 23 G	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Objekträger 76mm*26 mm ISO 8037	RS France
Parafilm PM 999	Pechiney Plastic Packaging, Menasha WI 54952
Pipettenspitzen 201-1000 µl (blau)	greiner bio-one
Pipettenspitzen (gelb) epTIPS 2-200 µL	Eppendorf
Pipettenspitzen (transparent) safe seal tips premium 0,1-10 µl	biozym
Schnelltest Paracheck Pf®	Orchid Biomedical Systems, Verna, Goa, Indien
S-Monovette® EDTA KE/1,2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette® Li-Heparin 1,2/5,5/9 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
sterile 96 well Kulturplatten mit Deckel Microtest TM 353075	Becton Dickinson Labware USA
Zentrifugenröhrchen ( <i>Falcons</i> )	BD Biosciences
70%tiger Alkohol zur Desinfektion	
Abwurf	
Klebefolien zum Versiegeln der ELISA-Platten	
Petrischalen	
Stauschlauch	
Wattetupfer	

**Tabelle 2: Geräte**

12-Kanalpipette 20-200 µl Discovery comfort	ABI med
Aufsätze für Pipettierhilfe 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated Costar
ELISAreader Original Multiskan ID 064	Thermo Electron Corporation
geeichte 10 µl Pipette	CLINIPET (CP 10, P101)
Biosicherheits-Kabine ( <i>Hood</i> )	NUAIRE
CO <sub>2</sub> Inkubator mit Wassermantel	HEPA Class 100
magnetischer Heizrührer	Heidolph MR Hei-Tec
Feinwaage 440-33	KERN
Mikroskop Eclipse E 200	Nikon

Pentra 60	Horiba ABX Diagnostics
Pipette blau 100-1000 µl	ABI med
Pipette gelb 20-200 µl	ABI med
Pipette rot 0,5-10 µl	ABI med
Pipettierhilfe pipetboy accu	IBS integra biosciences
Rührfisch Magnetstäbchen	ROTH, Karlsruhe
Trockner Incubator 40 °C Typ 405	MELAG
Wasserbad	LAUDA
Zentrifuge, Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen
Kerzentopf ( <i>candlejar</i> )	

### ***Material für die Giemsa Färbung***

Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung MERCK

Pufferlösung nach WEISE pH 7,2 MERCK

### ***Komplettmedium für die Parasitenkultur:***

RPMI Medium 1640 SIGMA® Sigma Aldrich Chemie

500 µl Gentamycin

6 ml L-Glutamin

12 ml Hepes (SIGMA)

50 ml Albumax

### ***für 500 ml Albumax:***

5,2 g RPMI I (GIBCO)

500 µl Gentamycin (50 mg/ml)

2,98 g HEPES (SIGMA)

1,67 g NAHCO<sub>3</sub>

1 g Glukose

0,1 g Hypoxanthin

25 g Albumax II Pulver (GIBCO)

Die Reagenzien wurden auf 500 ml und einen pH 7,2-7,4 mit destilliertem Wasser aufgefüllt und anschließend steril durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

### ***Materialien zur Herstellung des SAG-Mannitols***

Für 100 ml SAG Mannitol wurden

900 mg Glukosemonoydrat

21,5 mg Adeninhydrochlorid

525 mg Mannitol

877 mg NaCl

in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst und anschließend gefiltert.

Für 200 ml Erythrozytenpellet wurden 100 ml SAG-Mannitol verwendet.

### ***Medikamente für die Kulturplatten***

#### ***Stammlösungen***

Artesunat (100 mM) 38,4 mg in 1 ml 70%igem Ethanol (Sanofi Aventis, Frankreich)

Amodiaquin dihydrochlorid dihydrate (100 mM) 46,9 mg in DMSO (SIGMA)

Ferroquin (2,5 mM) in DMSO (Sanofi Aventis, Frankreich)

Mefloquin hydrochloride (100 mM) in Methanol (SIGMA)

Chinin Hemisulfate salt (100 mM) 37,5 mg in Methanol (SIGMA)

Chloroquin Diphosphate salt (100 mM) in Aqua dest. (SIGMA)

SAG-Mannitol, die Albumaxlösung sowie die Stammlösungen für die Medikamente wurden freundlicherweise von Serena Tschan, AG Mordmüller, Tübingen nach Protokoll<sup>140</sup> hergestellt und nach Lambaréné gesendet.

Die Stammlösungen wurden in Komplettmedium verdünnt um

Medikamentenlösungen folgender Konzentrationen zu erhalten:

Artesunat 180 nM, Amodiaquin 1,35 µM, Chinin 90 µM, Chloroquin 9 µM

Ferroquin 630 nM, Mefloquin 1,53 µM.

### **Reagenzien für den ELISA**

PBS GIBCO invitrogen Cooperation

BSA SIGMA® Sigma Aldrich Chemie

Monoklonaler IgM Antikörper von (MPFM-55A) Immunology consultants Laboratory

Tween 20 SIGMA® Sigma Aldrich Chemie

Monoklonaler IgG<sub>1</sub> Antikörper (MPFG-55P) Immunology consultants Laboratory

chromogenes Substrat (TMB chromogen) Kem-En-Tec diagnostics

### **Für 500ml PBS-Lösung (phosphat buffer solution)**

wird eine Tablette PBS in 500 ml destilliertem Wasser mit Hilfe des magnetischen Rührers aufgelöst.

### **Die Blockierungslösung**

wird aus PBS Lösung (ml) und

2 % BSA (bovine serum albumine) (g) im Verhältnis 100:2 hergestellt.

Für eine Platte werden 20ml Blockierungslösung benötigt.

Die Lösung wird am Vortag angesetzt und bis zum Assay am nächsten Tag bei 4 °C gelagert.

## **2.2.Methoden**

### **2.2.1.Die Studienpopulation**

#### **Screening der Patienten**

Die in die Studie „Dose Ranging Study of Ferroquine With Artesunate in African Adults and Children With Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria (FARM)“<sup>8</sup>

eingeschlossen Patienten wurden in den Dörfern in der Umgebung von Lambaréné und Fougamou mittels Schnelltest auf das Vorhandensein von *P. falciparum* überprüft. Die Patienten wurden durchgehend während der Regenzeit (Dezember 2009 bis April 2010) in die Studie aufgenommen.

Bei positivem Testergebnis wurde ein dicker Tropfen ebenfalls vor Ort durchgeführt, am selbigen Tag mittels Giemsa gefärbt und im Forschungslabor in Lambaréné ausgewertet.

### **Studienverlauf**

Während eines zweimonatigen Beobachtungszeitraums wurden alle Patienten wöchentlich besucht. Neben den Vitalparametern, EKG und Laborwerten wurden die Studienteilnehmer mittels dickem Tropfen auf Plasmodien untersucht.

Wir führten die *in vitro*-Tests am Tag 1 der Hospitalisierung (direkt nach Diagnosestellung und Untersuchung der Ausschlusskriterien) sowie bei einem Rückfall nach Tag 7 und bei einer ausreichend hohen Parasitämie ( $\geq 0,02\%$ ) durch.

Das parasitenhaltige Blut wurde nach Blutabnahme sofort – spätestens jedoch innerhalb von vier Stunden – verarbeitet.

### **Einschlusskriterien<sup>95</sup>**

- ✓ Monoinfektion mit *P. falciparum*  
mit einer Parasitämie zwischen 1000-200 000 Parasiten/ $\mu$ l
- ✓ eine erhöhte Körpertemperatur von  $> 37,5\text{ }^{\circ}\text{C}$   
oder Fieber innerhalb der letzten 24 Stunden in der Anamnese
- ✓ Mindestalter 14 Jahre
- ✓ BMI  $\geq 5$ . Perzentile des altersgemäßen Indexes
- ✓ vorliegende Einverständniserklärung des Patienten/Erziehungsberechtigten

### **Ausschlusskriterien<sup>95</sup>**

- ✗ schwere Krankheit, Vorhandensein von Kriterien einer schweren Malaria
- ✗ ein positiver Hepatitis B/C-Status
- ✗ signifikante Abweichungen der Laborwerte von den Normalwerten  
(Blutbild, Glukose, Leber- und Nierenwerte)
- ✗ bekannte oder vorhandene Erkrankung, die die Interpretation der Daten zur Toleranz und Wirksamkeit von Ferroquin beeinträchtigen kann
- ✗ splenektomierte Patienten
- ✗ Patienten, die nicht trinken können
- ✗ permanentes Erbrechen
- ✗ bestehende Schwangerschaft/Stillperiode
- ✗ Verzicht auf Kontrazeption bei weiblichen Teilnehmern im gebärfähigen Alter

- ✘ positive Medikamentenanamnese in Bezug auf Malariamedikamente in letzter Zeit (die Zeitdauer hierbei hängt von der Halbwertszeit der Medikamente ab)
- ✘ Teilnahme an einer Malaria-Impfstoff-Studie
- ✘ kürzlich stattgefundenene Röteln- oder Gelbfieberimpfung
- ✘ Überempfindlichkeit gegenüber Artesunat oder Ferroquin
- ✘ QTcF > 480 ms

Im Falle eines positiven Schnelltests, sowie einer nachgewiesenen Monoinfektion mit *P. falciparum* mit ausreichender Parasitämie, wurden die Patienten (bei Erfüllung aller Einschlusskriterien und Nichtvorhandensein von Ausschlusskriterien) randomisiert. Diese Studie (*FARM* = Ferroquin und Artesunat bei unkomplizierter Malaria) ist eine randomisierte Doppelblindstudie mit einem einfach blinden Studienarm in der Monotherapie von Ferroquin.

Mittels Randomisierung wurden die Patienten einer der 4 Therapiegruppen zugeteilt:

- 1.) Ferroquin 2 mg/kg einmal täglich und Artesunat 4 mg/kg einmal täglich über 3 Tage
- 2.) Ferroquin 4 mg/kg einmal täglich und Artesunat 4 mg/kg einmal täglich über 3 Tage
- 3.) Ferroquin 6 mg/kg einmal täglich und Artesunat 4 mg/kg einmal täglich über 3 Tage
- 4.) Ferroquin 4 mg/kg einmal täglich als Monotherapie über 3 Tage<sup>95</sup>

Bei den weiteren Auswertungen der vorliegenden Arbeit wurde die Ferroquindosis in der Kombinationstherapie nicht berücksichtigt.

### **Schnelltest**

Nach Desinfektion der Fingerkuppe wurde diese mit einer Einmallanzette punktiert.

Mittels beiliegender Einwegöse wurden etwa 5 µl Blut aufgenommen und in das vorgesehene Feld des Schnelltests überführt. Dem Test wurden 6 Tropfen zugehöriges Reagenz zugefügt. Der Test ist ein Sandwichassay und detektiert das Histidin reiche Protein 2 (*HRP2*). Nach 10-15 Minuten lässt sich der Test auswerten.

Bei einem positiven Testergebnis wurde im Anschluss ein dicker Tropfen durchgeführt.

### ***Herstellung der Giemsa Färbung***

Die Giemsafärbung für die Färbung der Objektträger wurde entsprechend den Arbeitsanweisungen der Universität Tübingen und des Forschungslabors Lambaréné hergestellt:

Für 100 ml Färbelösung wurden 20 ml Giemsa mit 80 ml Puffer pH 7,2 angesetzt, gefiltert und in den Färbeständer überführt.

### ***Bestimmung der Parasitämie***

Die Parasitämie wurde mittels Lambarénémethode laut den Arbeitsanweisungen des Forschungslabors in Lambaréné bestimmt:

Nach Desinfektion der Fingerbeere wurde diese mit Hilfe einer sterilen Lanzette punktiert und mittels Pipette wurden 10 µl Kapillarblut aufgenommen. Dieses wurde auf einem sauberen und beschrifteten Objektträger ausgestrichen – in einem Feld der Größe: 1,8 cm \* 1 cm. Hierfür wurde eine Schablone verwendet. Routinemäßig wurden jeweils zwei dicke Tropfen pro Patient erstellt.

Der Objektträger wurde dann im Inkubator bei 40 °C für 10 min oder an der Luft getrocknet, für 20 Minuten mit Giemsa gefärbt und nachdem er erneut getrocknet wurde, unter dem Mikroskop ausgewertet.

Standardgemäß wurden 100 Felder gelesen. Die Parasitämie wurde wie folgt berechnet:

Anzahl der Parasiten/Anzahl der Felder \* 600 (bzw. Mikroskopfaktor) = Parasitämie in P/µl.

Der dicke Tropfen wurde von zwei verschiedenen Labormitarbeitern gelesen. Bei diskordanten Ergebnissen wurde eine Drittläsung durchgeführt.

Für die Berechnung der prozentualen Parasitämie wird der Hämatokrit benötigt. Dieser wurde mittels Pentra 60 bestimmt.

### ***Herstellung des Kompletmediums***

Für das Kompletmedium wurden einer Flasche RPMI Medium 1640 unter sterilen Bedingungen 500 µl Gentamicin, 6 ml L-Glutamin, 12 ml HEPES und 50 ml Albumax zugefügt.

L-Glutamin und Albumax wurden bis zum Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren und vor der Anwendung im Wasserbad bei höchstens 37 °C aufgetaut

Gentamicin und HEPES wurden ebenso wie das kompletziierte Medium – im folgenden Kompletmedium – im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

### ***Herstellung der Erythrozyten-SAG-Mannitol-Suspension (zur Verdünnung einer Parasitämie > 0,05 %)***

Für die gegebenenfalls notwendige Verdünnung der Parasiten wurden nicht-parasitenhaltige Erythrozyten eines freiwilligen Spenders der Blutgruppe O<sup>+</sup> verwendet, der noch nie Malaria hatte. Das mit den Lithium-Heparin-Monovetten (9 ml) entnommene Blut wurde steril unter dem Hood in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1800 rpm zentrifugiert. Das Plasma und die Leukozytenschicht wurden großzügig mittels Einmalpipette entfernt. Die Erythrozyten wurden mit Kompletmedium gewaschen (für eine Waschung von 20 ml Erythrozyten wurden 30 ml Medium verwendet), das Zentrifugenröhrchen wurde mehrmals gewendet.

Nach erneuter Zentrifugation bei 1800 rpm wurden das Medium, der *Buffy coat* und die oberste Erythrozytenschicht abpipettiert. Den gewaschenen Erythrozyten wurde SAG-Mannitol zugefügt. Die Menge entsprach hierbei der Hälfte der Erythrozyten, d. h. für 20 ml Erythrozyten wurden 10 ml SAG Mannitol verwendet.

Anmerkung: Die auf diese Weise haltbar gemachten Erythrozyten wurden maximal einen Monat im Kühlschrank aufbewahrt.

### ***Vorbereitung der Kulturplatten***

Um die Medikamente in die Kulturplatten zu pipettieren, wurden die benötigten Materialien nach Desinfektion mit 70 % Ethanol im Hood bereitgestellt. Die Medikamente wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die 96 well Kulturplatten wurden beschriftet (Medikamentennamen, Datum, minimale und maximale Konzentration).

