

**Der Malaria-Impfstoffkandidat GMZ2;
Beurteilung der Sicherheit und der humoralen
Immunantwort im Rahmen einer Phase-Ib-Studie in
Gabun**

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

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

vorgelegt von

Treut, Carolin Eva

2015

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. P. G. Kremsner

2. Berichterstatter:

Professor Dr. C. Wolz

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Malaria	1
1.2 Erreger der Malaria.....	2
1.2.1 Entwicklungszyklus von <i>Plasmodium falciparum</i>	2
1.3 Klinik der Malaria tropica	4
1.4 Klinische Immunität	4
1.4.1 Angeborene Immunität.....	4
1.4.2 Erworbene Immunität	7
1.4.3 Humorale Abwehrmechanismen	8
1.5 Impfstoffentwicklung	9
1.5.1 GMZ2-Impfstoff-Kandidat.....	11
1.5.2 Phase-Ia-Studie über GMZ2 an Malaria-naïven Europäern.....	14
1.6 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	16
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	17
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.4 Laborgeräte	18
2.1.5 Software	18
2.2 Studienort.....	18

Inhaltsverzeichnis

2.3	Teilnehmer und Studiendesign	19
2.3.1	Einschlusskriterien	20
2.3.2	Ausschlusskriterien	20
2.4	Messung der Antikörper-Antwort	21
2.4.1	Prinzip des <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	21
2.4.2	Messung der Antikörper-Antwort (Gesamt-IgG)	22
2.4.3	Messung der IgG-Subklassen	25
2.5	Auswertung	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Sicherheit	31
3.2	Immunogenität.....	34
3.2.1	Immunglobulin G (IgG) gegen die Impfantigene	34
3.2.2	Antikörper-Antwort der IgG-Subtypen	38
4	Diskussion.....	43
4.1	Sicherheit der Impfung; klinische Beobachtungen	48
4.2	Immunogenität - Humorale Immunantwort.....	49
4.2.1	IgG - Subklassen	52
4.3	Limitationen der Arbeit.....	54
4.4	Fazit und Ausblick	56
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	59
	Erklärung zum Eigenanteil	69
	Veröffentlichungen	70
	Danksagung	

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einschluss-Werte der Probanden mit Mittelwert (*), bzw. geometrischem Mittelwert (**); (Minimal- bzw. Maximalwert).....	30
Tabelle 2: Anzahl der Teilnehmer mit Nebenwirkungen innerhalb 14 Tagen nach den Impfungen; alle Reaktionen waren von mildem oder mittelgradigem Schweregrad (Grad 1 oder 2).....	33
Tabelle 3: Verhalten der Antikörper gegen GMZ2 an den Tagen 28 bis 365 im Vergleich zu Tag 0	35
Tabelle 4: Verhalten der Antikörper gegen GLURP an den Tagen 28 bis 365 im Vergleich zu Tag 0	35
Tabelle 5: Verhalten der Antikörper gegen MSP3 an den Tagen 28 bis 365 im Vergleich zu Tag 0	36
Tabelle 6: Kovarianzanalyse: Vergleich zwischen der Impf- und Kontrollgruppe adjustiert für die IgG-Konzentration an Tag 0	36
Tabelle 7: Relation der IgG1-Konzentrationen an Tag 84 verglichen mit den IgG1-Konzentrationen vor der Impfung (Tag0)	40
Tabelle 8: Relation der IgG3-Konzentrationen an Tag 84 verglichen mit den IgG3-Konzentrationen vor der Impfung (Tag0)	40
Tabelle 9: Relation der IgG2-Konzentrationen an Tag 84 verglichen mit den IgG2-Konzentrationen vor der Impfung (Tag0)	41
Tabelle 10: Kovarianzanalyse der Subgruppen IgG1-IgG3: Vergleich zwischen der Impf- und Kontrollgruppe an Tag 84 adjustiert für die IgG1- IgG3-Konzentrationen an Tag 0	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abbildung 1: Verteilung von <i>P. falciparum</i>	1
Abbildung 2: Lebenszyklus von <i>P. falciparum</i> , modifiziert nach Center of Disease Control (CDC)	3
Abbildung 4: Schema des Seren-Auftrags auf die ELISA-Platten	24
Abbildung 5: Schema der Seren-Auftragung für die IgG-Subklassen. Beispielhaft für IgG1	26
Abbildung 6: Diagramm zur Zuordnung der Studienteilnehmer zu den beiden Gruppen	29
Abbildung 7: Verteilung der Antikörperkonzentrationen vor der ersten Impfung	34
Abbildung 8: Verlauf der Antikörperkonzentrationen vom Einschluss bis zu Tag 365. Logarithmierte Darstellung der IgG-Konzentrationen.....	38
Abbildung 9: Unterschied der Antikörper-Konzentration nach Impfung mit GMZ2 und Kontrollvakzin (Ratio GMZ2:Kontrolle)	42

Abkürzungsverzeichnis

ADCI	<i>Antibody dependent cellular inhibition</i>
AE	unerwünschtes Ereignis (<i>adverse event</i>)
AMA-1	<i>Apical Membrane Antigen 1</i>
ARDS	Schocklunge (<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CDC	<i>Center of Disease Control and Prevention</i> der Vereinigten Staaten von Amerika
CI	Konfidenzintervall
CSP	<i>Circumsporozoite Protein</i>
d	Tag (<i>day</i>)
EBA-175	<i>Erythrozyte-binding Antigen 175</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EIR	entomologische Inokulationsrate
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
EPI	<i>Expanded Program on Immunization</i>
g	Gramm
G6PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GLURP	<i>Glutamate Rich Protein</i>
GMZ2	Malariainpfstoffkandidat, bestehend aus einem rekombinanten Fusionsprotein zwischen Fragmenten von GLURP und MSP3
Hb	Hämoglobin
HbC	Hämoglobin C
HbE	Hämoglobin E
HbF	fetales Hämoglobin
HbS	Sichelzell-Hämoglobin
HBsAg	Hepatitis B-Oberflächen Antigen