Unter sterilen Bedingungen wurden mit Hilfe der Pipettierhilfe 5-6 ml Kompletmedium in eine Petrischale pipettiert. Daraus wurden mittels Multipipette jeweils 25 µl in die Kavitäten überführt unter Aussparung der ersten Linie (A). In dieser Reihe wird sich die Maximalkonzentration des Medikaments befinden. Jeweils 37,5 µl der bereits vorbereiteten Medikamentenverdünnungen wurden in die erste Reihe (A) pipettiert, wobei jedes Medikament doppelt getestet wurde. Mittels Multipipette wurden 12,5 µl aus der ersten Reihe (A), welche die Reihe der Maximalkonzentration ist, aufgenommen und in die zweite Reihe überführt. Nach sechsmaligem vorsichtigen Mischen wurden wieder 12,5 µl in die nächste Reihe überführt. Die Verdünnungsreihe wurde fortgeführt bis zur Reihe G – die letzte Reihe (H) wurde ausgespart. Diese Reihe war die Kontrollreihe ohne Medikamentenzugabe. Die so vorbereiteten Medikamentenplatten wurden bis zu 2 Wochen bei -20 °C aufbewahrt.

**Tabelle 3: Verdünnungsreihe auf der Kulturplatte in nMol/l (endgültige Verdünnung nach Blutzugabe)**  
 Medikament Amodiaquin Chloroquin Ferroquin Mefloquin Chinin Artesunat

Medikament	Amodiaquin	Chloroquin	Ferroquin	Mefloquin	Chinin	Artesunat
A 100,00 %	150	1000	70	170	10000	20
B 33,33 %	50	333,33	23,33	56,67	3330	6,67
C 11,11 %	16,67	111,11	7,78	18,89	1110	2,22
D 3,70 %	5,56	37,04	2,59	6,30	370,37	0,74
E 1,23 %	1,85	12,35	0,86	2,10	123,46	0,25
F 0,41 %	0,62	4,12	0,29	0,67	41,15	0,08
G 0,14 %	0,21	1,37	0,10	0,23	13,72	0,03
H 0,00 %	0	0	0	0	0	0

## 2.2.2. Kultivierung der Parasiten

Für die *in vitro* Testung wurden ausschließlich Blutproben mit einer *P. falciparum*-Monoinfektion verwendet. Die Parasitämie wurde mit Hilfe des Hämatokrits in eine prozentuale Parasitämie umgerechnet. Anhand dieser wurde auch festgestellt, ob für die *in vitro* Resistenzbestimmung eine Verdünnung durchgeführt werden muss:

Um die Parasiten während der Inkubationszeit und so auch der Wirkzeit der Medikamente optimalen Bedingungen auszusetzen, wurden die Proben mit einer prozentualen Parasitämie größer als 0,05 % mit der Erythrozyten-SAG-Mannitol-Suspension verdünnt.

Für den *in vitro* Test wurde den Patienten mindestens 1 ml Heparinblut abgenommen. Für eine Kulturplatte wurden maximal 300 µl Erythrozyten des Patienten benötigt – je nachdem wie hoch die Parasitämie und der Hämatokrit waren. Wir verwendeten für die Blutabnahme 5,5 ml Monovetten. In den Platten wurde auf einen Hämatokrit von 1,5 % verdünnt. Sowohl Hämatokrit als auch Ausgangsparasitämie haben einen Einfluss auf die Parasitenkultur. Eine erhöhte Parasitämie und ein erhöhter Hämatokrit können durch eine Medikamentenakkumulation in den Erythrozyten die Wirksamkeit eines Medikamentes wie Chloroquin auf die Parasiten reduzieren (Inokulum Effekt).<sup>88,141</sup>

Deshalb ist es wichtig, die Bedingungen soweit wie möglich zu standardisieren. Zudem stellen die Niedrighämatokritkultur und eine niedrige Ausgangsparasitämie optimale Wachstums- und Ernährungsbedingungen für die Parasiten dar.<sup>142</sup>

Nach Zentrifugation (1800 *rpm* für 5 Minuten, Bremse auf 7, Beschleunigung auf 9) wurden das Plasma sowie die Leukozytenschicht mittels einer Einmalplastikpipette entfernt. Die benötigte Erythrozytenmenge wurde unter sterilen Bedingungen in einen Falcon mit 40 ml Komplettmedium überführt, welches dann auf eine Petrischale pipettiert wurde. In die schon vorbereiteten Medikamentenplatten wurden pro Kavität je 200 µl verdünntes Parasitenblut pipettiert.

Die so fertig pipettierte Platte wurde bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 5 % O<sub>2</sub> im Kerzentopf (*candle jar*) inkubiert. Die Platten verblieben für 72 Stunden im Inkubator und wurden danach sofort bei -20 °C tiefgefroren.

### **Berechnung der prozentualen Parasitämie**

Definition: Die prozentuale Parasitämie (P %) ist die Anzahl der infizierten Erythrozyten geteilt durch die Anzahl aller Erythrozyten.

Wir gingen von einem mittleren korpuskulären Erythrozytenvolumen von 100 fl und somit von einer Erythrozytenanzahl von 10 Mio Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  Erythrozyten aus und berechneten die prozentuale Parasitämie folgendermaßen:

$$P \% = \frac{\text{Parasiten}/\mu\text{l}}{\text{Hämatokrit} * 1000}$$

Der Faktor 1000 kommt durch den Hämatokrit und die Anzahl der Erythrozyten pro  $\mu\text{l}$  Erythrozyten zustande.

### Beispiel:

Wir nehmen an, ein Patient hat eine Parasitämie von 10 000 Parasiten pro  $\mu\text{l}$  Blut und einen Hämatokrit von 40 %.

In einem  $\mu\text{l}$  Blut sind demzufolge 0,4  $\mu\text{l}$  Erythrozyten.

$$P \% = \frac{10000 \text{ Parasiten}/\mu\text{l}}{0,4 * 10000000} * 100$$

Die prozentuale Parasitämie (P %) beträgt 0,25 %.

Diese Parasitämie ist größer als 0,05 % und muss daher mit SAG-Mannitol-Erythrozyten verdünnt werden.

SAG Mannitol besteht nur zu  $\frac{2}{3}$  aus Erythrozyten. Um einen Hämatokrit von 1,5 % und eine prozentuale Parasitämie von 0,05 % zu erreichen, wird die benötigte Menge an parasitenhaltigen Erythrozyten mit Hilfe der Stoffmengengleichung

( $c_1 * v_1 = n = c_2 * v_2$ ) berechnet.

n = Menge der Parasiten

c1 = aktuelle Parasitämie (0,25 %)

v1 = parasitenhaltige Erythrozyten in  $\mu\text{l}$  (gesucht)

c2 = gewünschte Parasitämie (0,05 %)

v2 = gewünschtes Gesamterythrozytenvolumen (300  $\mu\text{l}$ )

Nach Umformung ergibt sich:

$$\frac{\text{gewünschte Parasitämie (in \%)}}{\text{parasitenhaltige Erythrozyten (in } \mu\text{l)}} = \frac{\text{aktuelle Parasitämie (in \%)}}{\text{Gesamterythrozyten (in } \mu\text{l)}}$$

Für eine Platte mit einem Hämatokrit von 1,5 % werden 300  $\mu\text{l}$  Erythrozyten (Gesamterythrozyten) verwendet. Die gewünschte Parasitämie beträgt 0,05 %, die aktuelle Parasitämie liegt in diesem Fall bei 0,25 %. Hier werden also 60  $\mu\text{l}$  parasitenhaltige Erythrozyten und  $300 \mu\text{l} - 60 \mu\text{l} \cdot \frac{3}{2} = 360 \mu\text{l}$   $0^+$ -Erythrozyten in SAG Mannitol für eine Platte benötigt.

Bei einer prozentualen Parasitämie zwischen 0,02 und 0,05 % wurde die Kultivierung ohne Verdünnung der Parasiten mit entsprechend 300  $\mu\text{l}$  parasitenhaltigen Erythrozyten pro Kulturplatte durchgeführt.

### 2.2.3. Bestimmung der $IC_{50}$ mittels *ELISA*

Dieser Assay untersucht die Hemmstärke der oben aufgeführten Medikamente auf *P. falciparum* nach 72-stündiger Inkubation. Es handelt sich um einen *Sandwich-ELISA*, der im Forschungslabor in Lambaréné gemäß den Arbeitsanweisungen der Universität Tübingen und der Universität Wien (Noedl et al., 2005) durchgeführt wurde. Der Nachweis geschieht durch die Messung der Konzentration des *HRP2*.

### **Vorbereitung**

Vor dem *ELISA* wurden die Kulturplatten zweimalig bei Raumtemperatur aufgetaut und wieder bei -20 °C eingefroren um die Erythrozyten zu lysieren.

Der erste IgM Antikörper (*MPFM-55A*) wurde in *PBS*-Lösung auf eine Konzentration von 1,0 µl/ml verdünnt. Pro Platte werden 10 ml dieser Lösung benötigt.

Mittels Multikanalpipette wurden 100 µl des ersten Antikörpers (*MPFM-55A*) in Lösung auf die *ELISA*-Platten übertragen.

Die beschichteten Platten wurden mit Klebefolie versiegelt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am Tag des Assays wurden die bereits mit dem ersten Antikörper beschichteten Platten ausgeschüttet und trockengeklopft.

Der Antikörper wurde an den Wänden der Kavitäten gebunden und die überflüssigen Antikörper wurden so mit der Lösung entfernt.

Nach Zugabe von 200 µl Blockierungslösung pro Kavität wurden die Platten mit Klebefolie abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Die *PBS/Tween* Waschlösung wurde mit 0,5 ml *Tween 20* pro 999,5 ml *PBS* Lösung angesetzt. Nach Verwerfen der Blockierungslösung wurden die Platten 3-malig mit je 200 µl Waschlösung pro Kavität gewaschen und trockengeklopft.

### **Zugabe der Probe**

Der Assay wurde generell mit 25 µl destilliertem Wasser und 75 µl Blutprobe aus der Kultur durchgeführt und gegebenenfalls mit 100 µl der Blutprobe ohne Verdünnung wiederholt. Vor Zufügen der Blutprobe wurde diese durch mehrmaliges Aufnehmen und Ablassen mittels Pipette gründlich gemischt.

Die Platten wurden mit Abdeckfolie versiegelt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert.

Nach Herstellung der Grundlösung für den zweiten Antikörper (*MPFG-55P*) aus 2 % *BSA* und 1 % *Tween 20* in *PBS* wurde dieser durch Zugabe der Grundlösung auf 0,05 µg/ml verdünnt. Für jede Platte wurden 10 ml der Grundlösung benötigt.

Anmerkung: Bei Anbruch eines neuen Antikörpers wurde dieser in verschiedenen Konzentrationen getestet, um die optimale Verdünnung herauszufinden.

Der zweite Antikörper (*MPFG-55P*) enthält ein *horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase) Konjugat, welches in diesem Komplex als Markerenzym fungiert. Die Platten wurden ausgeschüttet, dreimal mit Waschlösung gewaschen und trockengeklopft.

Mittels Multikanalpipette wurden 100 µl der verdünnten Antikörperlösung (*MPFG-55P*) pro Kavität auf die *ELISA*-Platten pipettiert.

#### **Zugabe des Substrates und Auswertung**

Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und erneutem Waschen und Trockenklopfen wurden pro Kavität 100 µl chromogenes Substrat (*TMB chromogen*) zugefügt. Die Platten inkubierten 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Die Zugabe von *TMB chromogen* führt zu einer unterschiedlich intensiven Blaufärbung. Je stärker die Färbung ist, desto mehr Protein ist in der jeweiligen Kavität vorhanden. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure pro Kavität gestoppt.

Nach Messung der *ELISA*-Platten bei 450 nm im *ELISA-Reader* erfolgte die Berechnung der  $IC_{50}$ .

Die  $IC_{50}$  stellt die Medikamentenkonzentration dar, die in der Lage war, 50 % des Parasitenwachstums zu verhindern; unter unseren *Assay* Bedingungen entspricht sie der Konzentration, bei der 50 % des *HRP2* Proteins der medikamentenfreien Kontrollreihe gefunden wurde.

#### **2.2.4. Statistische Auswertung**

Die mittels *ELISA* gewonnenen Daten wurden mit dem Statistikprogramm R (Version 2.12.0) ausgewertet.<sup>143</sup> Hierbei erfolgten die Berechnung der  $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$ ,  $IC_{99}$  sowie der oberen und unteren Asymptote, sowie die Erstellung der nicht linearen Dosis-Wirkungskurven. Zur Auswertung wurden das arithmetische Mittel, der Median, das 95 % Konfidenzintervall und die Standardabweichung berechnet.

Die logtransformierten  $IC_{50}$ -Werte wurden mittels Produktmoment nach Pearson auf Korrelationen zwischen den einzelnen Medikamenten untersucht und grafisch dargestellt. Die Werte wurden außerdem auf eine Korrelation zwischen der  $IC_{50}$  für Ferroquin und der Parasiteneliminationszeit getestet.

Die Parasiteneliminationszeit wurde definiert als die Zeitspanne zwischen Therapiebeginn bis zum ersten (für Trophozoiten) negativen dicken Tropfen, bei mindestens zwei aufeinanderfolgend negativen Testergebnissen.

Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Die Studienpopulation

Im Rahmen der Malariakontrolle durch Resistenzbestimmung und Erforschung neuer wirksamer Substanzen führten wir eine Aktivitätsbestimmung von bereits erprobten Substanzen (Amodiaquin, Artesunat, Chinin, Chloroquin und Mefloquin) sowie des neuen Wirkstoffes Ferroquin durch. Der Wirkstoff Ferroquin befindet sich im Stadium der klinischen Entwicklung und wurde mit den bereits zugelassenen Substanzen verglichen um eventuelle Kreuzresistenzen auszuschließen.

Sämtliche Proben stammen von Malariapatienten (*P. falciparum*) aus Lambaréné bzw. der näheren Umgebung von Lambaréné. Das Screening wurde zum großen Teil aktiv in den Dörfern im Radius von 80 km durchgeführt.

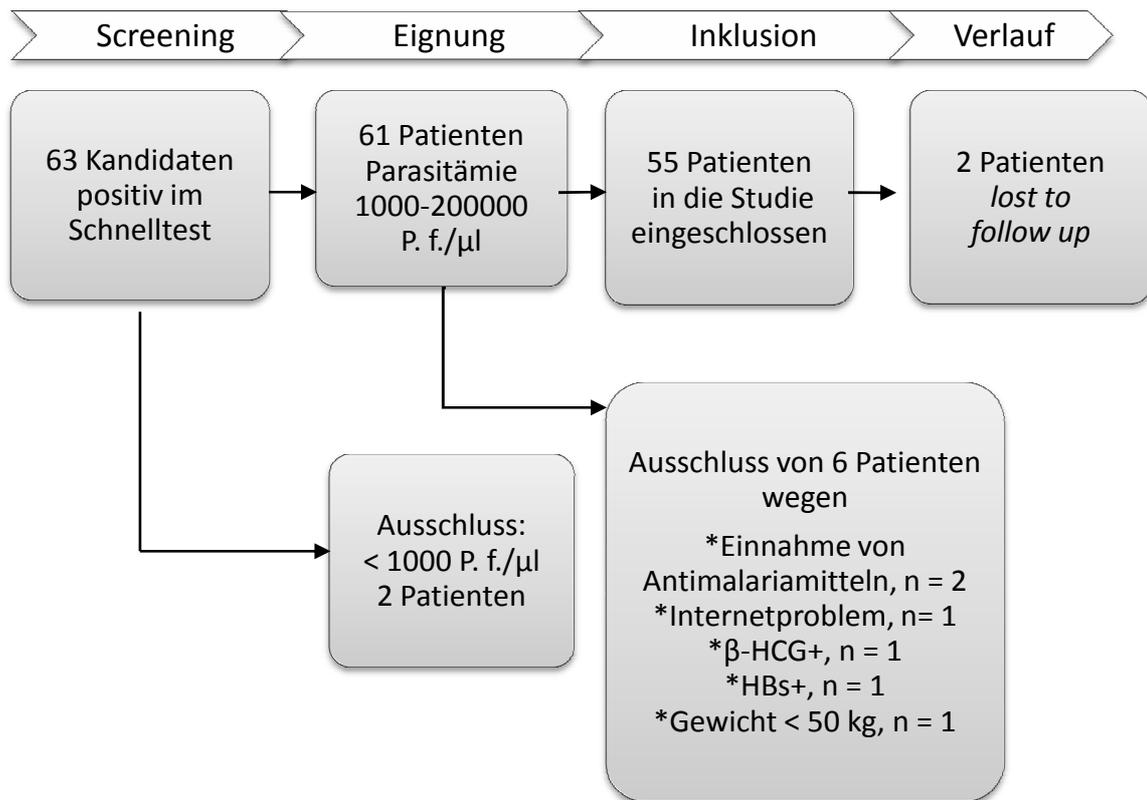


Abb. 6 Screening failures

Im Zeitraum von Dezember 2009 bis April 2010 wurden 55 Patienten in die Studie aufgenommen.

Tabelle 4: Baseline characteristics

Geschlecht, Anzahl (%)	Weiblich 27 (49 %)	Männlich 28 (51 %)
Alter (Jahre), Median   Spannweite	23   14-70	
Parasitämie Parasiten / $\mu$ l arithmetisches Mittel   Median (Spannweite)	25074   6523 (1035- 173500)	
Therapieschema, Anzahl (%)		
Ferroquinmonotherapie	14 (25 %)	
Kombinationstherapie	41 (75 %)	

### 3.2. Studienverlauf

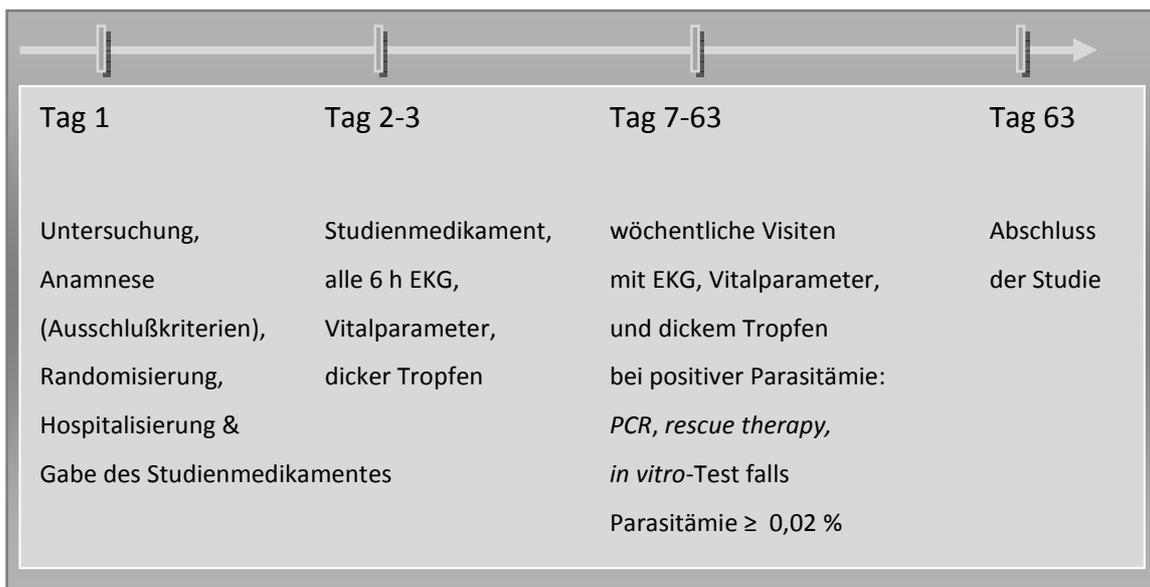


Abb. 7 Studienverlauf

Insgesamt sind 52 Parasitenproben vom Zeitpunkt des Screenings in Kultur gewachsen und konnten interpretiert werden. Zusätzlich wurden 8 Isolate bei Neuinfektion nach Tag 7 (gesichert durch *PCR*) kultiviert und ausgewertet.

Die durchschnittliche Parasiteneliminationszeit, inklusive Therapieversager betrug 39,7 Stunden (Median=24, *range*: 6-648 h). Ohne Therapieversager lag die mittlere Parasiteneliminationszeit bei 24,9 Stunden (Median = 18, bei einer Spannweite von 6-144). Die Parasiteneliminationszeit der Patienten unter Kombinationstherapie mit Artesunat und Ferroquin war signifikant kürzer, als die Parasiteneliminationszeit der Patienten unter Ferroquinmonotherapie (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5: Parasiteneliminationszeit**

	<b>Ferroquinmonotherapie (n = 14)</b>	<b>Kombinationstherapie (n = 41)</b>
<b>Arithmetisches Mittel</b>	<b>49,29 h</b>	<b>18,73 h</b>
<b>Median/Spannweite</b>	<b>33 h/6-144 h</b>	<b>18 h/6-36 h</b>
<b>0-24 h</b>	<b>14,29 %</b>	<b>58,54 %</b>
<b>&lt; 48 h</b>	<b>64,29 %</b>	<b>100 %</b>
<b>&gt; 72 h</b>	<b>35,71 %</b>	<b>0 %</b>

### **3.3.Klinische Testung des Studienmedikamentes Ferroquin**

Das Chloroquinderivat Ferroquin befindet sich zurzeit in Phase 2 der klinischen Testung. Die hier untersuchten Studienteilnehmer, denen durch Randomisierung die Ferroquinmonotherapie zugeteilt wurde, erhielten den Wirkstoff in einer Konzentration von 4 mg/kg Körpergewicht einmal täglich über drei Tage.

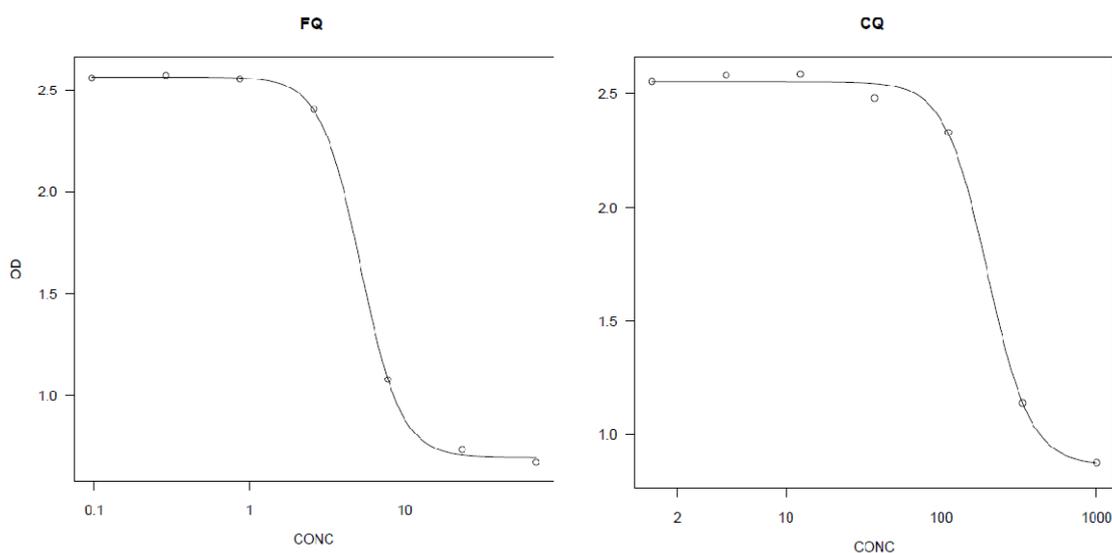
Drei der Patienten unter Ferroquinmonotherapie zeigten ein Therapieversagen mit Parasitämie an Tag 7 bzw. keinem Abfall der Parasitämie um > als 75 % innerhalb von 48 Stunden nach Therapiebeginn.

Insgesamt 20 Patienten (davon 6 unter Ferroquinmonotherapie) erkrankten im Verlauf des zweimonatigen Beobachtungszeitraums (nach Tag 7) erneut an Malaria; alle diese Neuerkrankungen nach Tag 7 wurden mittels PCR als Neuinfektionen klassifiziert.

### 3.4. Auswertung der Ergebnisse

Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm R (Version 2.12.0). Aus den durch den *ELISA-Reader* ermittelten Daten (ein Wert pro Kavität) wurde die  $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$ ,  $IC_{99}$ , die Steigung und die obere und untere Asymptote berechnet. Diese Berechnung basiert auf dem *dose-response-curves* Paket (*drc version 2.3-7*) und einem R-Skript.<sup>143,144</sup>

Als Ergebnis erhält man eine nicht lineare Dosis-Wirkungskurve (s. Abb. 8).



**Abb. 8 Dosis-Wirkungskurven von Chloroquin und Ferroquin**  
OD = optische Dichte (optical density), Conc = Substratkonzentration in nMol/l  
FQ = Ferroquin, CQ = Chloroquin

Die weitere Analyse stützt sich auf die  $IC_{50}$ -Werte der getesteten Substanzen.

Für jeden Wirkstoff wurden das arithmetische Mittel, der Median und die Standardabweichung der  $IC_{50}$ -Werte berechnet. Hierbei wurde mit einzelnen Werten, die außerhalb der Nachweisgrenzen lagen, wie folgt vorgegangen:

Bei Werten, die unterhalb der Nachweisgrenze lagen (das gilt für Amodiaquin und Artesunat) wurde die untere Nachweisgrenze halbiert. Werte, welche oberhalb der Nachweisgrenze lagen (Chloroquin) wurden mit 1,2 multipliziert.

Tabelle 6: Auswertung der  $IC_{50}$ -Werte aller Patienten inklusive der Neuerkrankungen (in nMol/l)

	N	Arithmetisches Mittel (mean)	Median	Spannweite (range)	Standardabweichung
<b>Amodiaquin</b>	57	11,61	9,34	0,105-46,30	10,99
<b>Chloroquin</b>	56	425,92	226,49	2,141-1200	467,32
<b>Ferroquin</b>	59	8,18	7,494	1,195-19,00	4,19
<b>Mefloquin</b>	56	4,96	2,53	0,115-32,57	6,77
<b>Chinin</b>	53	117,71	90,97	6,860-764,65	119,82
<b>Artesunat</b>	55	0,29	0,07	0,013-1,68	0,45

Für die  $IC_{50}$ -Werte wurden folgende *cut-off* Grenzen zur Definition der Resistenz berichtet: Amodiaquin: > 80 nMol/l<sup>145</sup>, Artesunat: > 10,5 nMol/l<sup>86</sup>, Chinin: > 500 nMol/l<sup>145</sup>, Mefloquin: > 30 nMol/l.<sup>86</sup>

Diese Grenzwerte sind nicht validiert für unseren Test und dienen lediglich dem besseren Verständnis in der Beschreibung der  $IC_{50}$ -Werte.

Für Lambaréné ist bisher keine Artesunatresistenz bekannt. Auch unsere Werte (Median 0,07 nMol/l bei einer kleinen Spannweite von 0,01-1,68 nMol/l) sprechen gegen das Vorkommen einer Resistenz gegen Artesunat in diesem Gebiet.

Bei Amodiaquin zeigt sich eine mittlere Spannweite von 0,11 – 46,30 nMol/l, sämtliche Werte liegen unterhalb der von uns definierten Resistenzgrenze.

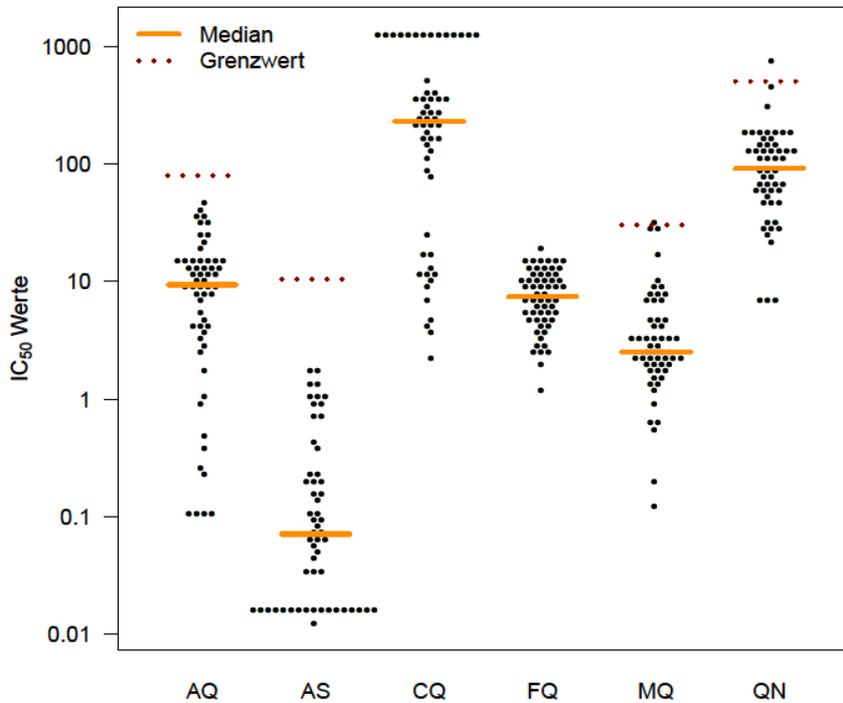
Bei der Analyse des Ferroquins zeigen sich im Vergleich zum verwandten Chloroquin deutlich niedrigere  $IC_{50}$ -Werte (durchschnittlich 52-fach niedrigere  $IC_{50}$ -Werte beim Ferroquin). Eine extrem große Spannweite zeigte sich bei Chloroquin, ausgehend von der für Lambaréné definierten Resistenzgrenze von einem  $IC_{99}$ -Wert > 30 nMol/l<sup>88</sup> lagen 51 der  $IC_{99}$ -Werte oberhalb der Resistenzgrenze, d. h. 91 % der Proben zeigten eine Chloroquinresistenz.