Abkürzungsverzeichnis

HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G, Subklasse 1
IgG2	Immunglobulin G, Subklasse 2
IgG3	Immunglobulin G, Subklasse 3
IgG4	Immunglobulin G, Subklasse 4
kDa	Kilo-Dalton
L. lactis	<i>Lactococcus lactis</i>
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MSP 1	<i>Merozoite Surface Protein 1</i>
MSP 2	<i>Merozoite Surface Protein 2</i>
MSP 3	<i>Merozoite Surface Protein 3</i>
NaCl	Natriumchlorid
NC	Negativkontrolle (<i>negative control</i>)
nm	Nanometer
P.	<i>Plasmodium</i>
PC	Positivkontrolle (<i>positive control</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
RTS,S	Malariaimpfstoffkandidat bestehend aus einem <i>P. falciparum</i> CSP-Fragment und HBsAg-Antigen
SAE	schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (<i>serious adverse event</i>)
SERA-5	<i>Serine Repeat Antigen 5</i>
TMB	3,3',5,5' – Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor

Abkürzungsverzeichnis

WHO Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*)

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Malaria

Die durch den Erreger *Plasmodium falciparum* verursachte Malaria ist eine der häufigsten und bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) kam es im Jahr 2010 zu 216 Millionen Malaria-Infektionen und etwa 655000 Todesfällen (WHO 2011). Etwa 3,3 Milliarden Menschen und damit die Hälfte der Weltbevölkerung leben in Malariarisikogebieten. Im Jahr 2010 wurden 99 Länder als malariaendemisch angegeben. Die weitaus meisten Todesfälle kommen in Afrika südlich der Sahara vor (WHO 2011). Sowohl die Inzidenz und Sterblichkeit an Malaria als auch die Parasitendichte sind bei Kindern im Alter von ein bis fünf Jahren am höchsten (Snow, Craig et al. 1999). Einigen Studien zufolge wird die Inzidenz der *P. falciparum*-Malaria durch die WHO sogar unterschätzt, da sich die WHO nur auf die von den jeweiligen Ländern übermittelten Daten bezieht (Snow, Guerra et al. 2005). Nach Schätzungen von Murray kam es im Jahr 2010 zu etwa 1,24 Millionen malariabedingten Todesfällen, davon 1,13 Millionen in Afrika (Murray, Rosenfeld et al. 2012).

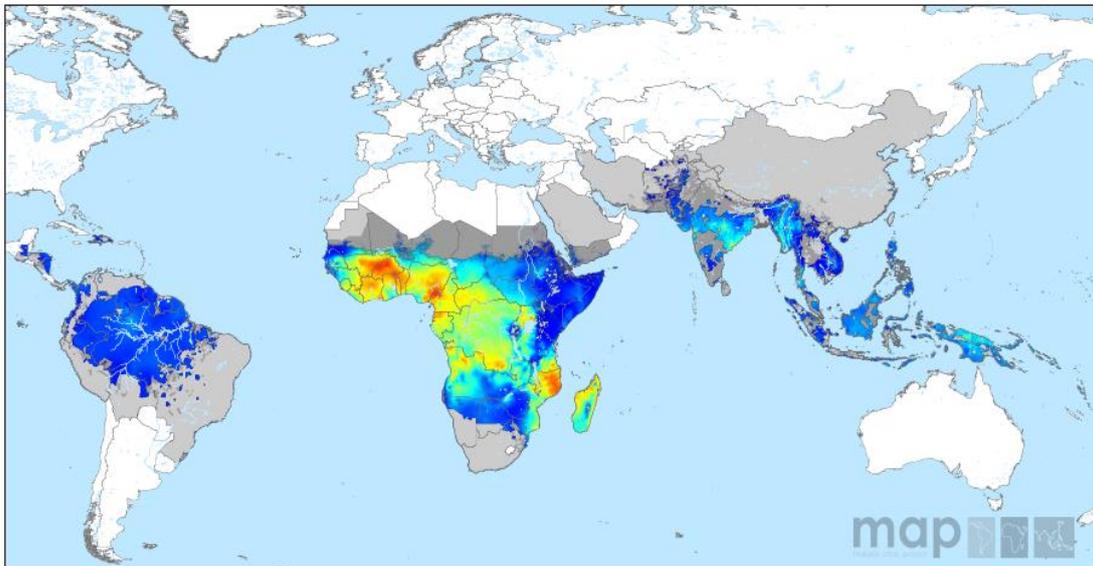


Abbildung 1: Verteilung von *P. falciparum* (<http://www.map.ox.ac.uk/>). Dargestellt als eine kontinuierliche Skala von Blau (0%) nach Rot (70%)