Der Median der  $IC_{50}$ -Werte für Mefloquin lag bei 2,53 nMol/l. Eine einzige Probe zeigte eine *in vitro* Resistenz bei einem  $IC_{50}$ -Wert > 30 nMol/l.

Die Probe wies außerdem eine Resistenz für Chloroquin auf.

Ähnlich wie bei Chloroquin zeigte sich auch bei der Chinintestung eine große Varianz der  $IC_{50}$ -Werte. In einer Probe fand sich ein über der Resistenzgrenze liegender, deutlich erhöhter  $IC_{50}$ -Wert von 764,65 nMol/l.

Die  $IC_{50}$ -Werte der restlichen Wirkstoffe dieser Probe waren durchweg im „empfindlichen“ Bereich (s. Abb. 9).



**Abb. 9** Verteilung der  $IC_{50}$ -Werte (in nMol/l) der getesteten Substanzen.  
Die gepunktete Linie markiert die hypothetischen Grenzwerte, welche lediglich dem besseren Verständnis dienen und nicht validiert sind.  
AQ = Amodiaquin, AS = Artesunat, CQ = Chloroquin, FQ = Ferroquin, MQ = Mefloquin, QN = Chinin

### 3.4.1. Korrelationsanalyse der *in vitro* Wirksamkeit der getesteten Substanzen

Die Korrelationsanalyse untersucht die Stärke des Zusammenhangs zweier Variablen. Hierzu wird der Korrelationskoeffizient “r” berechnet. In dieser Arbeit wurde der Korrelationskoeffizient mittels Statistikprogramm R nach Pearson berechnet:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Der Korrelationskoeffizient liegt auf einer Skala von -1 bis +1. Je größer der Betrag des Korrelationskoeffizienten ist, desto größer ist der lineare Zusammenhang der beiden Variablen. Dies lässt jedoch keine Schlussfolgerung auf kausale Zusammenhänge der beiden Variablen zu.<sup>146,147</sup>

Unter Annahme einer Normalverteilung wurde die Korrelationsanalyse der mittels natürlichen Logarithmus transformierten  $IC_{50}$ -Werte mit der Produktmomentkorrelation nach Pearson durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

### Korrelationen der Medikamente untereinander

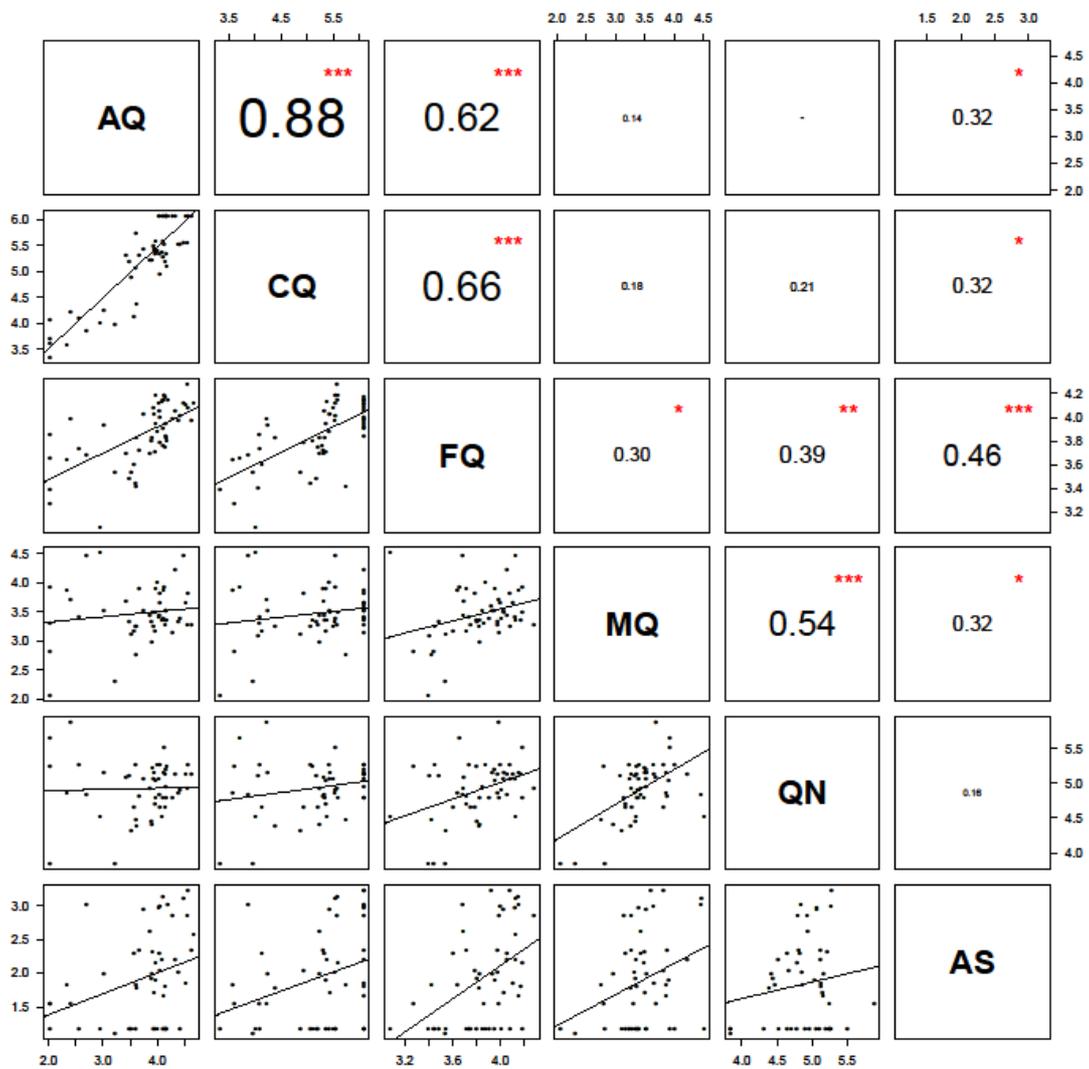


Abb. 10 Korrelationsmatrix der logtransformierten  $IC_{50}$ -Werte (nmol/l)  
Anmerkung: (\*)  $0,05 \geq p > 0,01$  (\*\*)  $0,01 \geq p > 0,001$  (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ <sup>148</sup>

Zur Abschätzung der Stärke des Zusammenhangs zweier Substanzen wurde der Determinationskoeffizient ( $r^2$ ) ermittelt. Dieser beschreibt den Anteil der gemeinsamen Varianz zweier Variablen an der Gesamtvarianz. Der Determinationskoeffizient kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.<sup>149</sup> Dieser Koeffizient ist mathematisch gesehen das Quadrat des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ). In unserem Fall zeigt er, wie gut das gefundene Modell (die Gerade), die tatsächlich gemessenen Werte beschreibt.

Die Analyse (Pearson) stellte signifikante Korrelationen zwischen den meisten der getesteten Substanzen dar, die Korrelationskoeffizienten lagen hierbei zwischen 0,32 und 0,88.

Eine ausgeprägte Korrelation findet sich zwischen den strukturverwandten Wirkstoffen Amodiaquin und Chloroquin bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,88 ( $p < 0,0001$ ).

Weder bei Mefloquin vs. Amodiaquin, bei Chinin vs. Amodiaquin, bei Artesunat vs. Chinin, bei Chloroquin vs. Mefloquin, noch bei Chloroquin vs. Chinin, zeigte sich eine signifikante Korrelation.

Eine schwache jedoch signifikante Korrelation fand sich zwischen Chloroquin und Ferroquin ( $r^2 = 0,4$ ,  $p < 0,001$ ).

Tabelle 7: Korrelationen der getesteten Substanzen

	n	Korrelation (Pearson)	R <sup>2</sup>	Korrigierter R <sup>2</sup>	p
AQ-CQ	54	0,88	0,780	0,78	<0,001
AQ-AS	53	0,32	0,1	0,02	0,02
AQ-FQ	56	0,62	0,38	0,37	<0,001
AQ-MQ	53	0,14	0,02	0,001	0,32
AQ-QN	51	0,03	0,001	-0,02	0,84
AS-CQ	51	0,31	0,10	0,08	0,02
AS-FQ	54	0,46	0,22	0,20	<0,001
AS-MQ	52	0,32	0,10	0,08	0,02
AS-QN	49	0,16	0,02	0,004	0,28
CQ-FQ	56	0,66	0,44	0,42	<0,001
CQ-MQ	53	0,18	0,03	0,01	0,20
CQ-QN	50	0,21	0,05	0,03	0,14
FQ-MQ	55	0,30	0,09	0,07	0,03
FQ-QN	52	0,39	0,15	0,13	0,005
MQ-QN	53	0,54	0,30	0,28	<0,001

**Analyse der Korrelation von Parasiteneliminationszeit und IC<sub>50</sub>**

Die Isolate des Ferroquin-Monotherapiearmes wurden auf Korrelation zwischen den IC<sub>50</sub>-Werten von Ferroquin vor Therapiebeginn und der Parasiteneliminationszeit untersucht.

Eine signifikante Korrelation ist bei den vorliegenden Werten (n = 13) nicht vorhanden (r = 0,18, p = 0,56). Diese Korrelation wurde auch für die Patienten der Kombinationszweige (n = 38) untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante positive Korrelation (r = 0,46, p = 0,004). Ergänzend wurde auch die Korrelation von Parasiteneliminationszeit und IC<sub>50</sub> von Artesunat untersucht (n = 36). Hier zeigte sich keine Korrelation (r = 0,09, p = 0,59).

### 3.4.2. Vergleich der *in vitro* Wirksamkeit mit der klinischen Wirksamkeit mittels T-Test

#### ***IC<sub>50</sub>-Werte der klinischen Therapieversager im Vergleich zu den Proben der Patienten mit adäquater klinischer Antwort***

Dieser Test untersucht, ob sich die Ferroquin-*IC<sub>50</sub>*-Mittelwerte der Patienten mit Therapieversagen (n = 3) signifikant von den Mittelwerten der Patienten ohne Therapieversagen (n = 48) unterscheiden. Die Nullhypothese lautet also: Die Differenz der Mittelwerte der klinischen Therapieversager und der Patienten mit adäquater klinischer Antwort ist Null.

Die Nullhypothese wird auf einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  nicht abgelehnt ( $p = 0,89$ ). Es besteht also kein signifikanter Unterschied zwischen den Ferroquin *IC<sub>50</sub>*-Mittelwerten der Patienten mit bzw. ohne Therapieversagen.

$$\Delta\mu \text{ (CI)} = -0,08 \text{ (-2,29, 2,13)}$$

## 4. Diskussion

### 4.1. Suszeptibilität oder Resistenz? Eine Analyse der Hemmwerte

#### **Chloroquin**

Einige Medikamente, darunter Chloroquin, Mefloquin und Amodiaquin werden selektiv von den infizierten und nicht infizierten Erythrozyten aufgenommen.<sup>105</sup>

Diese Tatsache wird bei der Berechnung der Resistenzgrenze berücksichtigt.

Wernsdorfer und Payne setzen für den Microtest eine Chloroquin-Resistenzgrenze fest, die bei einem  $IC_{99}$ -Wert von  $> 1,0 \cdot 10^{-6}$  mol/l Blut liegt.<sup>105</sup>

Die Resistenzgrenze für Chloroquin wurde dementsprechend für den verwendeten Test in Lambaréné auf einen  $IC_{99}$ -Wert von  $> 30$  nmol/l festgelegt.<sup>88</sup>

In Lambaréné wurde die Chloroquinresistenz in den 80er Jahren entdeckt. Bis 1992 zeigte sie ein ständiges Ansteigen bis zu einer *in vitro* Resistenz von 100 %.<sup>150</sup>

Im Gabun wurde Chloroquin erst 2003 aus den Therapieleitlinien gestrichen und offiziell noch bis 2005 in den Apotheken verkauft. In der Kombination mit Proguanil war es jedoch auch 2010 noch unter dem Handelsname Savarine® in der Apotheke in Lambaréné erhältlich.

Uns stellt sich die Frage, ob und inwieweit die Chloroquinresistenz auf Grund von reduziertem Selektionsdruck durch Chloroquin zurückgegangen ist.

In der *in vitro* Aktivitätstestung von Chloroquin in Lambaréné im Jahr 2004 wurden 43 Isolate getestet, sämtliche  $IC_{99}$ -Werte lagen oberhalb des bei  $IC_{99} > 30$  nmol/l angesetzten Grenzwertes.<sup>88</sup>

In der aktuellen Sensitivitätstestung finden sich 91 % Chloroquin-resistente Parasiten. Ob man hier schon von einem Rückgang der Chloroquinresistenz sprechen kann, bleibt jedoch abzuwarten. Interessant wäre auch eine molekulargenetische Analyse der Parasiten auf eine *PfCRT* Mutation zur Unterscheidung zwischen resistenten und sensiblen Parasitenstämmen.<sup>151</sup>

In Malawi zeigte sich 2003 ein deutlicher Rückgang der chloroquinresistenten Parasiten. Man vermutet, dass die Parasiten mit einer *PfCRT* Mutation bei fehlendem Selektionsdruck einen Nachteil im Bezug auf die Fitness haben, demnach ist eine Rückkehr der chloroquinsensiblen Parasiten durchaus denkbar.<sup>152</sup> Dies ist das erste Mal, dass ein Grad an Sensibilität erreicht wurde, der eine Wiedereinführung von Chloroquin in die kombinierte Therapie der Malaria plausibel erscheinen lässt.

Neue Analysen (Summers und Martin, 2010) zeigen, dass der *PfCRT* ein Transportmolekül ist. Der Transport von Chloroquin aus der Nahrungsvakuole via *PfCRT* ist also sättigbar. Die Chloroquinresistenz könnte folglich durch eine Dosissteigerung überwunden werden. Ein in Bezug auf Einnahmefrequenz und Dosis von Chloroquin verändertes Therapieschema zeigte in Guinea-Bissau erfolgsversprechende Ergebnisse.

Ob Chloroquin trotz seiner geringen therapeutischen Breite in höherer Dosierung zur Anwendung kommen soll, ist jedoch stark umstritten.<sup>115</sup>

Die Wirksamkeit von Chloroquin als Monotherapie in hoher Dosierung (45 mg/kg Körpergewicht) wurde in einer randomisierten kontrollierten Studie bei Kindern mit *P. falciparum* Malaria im Gabun untersucht. Die Kontrollgruppe erhielt eine Kombinationstherapie (Sulfadoxin/Pyrimethamin oder Chloroquin/Clindamycin). Bei den Patienten, die eine Monotherapie mit Chloroquin erhielten, zeigte sich eine rasche Beseitigung der akuten Symptome und Reduzierung der Parasitämie. Im Verlauf kam es jedoch bei den meisten Patienten unter der Monotherapie zu einem Wiederanstieg der Parasitämie, so dass nach 28 Tagen nur 32 % der Patienten geheilt waren.<sup>153</sup>

### **Ferroquin**

Ferroquin zeigte eine deutlich höhere Aktivität als Chloroquin (im Schnitt 52-mal höher). Die Werte variieren in einem relativ engen Rahmen, zurzeit findet sich kein Anzeichen auf eine bestehende oder eine sich entwickelnde Resistenz. Das Medikament befindet sich in der klinischen Testphase – ein signifikanter Selektionsdruck besteht demzufolge im Augenblick nicht.