1.2 Erreger der Malaria

Ausgelöst wird die Malaria durch Protozoen der Gattung *Plasmodium*. Es gibt vier weit verbreitete humanpathogene Plasmodienarten, die zu drei verschiedenen klinischen Verlaufsformen der Malaria führen. *P. falciparum* verursacht die Malaria tropica, *P. vivax* und *P. ovale* sind die Erreger der Malaria tertiana und *P. malariae* ist verantwortlich für die Malaria quartana (Knobloch 2002). In Südostasien findet sich eine weitere humanpathogene Plasmodienart: *P. knowlesi*. Zwischenwirt von *P. knowlesi* sind Affen, v.a. der Gattung der Makaken (Rhesusaffen, Javaaffen). Inzwischen gibt es jedoch Berichte, dass diese Spezies häufiger als angenommen Menschen befällt und ähnlich wie *P. falciparum* schwere Verläufe mit Todesfolge nach sich ziehen kann (Singh, Sung et al. 2004; Cox-Singh and Singh 2008). *P. knowlesi* hat eine kürzere Generationszeit während der Vermehrung im Blut (24 Stunden) als die anderen humanpathogenen Spezies (48 Stunden bei *P. falciparum*, *P. vivax* und *P. ovale*, 72 Stunden bei *P. malariae*). Während die Malaria tertiana und Malaria quartana durch ein fast immer komplikationsloses Krankheitsbild gekennzeichnet sind, stellt die Malaria tropica eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Im südlich der Sahara gelegenen Afrika überwiegt bei weitem die durch *P. falciparum* verursachte Malaria (Knobloch 2002). Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Plasmodienspezies sind möglich und vor allem bei der semiimmunen Bevölkerung nicht selten (Snounou, Viriyakosol et al. 1993).

1.2.1 Entwicklungszyklus von *Plasmodium falciparum*

Übertragen wird die Malaria von der weiblichen *Anopheles*-Mücke. Sie überträgt bei ihrer Blutmahlzeit, die sie für die Entwicklung ihrer Eier benötigt, Sporoziten in die Blutbahn. Diese infektiösen Parasitenstadien dringen innerhalb von Minuten in die Hepatozyten ein, vermehren sich dort asexuell in der parasitophoren Vakuole und entwickeln sich zum hepatozytären Schizonten. Nach dieser Phase der präerythrozytären Schizogonie kommt es nach etwa einer Woche zur Ruptur der Leberzelle, die den Schizonten

Einleitung

beinhaltet. Es werden bis zu 30000 Merozoiten in die Blutbahn freigesetzt, die nun in die Erythrozyten eindringen. Damit beginnt die Phase der erythrozytären Schizogonie. In den Erythrozyten entwickeln sich die Parasiten zu den im Lichtmikroskop als Ringform zu erkennenden Trophozoiten und reifen zum mehrkernigen erythrozytären Schizonten heran. Beim Verlassen der befallenen Erythrozyten werden erythrozytäre Merozoiten freigesetzt, die wiederum neue Erythrozyten infizieren und damit zu einer exponentiellen Vermehrung führen können. Aus einem sehr kleinen Teil der Parasiten entwickeln sich sexuelle Stadien, die männlichen Mikrogametozyten und die weiblichen Makrogametozyten. Bei einer weiteren Blutmahlzeit durch eine Anopheles-Mücke werden diese Stadien aufgenommen. Sie entwickeln sich im Mückendarm weiter zur Mikro- und Makrogameten, diese verschmelzen zur Zygote. Daraus bilden sich über die Stadien der Ookinete und Oozyste wieder Sporozoiten. Diese können beim nächsten Stich der infizierten Mücke in die Blutbahn eines Menschen übertragen werden (Knobloch 2002; Weatherall, Miller et al. 2002).

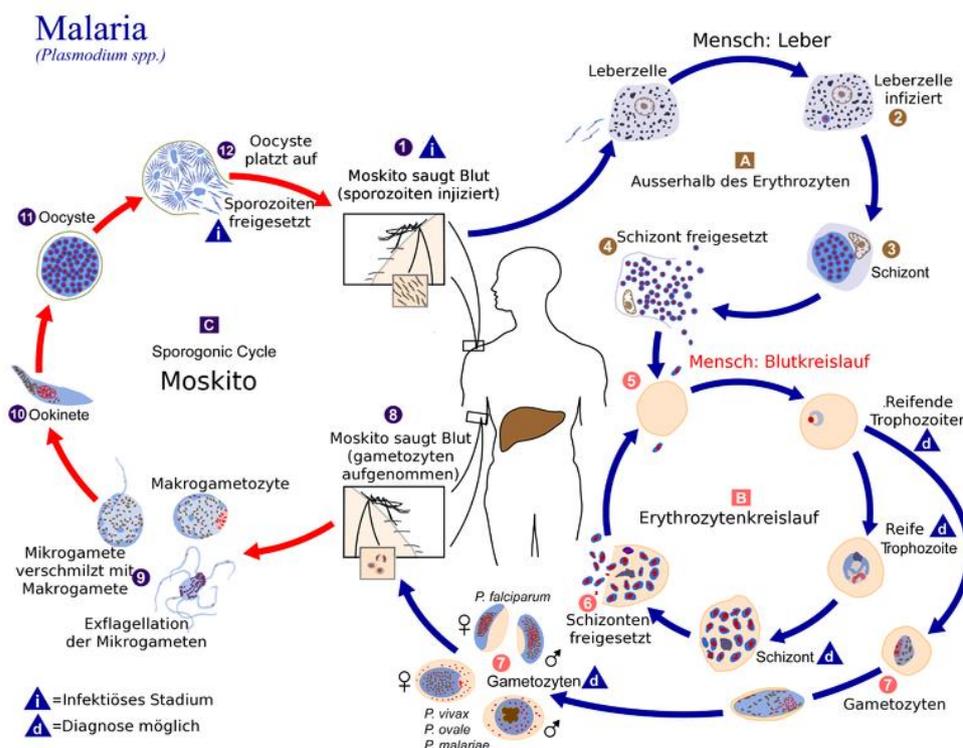


Abbildung 2: Lebenszyklus von *P. falciparum*, modifiziert nach Center of Disease Control (CDC) (<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>)

1.3 Klinik der Malaria tropica

Die Symptome der Malaria werden in der asexuellen erythrozytären Phase des Lebenszyklus verursacht. Der Beginn der Erkrankung ist oft unspezifisch und wird gelegentlich als grippeähnlich beschrieben. Neben unspezifischen Symptomen wie Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Gliederschmerzen, Diarrhoe und Übelkeit kommt es in der Regel zu Fieberschüben mit steilem Temperaturanstieg unter Schüttelfrost. Die Patienten weisen oft eine Hepatosplenomegalie und eine Thrombozytopenie auf.