Als Chloroquinderivat ist beim Ferroquin eine Kreuzresistenz zu diesem durchaus möglich; dies wurde in mehreren Studien untersucht, welche unterschiedliche Ergebnisse erzielten<sup>85,86,88</sup> und wird weiter unten detailliert diskutiert (4.2. Korrelationsanalyse).

### **Amodiaquin**

Für Monodesethylamodiaquin, dem Hauptmetaboliten des Amodiaquins wurde von Basco und Kollegen eine Resistenzgrenze von einem  $IC_{50}$ -Wert von 60 nmol/l vorgeschlagen.<sup>142,154</sup> Diese Grenze wurde in keiner von unseren Parasitenkulturen erreicht. Es scheint, als ob dieser Wirkstoff, der ein häufiger Kombinationspartner in ACTs ist, in Lambaréné zurzeit noch effektiv ist. Das deckt sich mit klinischen Daten.<sup>155</sup> Die bekannte Kreuzresistenz zum Chloroquin ist jedoch Grund genug, diesen Wirkstoff in regelmäßigen Abständen auf seine Aktivität bei lokalen *P. falciparum*-Isolaten zu überprüfen.

### **Artesunat**

Im Gabun (Libreville) wurden bereits Isolate mit erniedrigter Suszeptibilität für Artemisinine beobachtet.<sup>145</sup>

Für Lambaréné ist jedoch keine Artesunatresistenz bekannt und bislang wurden keine klinischen Zeichen von Resistenz beobachtet.

Zu beachten ist hierbei, dass die verschiedenen *in vitro* Verfahren der Qualitätskontrolle nicht ausreichend standardisiert sind um endgültige Aussagen treffen zu können. Außerdem ist der Wirkstoff Artesunat eine sehr instabile Substanz, d.h. leicht erhöhte Hemmwerte könnten auch durch eine unsachgemäße Lagerung zustande kommen.

In der aktuellen Testung fanden sich keine Artesunat-resistenten Parasiten; dies steht im Einklang mit der in Lambaréné durchgeführten Sensitivitätsmessung von 2004.<sup>88</sup>

### **Mefloquin**

Von den aktuell getesteten Isolaten fand sich bei einer Probe eine *in vitro* Resistenz für Mefloquin. Aktivitätstestungen von Mefloquin von 1994 und 1996 zeigten durchweg

Mefloquin-sensible Parasiten,<sup>156,157</sup> in der Sensitivitätstestung von 2002 zeigte sich erstmals eine Mefloquinresistenz in einem Isolat.<sup>158</sup>

In der lokalen Therapiepraxis wird Mefloquin selten verwendet, im Albert Schweitzer Krankenhaus wird es überhaupt nicht verabreicht, es ist jedoch in den Apotheken in Lambaréné als Kombinationspräparat (mit Artesunat) erhältlich. Die Resistenzentwicklung wird durch erhöhten Medikamentendruck oder Kreuzresistenzen beschleunigt. Molekulargenetisch lässt sich also eine Resistenzentwicklung bei Mefloquin theoretisch durch die Strukturverwandtschaft zu Chinin und dessen exzessivem Gebrauch erklären.<sup>116</sup> Allerdings scheint dieser Effekt in unserem Studiengebiet keine Bedeutung zu haben, da bislang keine Chininresistenz berichtet wurde.

### **Chinin**

Trotz der breiten Anwendung von Chinin, das vor allem bei den hospitalisierten Patienten an erster Stelle steht, hat es sich eine große Wirksamkeit bewahrt.

Für den Studienort Lambaréné ist keine Chininresistenz bekannt.<sup>156,158</sup>

In der aktuellen Messung fand sich ein Isolat mit einer  $IC_{50}$  oberhalb der Resistenzgrenze von 500 nMol/l.

In anderen gabunesischen Gegenden sind bereits Resistenzen für Chinin beschrieben worden, so zum Beispiel in Franceville, Bakoumba<sup>159</sup> und in Libreville.<sup>86,145</sup>

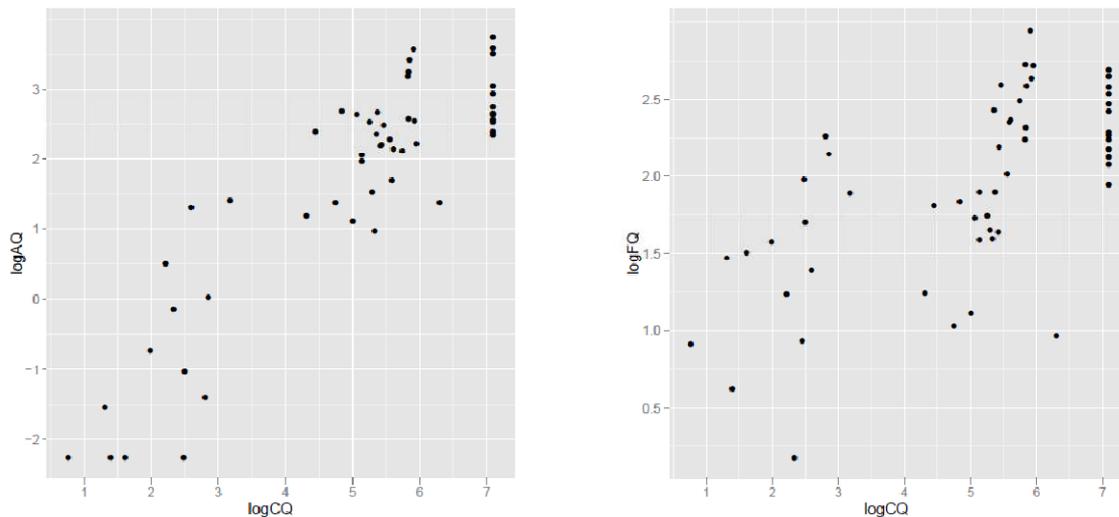
## **4.2. Korrelationsanalyse**

Korrelationen zwischen den Medikamenten sind Anzeichen auf eine *in vitro* Kreuzresistenz oder legen einen ähnlichen Aufnahmeweg, Wirk- oder Resistenzmechanismus nahe. Das Wissen um Kreuzresistenzen bestärkt zudem die Wichtigkeit der Kombinationstherapie<sup>145</sup> und muss in der Auswahl der Kombinationspartner berücksichtigt werden.

Wir stellten eine signifikante positive Korrelation zwischen Ferroquin und Chloroquin fest. Gegen eine bestehende molekular bedingte Kreuzresistenz zwischen Chloroquin und Ferroquin sprechen jedoch folgende Beobachtungen:

Bei der genaueren Betrachtung der Werte zeigt sich, dass die Chloroquinresistenz sowohl gemeinsam mit erhöhten Ferroquin  $IC_{50}$ -Werten als auch gemeinsam mit niedrigen Ferroquin  $IC_{50}$ -Werten auftritt.

Vergleicht man die Korrelation zwischen Ferroquin und Chloroquin ( $r = 0,66$ ) mit der Korrelation zwischen Amodiaquin und Chloroquin ( $r = 0,88$ ), bei denen eine Kreuzresistenz bekannt ist, so ist letztere deutlich höher.



**Abb. 11 Korrelationen im Vergleich,**  
AQ = Amodiaquin, CQ = Chloroquin, FQ = Ferroquin, log= logtransformierte  $IC_{50}$ -Werte in nmol/l

Bei einer Kreuzresistenz würde man also eine größere Korrelation erwarten. Auch die grafische Darstellung zeigt den Unterschied der Korrelationen. Bei Amodiaquin vs. Chloroquin wird diese eindeutig sichtbar, bei Ferroquin vs. Chloroquin ist der Grad an Streuung sichtbar größer (s. auch Abb. 11).

Da Ferroquin sich noch in der klinischen Entwicklung befindet, sind noch nicht viele Ergebnisse zur *in vitro* Aktivität geschweige denn zur *in vivo* Aktivität vorhanden.

Die Datenlage zur Kreuzresistenz ist kontrovers: Signifikante Korrelationen fanden sich auch bei Barends et al. (2007), Atteke et al. (2003) und Pradines et al. (2001, 2002), allerdings sprechen sich die Autoren gegen eine Kreuzresistenz aus, mit der Begründung, dass die Determinationskoeffizienten dafür zu niedrig sind.

Stattdessen wird angenommen, dass die positive Korrelation der beiden Substanzen durch strukturelle Ähnlichkeiten und Gemeinsamkeiten im Wirkmechanismus verursacht wird.<sup>84-87</sup>

Bei der hier vorliegenden Sensitivitätstestung wurde für Chloroquin und Ferroquin ein Determinationskoeffizient von 0,4 (s. Tabelle 5) errechnet, das heißt 40% der Varianz von Ferroquin lassen sich durch die Varianz der Empfindlichkeit auf Chloroquin erklären.

Die Ergebnisse von Henry et al. (2008) und Kreidenweiss et al. (2004) lassen keine Kreuzresistenz vermuten. Auch die Tatsache, dass Ferroquin auch bei Chloroquin-resistenten Parasiten effektiv ist, spricht gegen eine Kreuzresistenz.<sup>76,88</sup>

#### **Analyse der Korrelation von Parasiteneliminationszeit und $IC_{50}$**

Diese Analyse zeigte keine signifikante Korrelation zwischen  $IC_{50}$ -Werten von Ferroquin vor Therapiebeginn und der Parasiteneliminationszeit im Ferroquinmonotherapiearm ( $n = 13$ ,  $r = 0,18$ ,  $p = 0,56$ ) und eine signifikante positive Korrelation der  $IC_{50}$  für Ferroquin und der Parasiteneliminationszeit in den Zweigen mit Kombinationstherapie ( $n = 38$ ,  $r = 0,46$ ,  $p = 0,004$ ,  $r^2 = 0,21$ ). Zu beachten ist, dass den Patienten in den Kombinationstherapiegruppen unterschiedliche Dosen an Ferroquin und zudem Artesunat verabreicht wurden und dass die Stichprobe mit 38 Patienten deutlich größer ist als die der Ferroquinmonotherapie. Die Ergebnisse lassen sich somit nicht ohne weiteres vergleichen. Setzt man die bekannte gute Wirksamkeit von Artesunat voraus, lässt sich mit unseren Ergebnissen kein sicherer Zusammenhang zwischen der klinisch-beschreibenden Variable „Parasiteneliminationszeit“ und dem durch das *in vitro* Verfahren gewonnenen  $IC_{50}$ -Wert für Ferroquin feststellen. Zudem ließ sich auch keine Tendenz hierfür in der Ferroquinmonotherapie erkennen. Der niedrige Determinationskoeffizient (Korrelation von  $IC_{50}$  von Ferroquin mit Parasiteneliminationszeit im Kombinationsarm) spricht ebenfalls gegen eine starke Korrelation. Allerdings zeigen die Daten, dass bei weiteren Studien ein stärkeres Augenmerk auf die *in vitro* Testung gelegt werden sollte, damit schwächere oder komplexere Zusammenhänge untersucht werden können.

Eine mögliche Erklärung für den schwachen Zusammenhang zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen liefert die Semi-Immunität, welche im Gabun, einem Hochendemieland der Malaria, bei den Jugendlichen und Erwachsenen sehr ausgeprägt ist. Diese Semi-Immunität wirkt sich auf die klinische Antwort aus und fördert die Parasitenelimination unabhängig von Resistenzen der Parasiten.<sup>142</sup>

Eine Korrelation von  $IC_{50}$  und Parasiteneliminationszeit bzw. Therapieversagen wäre in diesen Gebieten bei Kleinkindern möglicherweise messbar.<sup>142</sup>

In der *in vitro* Testung wird der Einfluss der Semi-Immunität durch die starke Verdünnung der Proben mit Kulturmedium und Blut eines nicht immunen Spenders verringert.<sup>142</sup>

Zur Klärung der Frage, ob ein Zusammenhang besteht zwischen einer erhöhten  $IC_{50}$  und einer längeren Parasiteneliminationszeit bzw. einem Therapieversagen bedarf es zudem einer größeren Stichprobe.

### **4.3. Analyse der Therapieversager**

#### ***IC<sub>50</sub>-Werte der klinischen Therapieversager im Vergleich zu den Proben der Patienten mit adäquater klinischer Antwort***

Im T-Test fand sich kein signifikanter Unterschied der  $IC_{50}$ -Mittelwerte für Ferroquin bei den Patienten mit bzw. ohne Therapieversagen. Da der  $IC_{50}$ -Wert ein parasitenbezogener Wert ist, würde ein signifikanter Unterschied eine Resistenz gegenüber Ferroquin andeuten.

Die Ergebnisse sprechen also gegen ein Therapieversagen aus Resistenzgründen und man kann annehmen, dass andere, patientenbezogene Faktoren wie Resorption und Verstoffwechslung des Medikaments für das Therapieversagen verantwortlich sind. Um die Nullhypothese verwerfen zu können müsste der Effekt allerdings schon sehr ausgeprägt sein, da die Anzahl der Therapieversager sehr gering war (n=3).

Eine Wiederholung der Analysen in einem großen Kollektiv wäre sicher interessant.

#### 4.4. Bedeutung und Grenzen der *in vitro* Sensitivitätstestung

*In vitro* Daten geben Aufschluss über die Aktivität der getesteten Substanzen gegenüber den Mikroorganismen in Kultur. Die *in vitro* Testung ist eine objektive Methode, unter weitestgehendem Ausschluss von Wirtsfaktoren. Mit ihren quantitativen Ergebnissen ermöglicht sie eine Verlaufsbeobachtung und einen geografischen Vergleich. Als sehr sensibler Test kann sie bei kontinuierlicher Anwendung beginnende Resistenzen frühzeitig aufdecken als *in vivo assays*. Unverzichtbar ist die *in vitro* Testung in der Erforschung neuer Wirksubstanzen gegen Malaria.<sup>52</sup>

Wenn – wie in unserem Fall – die Begriffe „empfindlich“ und „resistent“ nur auf Grenzwerten basieren, kann man daraus nicht ohne weitere Informationen auf die Ergebnisse rückschließen, die man bei einer *in vivo* Testung erhalten hätte (Parasitenelimination, Symptome).<sup>142</sup>

Zu beachten ist auch, dass die meisten Grenzwerte nicht validiert sind. Ist ein Grenzwert für einen *in vitro* Test validiert, so gilt die Validierung nur für genau dieses Verfahren und die untersuchte Population.<sup>142</sup>

Der Grenzwert für Chloroquin wurde durch direkten Vergleich von Ergebnissen klinischer Studien mit Ergebnissen der *in vitro* Testung festgelegt. Die Grenzwerte für andere Antimalariamittel basieren in der Regel nur auf Ergebnissen der *in vitro* Testung.<sup>160</sup>

Die *in vitro* Testung kann klinische Studien über therapeutische Wirksamkeit nicht ersetzen.<sup>142</sup> Klinische Studien untersuchen die Wirksamkeit des Medikamentes am zukünftigen Wirkort – im Wirtsorganismus des Parasiten. Die Immunität der Patienten bestimmt den Krankheitsverlauf mit und wird bei *in vitro* Untersuchungen nicht berücksichtigt. Klinische Studien untersuchen unter anderem die klinische Symptomatik, die Parasiteneliminationszeit, den Verlauf des Plasmaspiegels der Wirksubstanzen und Nebenwirkungen der Substanz.