Man unterscheidet die unkomplizierte von der komplizierten Malaria. Hierbei spielen Organmanifestationen vor allem in Gehirn, Nieren und Lungen eine Rolle. Häufige, potentiell tödliche Komplikationen sind zerebrale Malaria und schwere Anämie, aber auch das akute Nierenversagen und ein akutes progressives Lungenversagen (ARDS) kommen vor (Knobloch 2002).

1.4 Klinische Immunität

Es sind zwei verschiedene Arten der Protektion vor Malaria bekannt. Zum einen existieren angeborene genetische Variationen, die gehäuft in Malariaendemiegebieten auftreten und eine relative Resistenz gegen schwere Verlaufsformen der Malaria bieten. Ein erworbener Schutz dagegen entsteht nach langjähriger Parasiten-Exposition durch eine Antwort des Immunsystems.

1.4.1 Angeborene Immunität

1.4.1.1 Hämoglobinopathien

Sichelzellanämie:

Durch eine Punktmutation der β -Kette des Hämoglobins kommt es bei den Betroffenen zur Bildung eines abnormen Hämoglobins (HbS). Bei Sauerstoffmangel nehmen die Erythrozyten eine sichelförmige Form an. Die homozygote Form der Erkrankung verursacht neben einer hämolytischen

Einleitung

Anämie auch vasookklusive Krisen mit Organinfarkten und verkürzt die Lebenserwartung der Betroffenen. Die heterozygote Form ist unter normalen Umständen symptomlos, bewirkt aber gegenüber der übrigen Bevölkerung ein etwa zehnfach niedrigeres Risiko an schwerer Malaria zu erkranken (Allison 1954; Ackerman, Usen et al. 2005; Williams 2006; Ferreira, Marguti et al. 2011).

α -Thalassämie:

Durch eine Bildungsstörung der α -Kette des Hämoglobins kann es zu einer Veränderung des Hämoglobin A (HbA), des Hämoglobin A2 (HbA2) und Hämoglobin F (HbF) kommen. Die α -Thalassaemia minor, bei der α -Ketten vermindert gebildet werden, führt meist nur zu einer leichten mikrozytären Anämie, scheint aber einen partiellen Schutz vor Malaria zu verleihen (Pasvol 2006; Fowkes, Allen et al. 2008).

β -Thalassämie:

Dies ist die häufigste Thalassämie-Form mit einem Gendefekt auf Chromosom 11 als Ursache. Durch das Fehlen der β -Kette des Hämoglobins wird HbA nur vermindert gebildet. Betroffene der homozygoten Form benötigen regelmäßige Bluttransfusionen, sonst führt diese Form bereits im Kindesalter zum Tod. Auch die heterozygote Form der β -Thalassämie tritt vor allem in Gebieten auf, wo die Malaria endemisch ist oder war und reduziert das Risiko der Erkrankung an einer schweren Form der Malaria (Flint, Harding et al. 1993).

Andere Hämoglobinopathien:

Es gibt neben der HbS-Variante noch weitere Varianten des Hämoglobins, die ebenfalls einen gewissen Schutz vor schwerer Malaria verleihen sollen. Dazu gehören das Hämoglobin C (HbC), das in West- und Nordafrika auftritt sowie das in Südostasien vorkommende Hämoglobin E (HbE) (Weatherall, Miller et al. 2002).

1.4.1.2 Mangel an Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)

Bei dieser x-chromosomal-rezessiv vererbten Störung kann es in bestimmten Situationen zu hämolytischen Krisen mit schwerer Anämie kommen. Auslöser

können Medikamente, Lebensmittel (wie z.B. Favabohnen), selten auch Infektionen oder Stress sein.

Es gibt verschiedene Formen des Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangels. Die Defektvariante A kommt vor allem in Afrika vor. Hier beträgt die Restaktivität der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase 5–15% der Norm. Bei der mediterranen Defektvariante ist die Restaktivität des Enzyms deutlich stärker reduziert und beträgt bei homozygoten beziehungsweise hemizygoten Anlagenträgern weniger als ein Prozent der normalen Aktivität (Herold 2006).

Hemizygote männliche Anlageträger besitzen eine gewisse Resistenz gegen Malaria, was vermutlich durch eine Störung der Plasmodien-Vermehrung in den geschädigten Erythrozyten bedingt ist (Missinou, Lell et al. 2003). Dagegen scheint bei heterozygoten weiblichen Anlageträger kein oder höchstens ein geringer Schutz gegen Malaria zu bestehen (Guindo, Fairhurst et al. 2007).

1.4.1.3 Fehlen des Duffy-Antigens auf der Erythrozyten-Oberfläche

In Westafrika kommt *P. vivax* fast nicht vor. Als Grund hierfür wird angenommen, dass den meisten Bewohnern das Duffy-Antigen fehlt, das von *P. vivax*-Merozoiten als Rezeptor für die Erythrozyteninvasion benutzt wird (Hamblin and Di Rienzo 2000). Allerdings zeigen neuere Studien, dass *P. vivax* auch bei Menschen, denen das Duffy-Antigen fehlt, auftreten kann (Ryan, Stoute et al. 2006; Menard, Barnadas et al. 2010).

1.4.1.4 Ovalozytose

Dieser Defekt der Erythrozytenmembran kommt vor allem in Südostasien vor. Die homozygote Form ist tödlich, heterozygote Anlagenträger jedoch sind vor zerebraler Malaria geschützt (Weatherall, Miller et al. 2002).

1.4.1.5 Weitere genetische Polymorphismen

Träger bestimmter HLA-Merkmale (*B53 und DRB1*1302-DQB1*0501*) scheinen ein niedrigeres Risiko zu haben, an schwerer Malaria zu erkranken (Weatherall, Miller et al. 2002). Es wurden auch verschiedene Polymorphismen des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)-Gens identifiziert, wovon manche mit einer schweren Malaria-Anämie assoziiert sind, andere dagegen mit einem vermindertem Auftreten der zerebralen Malaria (McGuire, Knight et al. 1999). Das ABO-Blutgruppensystem spielt ebenfalls eine Rolle bei der Inzidenz der Malaria. Mehrere Studien zeigen bei Patienten mit der Blutgruppe A ein erhöhtes Risiko an schweren Malariaformen zu erkranken (Fischer and Boone 1998; Lell, May et al. 1999).

1.4.2 Erworbene Immunität

Menschen, die kontinuierlich dem Malaria-Parasiten ausgesetzt sind, entwickeln eine klinische Immunität gegen *P. falciparum*. Eine vollständige Immunität gegen Malaria gibt es beim Menschen nicht, es handelt sich um eine partielle, nicht-sterile Immunität. Diese Art der Immunität wird Semiimmunität genannt und ist dadurch gekennzeichnet, dass die Personen zwar infiziert werden kann, es aber nur zu einer geringen Parasitendichte kommt und die Infektion milde oder sogar asymptomatisch verläuft (Greenwood 1987; Snow, Omumbo et al. 1997). Zur Aufrechterhaltung der klinischen Immunität ist ein ständiger Kontakt beziehungsweise eine ständige Neuinfektion nötig. Bisher wurde angenommen, dass bei fehlender Exposition die Semiimmunität kontinuierlich abnimmt (Lang 2000). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass ein gewisser Schutz gegenüber der Malaria bei semiimmunen Menschen über längere Zeit bestehen bleibt. So wurde gezeigt, dass afrikanische Immigranten in Frankreich auch noch nach mehreren Jahren ohne Parasiten-Exposition eine erworbene klinische Immunität gegen *P. falciparum* besaßen (Bouchaud, Cot et al. 2005). Neben Erwachsenen, die häufig mit *P. falciparum* infiziert wurden, sind auch Säuglinge bis etwa zum dritten Lebensmonat vor Komplikationen geschützt.

Danach besteht das Risiko einer schweren oder komplizierten Erkrankung. Kinder, die noch keinen Schutz besitzen, müssen diesen durch wiederholte Malaria-Episoden entwickeln. Das Entwickeln dieser natürlichen Immunität dauert in der Regel einige Jahre und hängt von der Anzahl der erworbenen Infektionen und damit der Endemizität ab (Gupta, Snow et al. 1999; Carvalho, Daniel-Ribeiro et al. 2002).

1.4.3 Humorale Abwehrmechanismen

Humorale Immunität bezeichnet die Bildung spezifischer Antikörper gegen Antigene des Parasiten durch B-Lymphozyten. Eine Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern gegen Antigene von Plasmodien und Protektion vor Malaria ist bekannt (Bull and Marsh 2002). Bereits in den 60er Jahren wurde gezeigt, dass Gamma-Globuline aus dem Blut nigerianischer Erwachsener bzw. aus Nabelschnurblut bei mit *P. falciparum* infizierten Kindern einen antiparasitären Effekt hatten (Edozien, Gilles et al. 1962). Versuche, bei denen Immunglobulin G von semiimmunen Erwachsenen auf malariakranke Kinder übertragen wurde, belegen die große Bedeutung von Antikörpern für die Abwehr der Plasmodien. Es kam zu einer deutlichen Abnahme der Parasitämie (Cohen, Mc et al. 1961). Eine Studie, bei der gereinigte Immunglobuline von semiimmunen Afrikanern nicht-immunen Malariapatienten aus Thailand zur Therapie infundiert wurden, bestätigte diese Ergebnisse (Sabchareon, Burnouf et al. 1991).

1.4.3.1 IgG - Subtypen

Für einen Schutz gegen klinische Malaria ist nicht alleine das Vorhandensein von IgG-Antikörpern von Bedeutung, vor allem ihre Interaktion mit dem zellulären Immunsystem spielt dabei eine Rolle. Dafür maßgeblich verantwortlich sind die IgG-Subtypen IgG1 und IgG3, deren konstanter Teil (Fc) über Rezeptoren an Monozyten und neutrophile Granulozyten bindet und

dadurch die Lyse der Antikörper-markierten Zielzelle auslöst. Aus diesem Grund werden IgG1 und IgG3 auch als „zytophile“ Antikörper bezeichnet. In einer Studie im Senegal konnte eine Assoziation von zytophilen IgG3-Antikörpern gegen Parasitenlysate mit einem Schutz vor klinischer Malaria entdeckt werden (Aribot, Rogier et al. 1996). Man nimmt an, dass durch die Bindung dieser zytophilen Antikörper an mononukleäre Blutzellen die Freisetzung bestimmter Mediatoren, wie z.B. des Tumor-Nekrose-Faktors- α (TNF- α) veranlasst wird (Bouharoun-Tayoun, Oeuvray et al. 1995). Dieser Mechanismus wird als „Antikörper abhängige zelluläre Hemmung“ (*antibody dependent cellular inhibition*, ADCI) bezeichnet (Khusmith and Druilhe 1983).