Wie bei der Korrelation der Parasiteneliminationszeit und  $IC_{50}$  bereits beschrieben, ließen sich aktuell keine Rückschlüsse von einem *in vitro* Ergebnis ( $IC_{50}$ ) auf eine klinische Antwort (Parasiteneliminationszeit) ziehen.

Im Idealfall sollten sich die *in vitro* und *in vivo* Testung ergänzen.<sup>52</sup>

## **4.5. Einflussfaktoren auf die Ergebnisse der Sensitivitätstestung**

### ***Comedikation***

Bei jedem Patienten wurde eine ausführliche Anamnese durchgeführt, insbesondere wurde nach zuvor eingenommenen Medikamenten gefragt. Die Einnahme von Antimalariamedikamenten vor Studienbeginn und auch während der Studie kann trotz Aufklärung und Anamnese nie komplett ausgeschlossen werden.

### ***Messfehler***

An der *Unité des recherches médicales* sind mehrere Labormitarbeiter für die Verarbeitung des Blutes und die *in vitro* Diagnostik verantwortlich. Bis zur endgültigen Auswertung werden viele Einzelschritte durchlaufen, bei denen trotz größter Sorgfalt Fehler nicht ausgeschlossen werden können.

### ***Logistik***

Erwähnenswert sind außerdem die logistischen Herausforderungen, die sich aus den großen räumlichen Entfernungen und Schwierigkeiten, die Patienten trotz vereinbarten Terminen anzutreffen, ergaben. Die entnommenen Proben mussten innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme verarbeitet werden. Bei mehreren Terminen am Tag, langen Fahrwegen und der Tatsache, dass vor Probenverarbeitung der dicke Tropfen gefärbt und ausgewertet werden musste, konnte dies nur durch gute Koordination und ständige Bereitschaft eines Labormitarbeiters erreicht werden.

### **PCR**

Laut Genotypisierung durch *PCR* (durchgeführt in Kenia) waren sämtliche erneut aufgetretenen Parasitämien auf Neuinfektionen zurückzuführen.

Trotz diesem Ergebnis besteht die Möglichkeit, dass ein Parasitenstamm im Zug der ersten *PCR* (*Screening*) nicht entdeckt wurde, durch den Selektionsdruck überlebte und zu einem Rückfall führte.

## **4.6. Bedeutung für die Gesundheitspolitik**

In dieser Arbeit soll erneut die Wichtigkeit von Leitlinien und der kontinuierlichen Aktivitätsmessung der Antimalariamedikamente hervorgehoben werden.

Eine leitliniengerechte Medizin ist essentiell, um die Wirkung der Antimalariamedikamente zu erhalten. Die aktuellen Leitlinien der WHO empfehlen die Anwendung einer Artemisinin-basierten Kombinationstherapie (*ACT*). Diese kann eine Resistenzbildung gegen die Wirksubstanzen verhindern, ist effektiver als die Monotherapie und verringert die Transmission der Erreger.<sup>22</sup>

Die WHO empfiehlt, die Leitlinien frühzeitig, das heißt ab einer Therapieversagerquote von > 10 %, anzupassen.<sup>22</sup> Dieses hat den Vorteil, dass aufkeimenden Resistenzen eine entscheidende Treibkraft – der Selektionsdruck – genommen wird.

Das Beispiel der Rückkehr der Chloroquin-sensiblen Parasiten in Malawi beweist, dass ein Rückgang der Chloroquinresistenz möglich ist. Allerdings bedarf es dafür einer drastischen Reduktion des Selektionsdruckes durch Chloroquin durch dessen Entfernung vom Markt, einer strikten Medikamentenkontrolle, und einer sinnvoll eingesetzten Malariatherapie, die sich nicht nur auf einige Zentren beschränkt.

Die Medikamentengabe lässt sich nur schwer beeinflussen: Obwohl Chloroquin bereits 2003 aus den Leitlinien für die Therapie bei Malaria im Gabun gestrichen wurde, fand es sich, als Kombinationspräparat mit Proguanil, bis mindestens 2010 in der Apotheke in Lambaréné. Im Gegensatz zur langsamen Anwendung der WHO-Leitlinien stehen das schnelle Auftauchen und die rasche Verbreitung resistenter – und somit gut angepasster – Parasiten unter dem Selektionsdruck durch Medikamente.

Probleme für die klinische Forschung besonders in Afrika ergeben sich durch das Misstrauen gegenüber Schulmedizin und die kulturellen Unterschiede.

Bei der klinischen Forschung in Afrika gilt es, den Gegensatz zu überbrücken, der sich zwischen langfristigen Forschungszielen (neue Medikamente) und kurzfristigen Patientenzielen (gesund werden) befindet.

## 4.7. Neue Ansätze im Kampf gegen die Malaria

### ***Optimierung der Verfügbarkeit von Artemisininderivaten***

Die Infektionskrankheit Malaria bleibt eine Herausforderung für Menschen in den Endemiegebieten und für die Forschung. Das häufig angewandte und günstige Arzneimittel Chloroquin ist in vielen Gebieten unwirksam geworden.<sup>105,161</sup>

Die Artemisinin basierte Kombinationstherapie hingegen ist teuer und die Produktion ist abhängig von dem Wachstum und der Ernte von *Artemisia annua*.

Ein Ansatz, der diese Therapie auch für arme Menschen aus ländlichen Gebieten erschwinglich machen soll, ist der Anbau von *Artemisia annua* und die Herstellung der Medikamente direkt vor Ort – in Afrika. Dieses Projekt wird vom deutschen Medikamentenhilfswerk *Action Medeor* unterstützt.<sup>162</sup> Bislang wird Artesunat jedoch noch nicht gemäß den Richtlinien der Qualitätssicherung (*GMP = good manufacturing practice*) hergestellt und ist daher auch noch nicht in Deutschland zugelassen.<sup>146</sup>

Außerdem kann ein Vorläufer von Artemisinin mittlerweile biotechnisch in Hefe hergestellt werden: Ro et al. (2006) beschrieben die Produktion der Artemisininsäure mittels Genmodifizierung am Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*. Aus dem Vorläufer kann neuerdings in einem einfachen photochemischen Verfahren Artemisinin synthetisiert werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen Gewinnung von Artemisinin ist die Semisynthese unabhängig vom Wetter und liefert schnellen Ertrag, was die Therapiekosten der von der WHO empfohlenen Artemisinin-Kombinationstherapie in Zukunft reduzieren könnte.<sup>163,164</sup>

Im Fall einer zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber den Artemisininen oder Versagen der Artemisinin-Kombinationstherapie gibt es jedoch in absehbarer Zeit nur wenige Alternativen.<sup>165</sup>

### ***Andere neue Wirkstoffe in Entwicklung***

Neue Wirksubstanzen, wie die Spiroindolone, Hybridmoleküle wie zum Beispiel die Trioxaquine, synthetische Artemisininanaloga, das Peroxid OZ439, Fosmidomycin und Impfstoffe RTS,S und GMZ2 werden zurzeit erforscht; ihre Entwicklung dauert jedoch ungleich länger als die Resistenzentwicklung bei dem schnell adaptierenden *P. falciparum*.<sup>166,167</sup>

Die Spiroindolone, wie zum Beispiel NITD609, haben einen von den gängigen Antimalariamedikamenten verschiedenen Wirkmechanismus. Sie sind Hemmstoffe der Proteinsynthese mit günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und Hemmkonzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich.<sup>168</sup>

Fosmidomycin befindet sich – in Kombination mit Clindamycin – bereits in der Phase 2 der klinischen Forschung. Sein Wirkort ist der Apikoplast, ein parasitenspezifisches Organell, das v. a. für die Fettsäuresynthese zuständig ist.<sup>169,170</sup>

RTS,S zählt zu den führenden Impfstoffen gegen Malaria. Die Ergebnisse sind vielversprechend, als potenter Impfstoff würde es – einmal verfügbar – zu einem wirksamen Werkzeug bei der Malariakontrolle werden. Die Wirkung der Impfstoffe gegen Malaria auf das Parasitenreservoir in den älteren Kindern und semi-immunen Erwachsenen ist derzeit jedoch noch nicht detailliert erforscht.<sup>171</sup>

Die Eradikation der Malaria stellt eine große Herausforderung dar; sie kann nur mit einem effektiven Zusammenspiel von Forschung, Aufklärung, Präventionsmaßnahmen, schneller und korrekter Diagnosestellung und einem sinnvollen Medikamenteneinsatz gelingen.

## Zusammenfassung

Malaria ist eine Infektionskrankheit von globaler Bedeutung.

Die schnelle Entwicklung und Ausbreitung von Medikamentenresistenzen machen vor allem die durch *Plasmodium falciparum* verursachte Malaria tropica zu einer Herausforderung für die Menschen in endemischen Gebieten und für die Forschung.

Die Entwicklung neuer Medikamente ist ein Eckstein der Malariakontrolle.

Ferroquin – ein Chloroquinderivat – ist eine dieser neuen Wirksubstanzen und befindet sich – in Kombination mit Artesunat – in der Phase 2 der klinischen Forschung.

Im Rahmen einer hierzu durchgeführten klinischen Studie wurden Chloroquin und seine Derivate Amodiaquin und Ferroquin, sowie Artesunat, Chinin und Mefloquin in Lambaréné auf ihre Aktivität bei *P. falciparum*-Isolaten aus Patienten, die anschließend mit Ferroquin behandelt wurden, getestet.

Ziel dieser Arbeit ist die Erhebung des aktuellen Resistenzstatus der genannten Wirkstoffe bei *P. falciparum* in Lambaréné, die Analyse der Korrelationen unter den getesteten Substanzen und der Vergleich klinisch erhobener Daten (Parasitämieverlauf) mit *in vitro* Daten (Hemmwerte).

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten *P. falciparum*-Isolate wurden im Zeitraum von Dezember 2009 bis Juni 2010 entnommen. Das Wachstum der Parasiten unter ansteigenden Konzentrationen der getesteten Wirkstoffe wurde mit einem *HRP2 ELISA* ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Chloroquinresistenz in Lambaréné trotz Änderung der Leitlinien immer noch stark ausgeprägt ist (91 % resistente Isolate).

Ferroquin, Amodiaquin und Artesunat hingegen zeigten eine gute Wirkung *in vitro*.

Einzelne höher als erwartete Werte fanden sich bei Mefloquin und Chinin.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse bestätigten bekannte Muster (Chloroquin vs.

Amodiaquin) und spiegeln strukturelle Verwandtschaft wider (Chloroquin vs.

Ferroquin, Amodiaquin vs. Ferroquin und Chinin vs. Mefloquin).

Ein Vergleich der klinisch erhobenen Daten (Parasitämieverlauf) mit *in vitro* Daten (Hemmwerte) zeigte einen Zusammenhang zwischen der Parasiteneliminationszeit und der  $IC_{50}$ -Werte. Allerdings war dieser nur in der Population von Patienten, die mit einer Kombinationstherapie (Ferroquin und Artesunat) behandelt wurden, aufzufinden. Diese Daten lassen somit keine Rückschlüsse von *in vitro* Daten zu einer Substanz auf *in vivo* Ergebnisse zu.

Die Werte der klinischen Therapieversager zeigten keine signifikante Erhöhung der  $IC_{50}$ -Werte; dies spricht gegen ein Therapieversagen aus Resistenzgründen.

Die präsentierten Untersuchungen veranschaulichen die Notwendigkeit sowohl der *in vivo* als auch der *in vitro* Testung – als zwei sich ergänzende Methoden.

Da Malaria bis zum heutigen Tag eine weit verbreitete Tropenerkrankung ist, haben Chloroquin und seine Derivate wahrscheinlich mehr Leben gerettet als jede andere Medikamentengruppe. Dies spiegelt die Bedeutung wirksamer Medikamente bei der Malariakontrolle wider. Es gilt also die Wirksamkeit bereits erprobter Medikamente zu erhalten und parallel dazu neue Wirkstoffe zu erforschen.

Mittlerweile sind neue Medikamente und Impfstoffe in der Entwicklung.