1.5 Impfstoffentwicklung

Im Rahmen der weltweiten Bemühungen, Malaria unter Kontrolle zu bringen, hat die Entwicklung und klinische Prüfung von potentiellen Malaria-Impfstoffen stark zugenommen. Ein wirksamer Impfstoff ist ein erstrebenswertes Mittel, um die Bedrohung durch die Malaria zu bekämpfen (Carvalho, Daniel-Ribeiro et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörpertransfer von semiimmunen Erwachsenen auf an Malaria erkrankte Kinder eine Verminderung der Parasitämie und eine Verbesserung der klinischen Situation bewirkt (Cohen, Mc et al. 1961; Sabchareon, Burnouf et al. 1991). Man nimmt an, dass ein hoch effektives Vakzin eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen Antigene, die während der verschiedenen Stadien des Parasitenzyklus exprimiert werden, auslöst. Momentan sind solche Impfstoffkandidaten jedoch noch nicht verfügbar und der Schwerpunkt der Forschung liegt auf Vakzinen, die hauptsächlich auf einen Teil des Lebenszyklus wirken.

Jedes Stadium des parasitären Lebenszyklus stellt einen möglichen Angriffspunkt für einen Impfstoff dar (Carvalho, Daniel-Ribeiro et al. 2002). Präerythrozytäre Impfstoffe setzen im Parasitenstadium unmittelbar nach der Injektion durch die Anopheles-Mücke an und haben zum Ziel, Antikörper und Effektor-T-Zellen gegen Sporozoiten und infizierte Hepatozyten zu induzieren. Somit soll der Übergang der Leberstadien zu den erythrozytären Stadien

Einleitung

verhindert werden. Mit Hilfe von bestrahlten Sporozoiten war es bei Versuchen in den 1960er Jahren möglich, die damit geimpften freiwilligen Personen vor weiteren Infektionen zu schützen (Nussenzweig, Vanderberg et al. 1967). Der in seiner Entwicklung am weitesten fortgeschrittene präerythrozytäre Impfstoffkandidat ist RTS,S/AS02A, bei dem ein Sporozoiten-Oberflächenantigen (*circumsporozoite proteine*, CSP) mit dem hoch immunogene Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBsAg) kombiniert wird (Alonso, Sacarlal et al. 2004). In Phase-II-Studien lag die Wirksamkeit des RTS,S-Impfstoffes zwischen 30 und 50 Prozent (Alonso, Sacarlal et al. 2005; Olotu, Lusingu et al. 2011). Ergebnisse der Phase-III-Studie zeigen, dass bei Säuglingen, die mit RTS,S geimpft wurden, etwa ein Drittel weniger Episoden klinischer Malaria wie auch Episoden schwerer Malaria auftraten (Agnandji, Lell et al. 2012). Die Wirksamkeit von RTS,S bei Kleinkindern (5–17 Monate) lag bei etwa 50%. Abschließende Ergebnisse werden im Laufe des Jahres 2014 erwartet.

Vakzine gegen die sexuellen Blutstadien (Sporogonie) sollten die Übertragung der Krankheit auf den Vektor blockieren. Diese altruistischen Impfstoffe bieten somit für den Geimpften keinen Schutz, er kann trotz Impfung an Malaria erkranken. Die Übertragung auf andere Personen jedoch wäre gestoppt.

Durch Impfstoffe mit Ansatz im Blutstadium soll die Vermehrung der Parasiten in Erythrozyten verhindert werden. Ziel der erythrozytären Impfstoffe ist nicht die Vermeidung einer Infektion, vielmehr soll, ähnlich der natürlichen Immunität, die Schwere der Erkrankung gemindert werden, da alle Symptome und Komplikationen der Malaria im Blutstadium auftreten. Die meisten der momentan entwickelten Impfstoffkandidaten haben zum Ziel eine humorale Immunantwort gegen Merozoiten-Oberflächen-Proteine oder gegen Parasitenproteine an der Oberflächenmembran des befallenen Erythrozyten zu induzieren. Zu den in den Impfstoffkandidaten gegen die Blutstadien verwendeten Antigenen gehören, neben dem in dieser Arbeit untersuchten *Glutamate Rich Protein* (GLURP) und dem *Merozoite Surface Protein 3* (MSP3), eine Reihe weiterer *P. falciparum*-Antigene.

So gibt es beispielsweise Untersuchungen zu den Merozoiten-Antigenen *Apical Membrane Antigen 1* (AMA 1), *Erythrozyte-binding Antigen 175* (EBA-175), *Merozoite Surface Protein 1* (MSP1), *Merozoite Surface Protein 2* (MSP2) und *Serine Repeat Antigen 5* (SERA5) (Crompton, Pierce et al. 2010).

AMA1 und MSP1 wurden bereits in Phase-II-Studien getestet, wo jedoch keine ausreichende Wirksamkeit des getesteten Impfstoffkandidaten nachgewiesen werden konnte (Ogutu, Apollo et al. 2009; Sagara, Dicko et al. 2009). Allerdings konnte in einer weiteren Phase-II-Studie eine allelspezifische Wirksamkeit von AMA1 gezeigt werden (Thera, Doumbo et al. 2011), somit kann AMA1 weiter als möglicher Teil eines aus mehreren Komponenten bestehenden Impfstoffes diskutiert und untersucht werden.

Weitere Studien mit verschiedenen Kombination sowie Veränderung der Adjuvantien gehen weiter. In Zukunft wird höchstwahrscheinlich nur ein multivalenter Ansatz mit Wirkung gegen mehrere Stadien des Parasiten-Lebenszyklus zu einem hocheffektiven Malariavakzin führen (Carvalho, Daniel-Ribeiro et al. 2002; Moorthy, Good et al. 2004; Cortes 2008).