Die Reduktion der Prävalenz und Mortalitätsrate im Verlauf der letzten Jahre macht Mut, bis zur Eradikation der Malaria ist es allerdings noch ein langer Weg.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Gabun <sup>6</sup> .....	2
Abb. 2 Resistenz als Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve <sup>22</sup> .....	14
Abb. 3 Chloroquin vs. Ferroquin.....	22
Abb. 4 Ferroquin: Strukturbezogener Wirkmechanismus <sup>73,80</sup> .....	23
Abb. 5 Modell eines Kotransportes <sup>107</sup> .....	27
Abb. 6 Screening failures.....	52
Abb. 7 Studienverlauf.....	53
Abb. 8 Dosis-Wirkungskurven von Chloroquin und Ferroquin.....	55
Abb. 9 Verteilung der $IC_{50}$ -Werte (in nMol/l) der getesteten Substanzen. ....	57
Abb. 10 Korrelationsmatrix der logtransformierten $IC_{50}$ -Werte (nmol/l).....	58
Abb. 11 Korrelationen im Vergleich.....	66

## Literaturverzeichnis

1. Meyer CG. *Tropenmedizin: Infektionskrankheiten*. 2007.
2. White NJ. Plasmodium knowlesi: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):172–173.
3. WHO. World Malaria Report 2011. WHO. Available at: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/index.html](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html). Zugegriffen Februar 12, 2012.
4. WHO. World Malaria Report 2010. Available at: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/en/). Zugegriffen Februar 26, 2011.
5. Karl Iten. Klima - Klimadiagramm Gabun - Lambaréné. Available at: <http://www.iten-online.ch/klima/afrika/gabun/lambarene.htm>. Zugegriffen Juni 19, 2013.
6. By Mysid (English version); Bourrichon (French translation). Wikimedia Commons, lizenziert unter CreativeCommons-Lizenz by-sa-2.0-de, URL: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/de/legalcode>. Available at: [http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Topographic\\_map\\_of\\_Gabon-fr.svg](http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Topographic_map_of_Gabon-fr.svg). Zugegriffen Dezember 29, 2012.
7. Issifou S, Kremsner PG. Impact of increasing consultation fees on malaria in Africa. *Wien. Klin. Wochenschr*. 2004;116(9-10):332–333.
8. ClinicalTrials.gov. Dose Ranging Study of Ferroquine With Artesunate in African Adults and Children With Uncomplicated Plasmodium Falciparum Malaria. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00988507?term=ferroquine+AND+malaria&rank=2>. Zugegriffen April 24, 2012.
9. Renz-Polster H, Krautzig S. *Basislehrbuch Innere Medizin, 4.A. (ver. 1.4)*. Urban & Fischer (Elsevier); 2008.
10. Desowitz R. *Manson's Tropical Diseases, 21st Edition*. 2004.
11. MARA/ARMA Collaboration. MARA/ARMA Project Home Page. Available at: <http://www.mara.org.za/>. Zugegriffen Juni 16, 2013.
12. Institut de recherche pour le développement- Software -. The Anopheline mosquitoes of the afrotropical region. Available at: <http://www.mpl.ird.fr/ur016/articles.php?lng=en&pg=237>. Zugegriffen Juni 16, 2013.
13. Wildling E, Winkler S, Kremsner PG, u. a. Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon. *Trop. Med. Parasitol*. 1995;46(2):77–82.
14. Sturm A, Amino R, van de Sand C, u. a. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 2006;313(5791):1287–1290.
15. Graewe S, Rankin KE, Lehmann C, u. a. Hostile takeover by Plasmodium: reorganization of parasite and host cell membranes during liver stage egress. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002224.
16. Hiepe T. *Allgemeine Parasitologie: mit den Grundzügen der Immunbiologie, Diagnostik und Bekämpfung*. Georg Thieme Verlag; 2006.
17. Bozdech Z, Llinás M, Pulliam BL, u. a. The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of Plasmodium falciparum. *PLoS Biol*. 2003;1(1):e5.

18. Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medizinische Mikrobiologie: Verstehen - Lernen - Nachschlagen. ideal für die neue AO.* 2005.
19. Lell B, Brandts CH, Graninger W, Kreamsner PG. The circadian rhythm of body temperature is preserved during malarial fever. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2000;112(23):1014–1015.
20. Anand AC, Puri P. Jaundice in malaria. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005;20(9):1322–1332.
21. Burchard GD. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis: mit Reise- und Migrationsmedizin; 287 Tabellen;* Georg Thieme Verlag; 2010.
22. WHO. Guidelines for the treatment of malaria, second edition. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241547925/en/index.html>. Zugegriffen Februar 8, 2011.
23. Tangpukdee N, Duangdee C, Wilairatana P, Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol.* 2009;47(2):93–102.
24. Mwangi TW, Mohammed M, Dayo H, Snow RW, Marsh K. Clinical algorithms for malaria diagnosis lack utility among people of different age groups. *Trop. Med. Int. Health.* 2005;10(6):530–536.
25. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature.* 2002;415(6872):673–679.
26. Carlson J, Helmsby H, Hill AV, u. a. Human cerebral malaria: association with erythrocyte rosetting and lack of anti-rosetting antibodies. *Lancet.* 1990;336(8729):1457–1460.
27. Menendez C, Fleming AF, Alonso PL. Malaria-related Anaemia. *Trends in Parasitology.* 2000;16(11):469–476.
28. Dondorp AM, Angus BJ, Chotivanich K, u. a. Red blood cell deformability as a predictor of anemia in severe falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999;60(5):733–737.
29. Helbok R, Kendjo E, Issifou S, u. a. The Lambaréné Organ Dysfunction Score (LODS) is a simple clinical predictor of fatal malaria in African children. *J. Infect. Dis.* 2009;200(12):1834–1841.
30. WHO. Fact sheet N°94 Malaria. *WHO.* Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. Zugegriffen Juli 30, 2013.
31. Amaratunga C, Lopera-Mesa TM, Brittain NJ, u. a. A Role for Fetal Hemoglobin and Maternal Immune IgG in Infant Resistance to Plasmodium falciparum Malaria. *PLoS ONE.* 2011;6(4):e14798.
32. Langhorne J, Ndungu FM, Sponaas A-M, Marsh K. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nat. Immunol.* 2008;9(7):725–732.
33. Pinkevych M, Petravic J, Chelimo K, u. a. The dynamics of naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum infection. *PLoS Comput. Biol.* 2012;8(10):e1002729.
34. Hviid L. Naturally acquired immunity to Plasmodium falciparum malaria in Africa. *Acta Trop.* 2005;95(3):270–275.
35. B elard S, Issifou S, Hounkpatin AB, u. a. A Randomized Controlled Phase Ib Trial of the Malaria Vaccine Candidate GM22 in African Children. *PLoS ONE.* 2011;6(7):e22525.

36. Sabchareon A, Burnouf T, Ouattara D, u. a. Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991;45(3):297–308.
37. Koonin EV. Darwinian evolution in the light of genomics. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(4):1011–1034.
38. Haldane JBS. *The Causes of Evolution*. Princeton University Press; 1990.
39. Carter R, Mendis KN. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(4):564–594.
40. Luzzatto L, Nwachuku-Jarrett ES, Reddy S. Increased sickling of parasitised erythrocytes as mechanism of resistance against malaria in the sickle-cell trait. *Lancet.* 1970;1(7642):319–321.
41. Ferreira A, Marguti I, Bechmann I, u. a. Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection. *Cell.* 2011;145(3):398–409.
42. Hayakawa T, Culleton R, Otani H, Horii T, Tanabe K. Big bang in the evolution of extant malaria parasites. *Mol. Biol. Evol.* 2008;25(10):2233–2239.
43. Poinar G Jr. Plasmodium dominicana n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. *Syst. Parasitol.* 2005;61(1):47–52.
44. Bruce-Chwatt LJ, Garrett-Jones C, Weitz B. Ten years' study (1955–64) of host selection by anopheline mosquitos. *Bull World Health Organ.* 1966;35(3):405–439.
45. Cox F. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites & Vectors.* 2010;3(1):5.
46. Gething PW, Smith DL, Patil AP, u. a. Climate change and the global malaria recession. *Nature.* 2010;465(7296):342–345.
47. Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1985;79(1):1–11.
48. Dondorp AM, Fanello CI, Hendriksen ICE, u. a. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. *Lancet.* 2010;376(9753):1647–1657.
49. Dondorp A, Nosten F, Stepniewska K, u. a. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. *Lancet.* 2005;366(9487):717–725.
50. Bruce-Chwatt LJ, Black RH, Canfield CJ, u. a. WHO | Chemotherapy of malaria. Revised 2nd edition. 1986. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO\\_MONO\\_27\\_%282ed%29.pdf](http://whqlibdoc.who.int/monograph/WHO_MONO_27_%282ed%29.pdf). Zugegriffen Februar 8, 2011.
51. WHO. Chemotherapy of Malaria and Resistance to Antimalarials. 1973.
52. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* 2003;19(4):175–181.
53. Mordmüller B, Kremsner PG. Malarial parasites vs. antimalarials: never-ending rumble in the jungle. *Curr. Mol. Med.* 2006;6(2):247–251.
54. Hastings IM, Watkins WM, White NJ. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1420):505–519.
55. Le Bras J. Mécanismes et dynamique des chimiorésistances de Plasmodium falciparum. *Bull pathexo.* 1999;92(4):236–241.

56. WHO. Global report on antimalarial efficacy and drug resistance: 2000-2010. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/index.html>. Zugegriffen Februar 8, 2011.
57. Babiker HA, Hastings IM, Swedberg G. Impaired fitness of drug-resistant malaria parasites: evidence and implication on drug-deployment policies. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(5):581–593.
58. Green MD. Antimalarial drug resistance and the importance of drug quality monitoring. *J Postgrad Med.* 2006;52(4):288–290.
59. WHO. Medicines: counterfeit medicines. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/>. Zugegriffen Februar 5, 2011.
60. Kremsner PG, Krishna S. Antimalarial combinations. *Lancet.* 2004;364(9430):285–294.
61. Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int. J. Parasitol.* 2010;40(10):1109–1118.
62. Bloland PB. WHO | Drug resistance in malaria. Available at: [http://www.who.int/drugresistance/publications/WHO\\_CDS\\_CSR\\_DRS\\_2001\\_4/en/](http://www.who.int/drugresistance/publications/WHO_CDS_CSR_DRS_2001_4/en/). Zugegriffen Dezember 1, 2010.
63. Price RN, Uhlemann A-C, Brockman A, u. a. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *pfmdr1* gene copy number. *Lancet.* 2004;364(9432):438–447.
64. Kessl JJ, Meshnick SR, Trumppower BL. Modeling the molecular basis of atovaquone resistance in parasites and pathogenic fungi. *Trends Parasitol.* 2007;23(10):494–501.
65. Vaidya AB, Mather MW. Atovaquone resistance in malaria parasites. *Drug Resist. Updat.* 2000;3(5):283–287.
66. Gatton ML, Martin LB, Cheng Q. Evolution of resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004;48(6):2116–2123.
67. Trape JF, Pison G, Spiegel A, Enel C, Rogier C. Combating malaria in Africa. *Trends Parasitol.* 2002;18(5):224–230.
68. Noedl H. Histidine-Rich Protein II (HRP2) at <http://malaria.farch.net>. 2001. Available at: <http://www.meduniwien.ac.at/user/harald.noedl/malaria/hrp2.html>. Zugegriffen März 17, 2011.
69. Papalexis V, Siomos MA, Campanale N, u. a. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001;115(1):77–86.
70. Vanschalkwyk D, Egan T. Quinoline-resistance reversing agents for the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Drug Resistance Updates.* 2006;9(4-5):211–226.
71. Kelly JX, Smilkstein MJ, Brun R, u. a. Discovery of dual function acridones as a new antimalarial chemotype. *Nature.* 2009;459(7244):270–273.
72. Blackie MA, Chibale K. Metallocene antimalarials: the continuing quest. *Metal-Based Drugs.* 2008;2008.
73. Dive D, Biot C. Ferrocene Conjugates of Chloroquine and other Antimalarials: the Development of Ferroquine, a New Antimalarial. *ChemMedChem.* 2008;3(3):383–391.

74. Top S, Tang J, Vessières A, u. a. Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem. Commun.* 1996;(8):955.
75. Biot C. Ferroquine: a new weapon in the fight against malaria. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents.* 2004;3(2):135–147.
76. Henry M, Briolant S, Fontaine A, u. a. In Vitro Activity of Ferroquine Is Independent of Polymorphisms in Transport Protein Genes Implicated in Quinoline Resistance in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008;52(8):2755–2759.
77. Center for History and New Media. Clinical Trials gov. Available at: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00988507?intr=%22ferroquine+%28SSR97193%29%22&rank=1>. Zugegriffen November 30, 2010.
78. Blackie MAL, Beagley P, Croft SL, u. a. Metallocene-based antimalarials: An exploration into the influence of the ferrocenyl moiety on in vitro antimalarial activity in chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2007;15(20):6510–6516.
79. Dubar F, Khalife J, Brocard J, Dive D, Biot C. Ferroquine, an Ingenious Antimalarial Drug –Thoughts on the Mechanism of Action. *Molecules.* 2008;13(11):2900–2907.
80. Biot C, Taramelli D, Forfar-Bares I, u. a. Insights into the Mechanism of Action of Ferroquine. Relationship between Physicochemical Properties and Antiplasmodial Activity. *Mol. Pharmaceutics.* 2005;2(3):185–193.
81. Biot C, Glorian G, Maciejewski LA, u. a. Synthesis and antimalarial activity in vitro and in vivo of a new ferrocene- chloroquine analogue. *J. Med. Chem.* 1997;40(23):3715–3718.
82. Biot C, Pradines B, Sergeant M-H, u. a. Design, synthesis, and antimalarial activity of structural chimeras of thiosemicarbazone and ferroquine analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2007;17(23):6434–6438.
83. Biot C, Chavain N, Dubar F, u. a. Structure-activity relationships of 4-N-substituted ferroquine analogues: Time to re-evaluate the mechanism of action of ferroquine. *Journal of Organometallic Chemistry.* 2009;694(6):845–854.
84. Barends M, Jaidee A, Khaohirun N, Singhasivanon P, Nosten F. In vitro activity of ferroquine (SSR 97193) against *Plasmodium falciparum* isolates from the Thai-Burmese border. *Malar. J.* 2007;6:81.
85. Atteke C, Mezui Me Ndong J, Aubouy A, u. a. In vitro susceptibility to a new antimalarial organometallic analogue, ferroquine, of *Plasmodium falciparum* isolates from the Haut-Ogooue region of Gabon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2003;51(4):1021–1024.
86. Pradines B, Fusai T, Daries W, u. a. Ferrocene-chloroquine analogues as antimalarial agents: in vitro activity of ferrochloroquine against 103 Gabonese isolates of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001;48(2):179–184.
87. Pradines B, Tall A, Rogier C, u. a. In vitro activities of ferrochloroquine against 55 Senegalese isolates of *Plasmodium falciparum* in comparison with those of standard antimalarial drugs. *Tropical Medicine & International Health.* 2002;7(3):265–270.

88. Kreidenweiss A, Kreamsner PG, Dietz K, Mordmueller B. In vitro activity of ferroquine (SAR97193) is independent of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(6):1178–1181.
89. Domarle O, Blampain G, Agnani H, et al. In Vitro Antimalarial Activity of a New Organometallic Analog, Ferrocene-Chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(3):540–544.
90. Chavain N, Vezin H, Dive D, et al. Investigation of the Redox Behavior of Ferroquine, a New Antimalarial. *Molecular Pharmaceutics*. 2008;5(5):710–716.
91. Wu X, Tiekink ERT, Kostetski I, et al. Antiplasmodial activity of ferrocenyl chalcones: Investigations into the role of ferrocene. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;27(2-3):175–187.
92. Daher W, Pelinski L, Klieber S, et al. In vitro metabolism of ferroquine (SSR97193) in animal and human hepatic models and antimalarial activity of major metabolites on *Plasmodium falciparum*. *Drug Metabolism and Disposition*. 2006;34(4):667–682.
93. Daher W, Biot C, Fandeur T, et al. Assessment of *Plasmodium falciparum* resistance to ferroquine (SSR97193) in field isolates and in W2 strain under pressure. *Malaria Journal*. 2006;5(1):11.
94. Chim P, Lim P, Sem R, et al. The in-vitro antimalarial activity of ferrochloroquine, measured against Cambodian isolates of *Plasmodium falciparum*. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 2004;98(4):419–424.
95. Sanofi aventis. Protocole d'étude clinique amendé 1 Etude N° DRI 10382 FARM. 2009.
96. Stich A, Schlitzer M. Wirkstoffe zur Therapie und Prophylaxe der Malaria. *Chemotherapie Journal*. 2008. Available at: <http://www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de/CTJ/CTJ.HTM>. Zugegriffen Dezember 6, 2010.
97. Rosenthal PJ. *Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery*, S.15-25. Humana Press; 2001.
98. Hochman G. From autonomy to partial alignment: national malaria programs in the time of global eradication, Brazil, 1941-1961. *Can Bull Med Hist*. 2008;25(1):161–192.
99. WHO. The world health report 1999 - making a difference. 1999. Available at: <http://www.who.int/whr/1999/en/index.html>. Zugegriffen Dezember 1, 2010.
100. Yayon A, Cabantchik ZI, Ginsburg H. Susceptibility of human malaria parasites to chloroquine is pH dependent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(9):2784.
101. Slater AF. Chloroquine: mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacology & therapeutics*. 1993;57(2-3):203–235.
102. Francis SE, Sullivan DJ, Goldberg DE. Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annu. Rev. Microbiol*. 1997;51(1):97–123.
103. Projean D, Baune B, Farinotti R, et al. In Vitro Metabolism of Chloroquine: Identification of Cyp2c8, Cyp3a4, and Cyp2d6 as the Main Isoforms Catalyzing N-Desethylchloroquine Formation. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003;31(6):748–754.
104. WHO. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/whohtmlmal20051103/en/index.html>. Zugegriffen Dezember 7, 2010.