1.5.1 GMZ2-Impfstoff-Kandidat

GMZ2 ist ein rekombinantes Fusionsprotein aus den zwei *P. falciparum*-Antigenen GLURP und MSP3. Natürlich erworbene Immunreaktionen gegen diese Antigene wurden in verschiedenen Studien beschrieben und waren mit dem Schutz vor Malaria assoziiert (Theisen, Vuust et al. 1995; Hisaeda, Saul et al. 2002). Impfstoffe, die auf diesen beiden Antigenen basieren, sollen dieselbe Art von immunologischer Reaktion induzieren, nämlich hohe Konzentrationen der zytophilen Antikörper (Theisen, Soe et al. 2004). Sie gelten als erfolgversprechende Impfstoffkandidaten, um eine Immunreaktion gegen das erythrozytäre Stadium auszulösen (Borre, Dziegiel et al. 1991; Oeuvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994; Theisen, Soe et al. 1998). Die Expression von GMZ2 erfolgt in *Lactococcus lactis*, einem gram-positiven Bakterium, das keine Endotoxine produziert.

1.5.1.1 GLURP-Antigen

GLURP ist ein 220 kDa großes Exoantigen. Es ist sowohl in der parasitophoren Vakuole von Leberschizonten und intraerythrozytären Schizonten zu finden als auch auf der Oberfläche der Merozoiten. Zusätzlich wurde es im Plasma von Patienten nachgewiesen, die mit *P. falciparum* infiziert sind. GLURP ist somit ein Protein, das sowohl im prä-erythrozytären Stadium als auch im erythrozytären Stadium von *P. falciparum* exprimiert wird (Borre, Dziegiel et al. 1991).

Antikörper gegen GLURP sind in der Lage, das Wachstum von *P. falciparum* *in vitro* in Kooperation mit Monozyten zu hemmen (Theisen, Soe et al. 1998).

Oeuvray fand in einer Studie bei Kindern im Senegal eine Korrelation zwischen hohen IgG3-Titern gegen GLURP und dem Schutz vor einer klinischen Manifestation der Malaria heraus (Oeuvray, Theisen et al. 2000). Eine Studie von Theisen et al. bestätigte das Vorhandensein von GLURP-spezifischem IgG1 und IgG3 als protektiven Faktor (Theisen, Doodoo et al. 2001). Hohe Werte der zytophilen Antikörper IgG1 und IgG3 gegen Exoantigene scheinen mit einem Schutz vor klinischer Malaria assoziiert zu sein. Exoantigene sind lösliche Proteine, die während der Schizonten-Ruptur ins Plasma der infizierten Personen abgegeben werden (Jepsen and Axelsen 1980). Antikörper gegen diese Exoantigene sollen das Wachstum von *P. falciparum* hemmen. *In vitro*-Studien zufolge kann humanes IgG gegen GLURP verbunden mit dem Vorhandensein von Monozyten das Parasitenwachstum inhibieren (Chumpitazi, Lepers et al. 1996).

1.5.1.2 MSP3-Antigen

Das 48 kDa große MSP3-Antigen wird auf der Oberfläche von *P. falciparum*-Merozoiten exprimiert. Dieses Antigen konnte als Zielstruktur protektiver Antikörper identifiziert werden (Singh, Soe et al. 2004). Man beobachtete, dass Antikörper gegen MSP3 im Blut von Kindern aus Gambia mit einem Schutz vor klinischer Malaria assoziiert waren (Polley, Tetteh et al. 2007). Eine Studie konnte zeigen, dass MSP3-spezifisches IgG *in vitro* antiparasitär wirkt, indem

es das Parasitenwachstum hemmt, wenn die Kultur Monozyten als Effektorzellen enthält (Oeuvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994).

Der protektive Effekt der IgG3-Antikörper gegen das MSP3-Antigen wurde auch beim passiven Transfer der Antikörper beobachtet (Sabchareon, Burnouf et al. 1991).

1.5.1.3 GMZ2-Antigen

Eine Forschungsgruppe des Statens Serum Institut in Kopenhagen, Dänemark um Michael Theisen und Søren Jepsen entwickelte aus GLURP und MSP3 das künstliche Fusionsprotein GMZ2, das mit Hilfe des Expressionssystems *Lactococcus lactis* produziert wurde.

Die Regionen GLURP₂₅₋₅₀₀ und MSP3₂₁₂₋₃₈₂ wurden fusioniert (Theisen, Soe et al. 2004). Innerhalb dieser konservierten Regionen sind die B-Zell-Epitope, die von den zytophilinen Immunglobulinen erkannt werden, lokalisiert. Eine Studie, die in einer hyperendemischen Region in Myanmar durchgeführt wurde, bestätigte die Korrelation zwischen hohen Titern von IgG3-Antikörpern gegen GLURP und MSP3 und einem Schutz vor klinischer Malaria. Hohe IgG4-Antikörper gegen GLURP hingegen korrelierten mit einer höheren Anzahl an Malaria-Erkrankungen. Auch konnte beobachtet werden, dass sich die MSP3- und GLURP-spezifischen IgG3-Antikörper gegenseitig ergänzten, was den Schutz vor einer klinischen Malaria betrifft. Eine Kombination dieser beiden Antigene im Hinblick auf die Entwicklung eines Impfstoffes scheint somit sinnvoll zu sein (Soe, Theisen et al. 2004). Weiterhin untersuchten Theisen et al. die Wirkung von GMZ2 als Antigen. Mittels ELISAs bestimmten sie die IgG-Antikörper von 71 semiimmunen Erwachsenen aus Liberia. Dabei beobachteten sie, dass die Impfung mit GMZ2 zu höheren Antikörper-Konzentrationen führt, als eine Impfung mit einer Mischung der beiden Komponenten GLURP und MSP3 (Theisen, Soe et al. 2004). Des Weiteren verabreichten sie Mäusen entweder 20 µg des GMZ2-Fusionproteins oder eine Mischung aus 5 µg MSP3₂₁₂₋₃₈₀-Molekülen und 15 µg GLURP₂₅₋₅₁₄-Molekülen subkutan. Eine dritte Gruppe von Mäusen wurde an zwei verschiedenen Stellen geimpft. Es wurden 5 µg von MSP3₂₁₂₋₃₈₀ in die Schulter injiziert und 15 µg von GLURP₂₅₋₅₁₄ in