105. Wernsdorfer WH, Payne D. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol. Ther.* 1991;50(1):95–121.
106. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, u. a. A critical role for PfCRT K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance. *The EMBO journal.* 2005;24(13):2294–2305.
107. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends in parasitology.* 2007;23(7):332–339.
108. Watt G, Long GW, Grogl M, Martin SK. Reversal of drug-resistant *falciparum* malaria by calcium antagonists: potential for host cell toxicity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1990;84(2):187–190.
109. Sa JM, Twu O. Protecting the malaria drug arsenal: halting the rise and spread of amodiaquine resistance by monitoring the PfCRT SVMNT type. *Malaria Journal.* 2010;9(1):374.
110. Hawley SR, Bray PG, Park BK, Ward SA. Amodiaquine accumulation in *Plasmodium falciparum* as a possible explanation for its superior antimalarial activity over chloroquine. *Molecular and biochemical parasitology.* 1996;80(1):15–25.
111. Mungthin M, Bray PG, Ridley RG, Ward SA. Central role of hemoglobin degradation in mechanisms of action of 4-aminoquinolines, quinoline methanols, and phenanthrene methanols. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1998;42(11):2973.
112. Alifrangis M, Dalgaard MB, Lusingu JP, u. a. Occurrence of the Southeast Asian/South American SVMNT haplotype of the chloroquine-resistance transporter gene in *Plasmodium falciparum* in Tanzania. *J. Infect. Dis.* 2006;193(12):1738–1741.
113. Schlagenhauf P, Adamcova M, Regep L, Schaerer MT, Rhein HG. The position of mefloquine as a 21st century malaria chemoprophylaxis. *Malaria Journal.* 2010;9(1):357.
114. Fitch CD. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs. *Life sciences.* 2004;74(16):1957–1972.
115. Summers RL, Nash MN, Martin RE. Know your enemy: understanding the role of PfCRT in drug resistance could lead to new antimalarial tactics. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012;69(12):1967–1995.
116. Mockenhaupt FP. Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today (Regul. Ed.).* 1995;11(7):248–253.
117. Hüttinger F, Satimai W, Wernsdorfer G, u. a. Sensitivity to artemisinin, mefloquine and quinine of *Plasmodium falciparum* in northwestern Thailand. *Wien Klin Wochenschr.* 2010;122(S3):52–56.
118. Liu C-H. Linkage analysis identifies an ubiquitin transferase gene as a novel marker for reduced quinine and quinidine responsiveness in *Plasmodium falciparum*. Available at: [http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/frontdoor.php?source\\_opus=13019](http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/frontdoor.php?source_opus=13019). Zugegriffen Februar 12, 2012.
119. Boudreau E, Webster HK, Pavanand K, Thosingha L. Type II Mefloquine Resistance in Thailand. *The Lancet.* 1982;320(8311):1335.

120. WHO. Surge in demand leads to shortage of artemisinin-based combination therapy for malaria. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr77/en/index.html>. Zugegriffen Dezember 20, 2010.
121. Cui L, Su X. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(8):999–1013.
122. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin-the debate continues. *Molecules.* 2010;15(3):1705–1721.
123. Ding XC, Beck H-P, Raso G. Plasmodium sensitivity to artemisinins: magic bullets hit elusive targets. *Trends Parasitol.* 2010. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169061>. Zugegriffen Januar 18, 2011.
124. Meshnick SR, Thomas A, Ranz A, Xu C-M, Pan H-Z. Artemisinin (qinghaosu): the role of intracellular heme in its mechanism of antimalarial action. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1991;49(2):181–189.
125. Pandey AV, Tekwani BL, Singh RL, Chauhan VS. Artemisinin, an endoperoxide antimalarial, disrupts the hemoglobin catabolism and heme detoxification systems in malarial parasite. *J. Biol. Chem.* 1999;274(27):19383–19388.
126. Yang YZ, Little B, Meshnick SR. Alkylation of proteins by artemisinin. Effects of heme, pH, and drug structure. *Biochem. Pharmacol.* 1994;48(3):569–573.
127. Yang YZ, Asawamahasakda W, Meshnick SR. Alkylation of human albumin by the antimalarial artemisinin. *Biochem. Pharmacol.* 1993;46(2):336–339.
128. Bhisutthibhan J, Philbert MA, Fujioka H, Aikawa M, Meshnick SR. The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein: subcellular localization and calcium binding. *Eur. J. Cell Biol.* 1999;78(9):665–670.
129. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem IDA, u. a. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature.* 2003;424(6951):957–961.
130. Li W, Mo W, Shen D, u. a. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. *PLoS Genet.* 2005;1(3):e36.
131. del Pilar Crespo M, Avery TD, Hanssen E, u. a. Artemisinin and a series of novel endoperoxide antimalarials exert early effects on digestive vacuole morphology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008;52(1):98–109.
132. Hartwig CL, Rosenthal AS, D'Angelo J, u. a. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of Plasmodium falciparum malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochem. Pharmacol.* 2009;77(3):322–336.
133. Noedl H, Se Y, Schaefer K, u. a. Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *New England Journal of Medicine.* 2008;359(24):2619–2620.
134. Rogers WO, Sem R, Tero T, u. a. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in southern Cambodia. *Malar. J.* 2009;8:10.
135. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, u. a. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *New England Journal of Medicine.* 2009;361(5):455.
136. Legrand E, Volney B, Meynard J-B, Mercereau-Puijalon O, Esterre P. In Vitro Monitoring of Plasmodium falciparum Drug Resistance in French Guiana: a Synopsis of Continuous Assessment from 1994 to 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008;52(1):288–298.

137. Jambou R, Legrand E, Niang M, u. a. Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet*. 2005;366(9501):1960–1963.
138. WHO. Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500838/en/index.html>. Zugegriffen März 18, 2011.
139. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, u. a. A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Nature*. 2014;505(7481):50–55.
140. Ljungström I, Moll K, Perlmann H, u. a. *Methods in malaria research*. MR4/ATCC; 2008. Available at: [http://www.mr4.org/Portals/3/Methods\\_In\\_Malaria\\_Research-5theditionv5-2.pdf](http://www.mr4.org/Portals/3/Methods_In_Malaria_Research-5theditionv5-2.pdf). Zugegriffen April 3, 2011.
141. Gluzman IY, Schlesinger PH, Krogstad DJ. Inoculum effect with chloroquine and Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother*. 1987;31(1):32–36.
142. WHO. Field application of in vitro assays sensitivity of human malaria parasites antimalarial drugs. Available at: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241595155/en/index.html>. Zugegriffen Januar 26, 2011.
143. R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available at: <http://www.r-project.org/>. Zugegriffen Oktober 7, 2013.
144. Held J, Westerman R, Kremsner PG, Mordmüller B. In Vitro Activity of Mirincamycin (U24729A) against Plasmodium falciparum Isolates from Gabon. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):540–542.
145. Pradines B, Mabika Mamfoumbi M, Parzy D, u. a. In vitro susceptibility of Gabonese wild isolates of Plasmodium falciparum to artemether, and comparison with chloroquine, quinine, halofantrine and amodiaquine [Parasitology. 1998 Dec;117 ( Pt 6):541-5.].
146. Brosius F. *SPSS 8*. International Thomson Publishing; 1998.
147. Luhmann M. *R für Einsteiger: Einführung in die Statistiksoftware für die Sozialwissenschaften. Mit Online-Materialien*. Originalausgabe. Beltz; 2010.
148. Sachs L. *Angewandte Statistik*. Springer DE; 2003.
149. Rasch B, Friese M, Hofmann W, Naumann E. *Quantitative Methoden 1. Einführung in Die Statistik Für Psychologen Und Sozialwissenschaftler*. Springer DE; 2006.
150. Borrmann S, Binder RK, Adegnika AA, u. a. Reassessment of the resistance of Plasmodium falciparum to chloroquine in Gabon: implications for the validity of tests in vitro vs. in vivo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002;96(6):660–663.
151. Djimdé A, Doumbo OK, Cortese JF, u. a. A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant Falciparum Malaria. *N Engl J Med*. 2001;344(4):257–263.
152. Kublin JG, Cortese JF, Njunju EM, u. a. Reemergence of chloroquine-sensitive Plasmodium falciparum malaria after cessation of chloroquine use in Malawi. *J. Infect. Dis*. 2003;187(12):1870–1875.

153. Metzger W, Mordmüller B, Graninger W, Bienzle U, Kremsner PG. Sulfadoxine/pyrimethamine or chloroquine/clindamycin treatment of Gabonese school children infected with chloroquine resistant malaria. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995;36(4):723–728.
154. Basco LK, Ndounga M, Keundjian A, Ringwald P. Molecular epidemiology of malaria in cameroon. IX. Characteristics of recrudescence and persistent Plasmodium falciparum infections after chloroquine or amodiaquine treatment in children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002;66(2):117–123.
155. Adjuik M, Agnamey P, Babiker A, u. a. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet.* 2002;359(9315):1365–1372.
156. Philipps J, Radloff P, Wernsdorfer W, Kremsner P. Follow-up of the susceptibility of Plasmodium falciparum to antimalarials in Gabon. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(5):612–618.
157. Brandts CH, Wernsdorfer WH, Kremsner PG. Decreasing chloroquine resistance in Plasmodium falciparum isolates from Gabon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 2000;94(5):554–556.
158. Ramharter M, Wernsdorfer WH, Kremsner PG. In vitro activity of quinolines against Plasmodium falciparum in Gabon. *Acta Tropica.* 2004;90(1):55–60.
159. Ndong JMM, Atteke C, Aubouy A, u. a. In vitro activity of chloroquine, quinine, mefloquine and halofantrine against Gabonese isolates of Plasmodium falciparum. *Trop. Med. Int. Health.* 2003;8(1):25–29.
160. Aubouy A, Mayombo J, Keundjian A, u. a. Short Report: Lack of Prediction of Amodiaquine Efficacy in Treating Plasmodium Falciparum Malaria by in Vitro Tests. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):294–296.
161. Winstanley PA. Chemotherapy for Falciparum Malaria: The Armoury, the Problems and the Prospects. *Trends in Parasitology.* 2000;16(4):146–153.
162. Katja Kleefeld PH, action medeor e. V. action medeor. Available at: <http://www.medeor.org/Projekte/Lokale-Produktion>. Zugegriffen April 13, 2011.
163. Ro D-K, Paradise EM, Ouellet M, u. a. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature.* 2006;440(7086):940–943.
164. Lévesque F, Seeberger PH. Continuous-flow synthesis of the anti-malaria drug artemisinin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012;51(7):1706–1709.
165. Enserink M. Malaria's Drug Miracle in Danger. *Science.* 2010;328(5980):844–846.
166. Wiesner J, Ortman R, Jomaa H, Schlitzer M. Neue Antimalaria-Wirkstoffe. *Angewandte Chemie.* 2003;115(43):5432–5451.
167. Mordmüller B. New medicines for malaria. *Wien Klin Wochenschr.* 2010;122(S1):19–22.
168. Rottmann M, McNamara C, Yeung BKS, u. a. Spiroindolones, a Potent Compound Class for the Treatment of Malaria. *Science.* 2010;329(5996):1175–1180.
169. Zhang B, Watts KM, Hodge D, u. a. A second target of the antimalarial and antibacterial agent fosmidomycin revealed by cellular metabolic profiling. *Biochemistry.* 2011 May 3;50(17):3570–7. doi: 10.1021/bi200113y. Epub 2011 Apr 11.
170. Wells TNC, Alonso PL, Gutteridge WE. New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(11):879–891.

171. Chilengi R, Gitaka J. Is vaccine the magic bullet for malaria elimination? A reality check. *Malaria Journal*. 2010;9(Suppl 3):S1.
172. Alonso PL, Brown G, Arevalo-Herrera M, u. a. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med*. 2011;8(1):e1000406.

## Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Aktivitätsbestimmung von Chloroquin und Chloroquinderivaten in klinischen *Plasmodium falciparum*-Isolaten in Gabun/Zentralafrika“ selbständig verfasst habe

Die Daten-Recherche habe ich eigenständig durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendete Literatur habe ich unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ich habe mich keiner anderen als der genannten Hilfen bedient.

Die *in vitro* Daten wurden mit Unterstützung von Serena Tschan (Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen) und Anne-Marie Nkoma Mouima (Forschungslabor Lambaréné) erhoben.

Thomas Engleitner (Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen) war an der Erstellung der Grafiken und Korrektur der Statistik beteiligt. Serena Tschan unterstützte mich bei der Auswertung der erhobenen Daten und bei der Korrektur des Manuskriptes.

Christian Supan und Benjamin Mordmüller wählten das Thema aus.

Benjamin Mordmüller betreute die Arbeit und korrigierte das Manuskript.

## Danksagung

Mein Dank geht an alle, die an mich glauben und mich immer wieder ermutigen – besonders an meine Eltern, meinen Freund Jonas und seine Familie und meine beiden Geschwister Rebekka und Markus.

Ich danke Benjamin Mordmüller für die außergewöhnlich gute Betreuung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Korrektur.

Peter Kreamsner danke ich für die Annahme als Doktorandin und die Überlassung des Themas.

Ich danke Serena Tschan, die mir sämtliche experimentellen Methoden beigebracht hat, für ihre Geduld und Unterstützung von Anfang an.

Bei Thomas Engleitner bedanke ich mich für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Grafiken.

Ute Teichgräber danke ich für die gründliche Korrektur dieser Arbeit in der Endphase. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Irene Weinand und Partric Sedelmayer für ihren begeisternden Biologieunterricht bedanken.

Ein besonderer Dank geht an die Patienten, das Ferroquine-Team unter der Leitung von Christian Supan und die Mitarbeiter des Forschungslabors in Lambaréné.