Schwanznähe. Jede Maus bekam die Impfdosis dreimal verabreicht. Fünfunddreißig Tage nach der ersten Impfung wurden die IgG-Titer gegen GLURP und MSP3 im Serum getestet. Während der mittlere Anti-GLURP-Titer in der Hybridgruppe nur wenig höher war, zeigten sich die IgG-Antikörper gegen das MSP3-Antigen 4,3-fach erhöht gegenüber der Gruppe, die MSP3 und GLURP als Einzelkomponente an verschiedenen Stellen bekommen hatte. Die Mäuse, die mit dem Hybrid geimpft wurden, entwickelten eine Antikörper-Antwort sowohl auf GLURP als auch auf MSP3, während die Mäuse, die eine Mischung aus den beiden einzelnen Antigenen bekamen, dazu tendierten, Antikörper überwiegend entweder gegen GLURP oder gegen MSP3 zu entwickeln (Theisen, Soe et al. 2004). Die Eignung von GMZ2 als Impfstoff wurde im Rahmen einer Studie an *Saimiri sciureus* Affen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass mit GMZ2 ein partieller Impfschutz erreicht werden kann (Carvalho, Alves et al. 2005).

1.5.2 Phase-Ia-Studie über GMZ2 an Malaria-naïven Europäern

Zur Beurteilung der Sicherheit und Immunogenität wurde 2006 in Tübingen GMZ2 das erste Mal beim Menschen im Rahmen einer Phase-Ia-Studie angewendet. Bei dieser Studie wurden drei verschiedene Dosen des GMZ2-Impfstoffes verglichen. Die Impfung wurde subkutan verabreicht, als Adjuvans diente Aluminiumhydroxid. Geimpft wurden 30 gesunde Personen, die bisher noch nicht mit *P. falciparum* in Kontakt waren (Malaria-naïve Probanden). Der Impfstoff wurde von allen Probanden gut vertragen und es gab keine schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse. Bei den Probanden, bei denen als Malaria-naïve Europäer vorher noch kein Antikörper-Titer gegen die Impfantigene nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei allen drei Dosen ein deutlicher Anstieg der GMZ2-spezifischen Immunglobuline (Esen, Kremsner et al. 2009). Die Ergebnisse dieser Studie führten im August 2007 zu einer Folgestudie (Phase Ib), die in Teilen in der vorliegenden Arbeit berichtet wird. Die Studie hatte zum Ziel die Sicherheit und Immunogenität von GMZ2 bei semiimmunen Afrikanern zu testen.

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem aus den *P. falciparum*-Antigenen GLURP und MSP3 hergestellten Impfstoff GMZ2. Ziel war es, im Rahmen einer klinischen Studie der Phase Ib, die in Lambaréné durchgeführt wurde, die Sicherheit und Immunogenität der GMZ2-Impfung bei semiimmunen Erwachsenen zu beurteilen. Bezüglich der Sicherheit wurden die Teilnehmer auf sämtliche Nebenwirkungen und Beschwerden in Zusammenhang mit der Impfung untersucht und befragt. Der Fokus dieser experimentellen Arbeit liegt jedoch auf der Durchführung und Beurteilung der Analysen zur Immunogenität des GMZ2-Impfstoffkandidaten. Die humorale Immunantwort auf das Impfantigen GMZ2 und seine beiden Einzelkomponenten GLURP und MSP3 wurde mittels *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assays* (ELISA) bestimmt. Ein Anstieg der Impfstoff-spezifischen Antikörper nach den Impfungen wurde dabei als Indikator für den Erfolg der Impfung angesehen. Zur Evaluierung der Qualität der Immunreaktion untersuchten wir zusätzlich die Verteilung der IgG-Subtypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 vor und nach einer Immunisierung mit GMZ2.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Substanz	Produzent
GLURP (R0)	Dr. Michael Theisen, Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
GMZ2	Henogen, Charleroi, Belgien
Immunglobulin gamma (IgG), Goat Anti-Human, Horseradish Peroxidase (HRPO) conjugated	Caltag TM Laboratories, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
IgG 1, Mouse-Anti-Human	SkyBio Limited, Wyboston, Bedford, UK
IgG 2, Mouse-Anti-Human	SkyBio Limited, Wyboston, Bedford, UK
IgG 3, Mouse-Anti-Human	SkyBio Limited, Wyboston, Bedford, UK
IgG 4, Anti-Human, HRPO-conjugated	Caltag TM Laboratories, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Goat Anti-Mouse IgG, HRP-conjugated	Caltag TM Laboratories, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MSP3	Dr. Michael Theisen, Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Naturaflor® Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tabletten	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Polyclonal IgG – purified	The Binding Site GmbH, Birmingham, UK
Polyclonal IgG1 – purified	The Binding Site GmbH, Birmingham, UK
Polyclonal IgG2 – purified	The Binding Site GmbH, Birmingham, UK
Polyclonal IgG3 – purified	The Binding Site GmbH, Birmingham, UK

Material und Methoden

Polyclonal IgG4 – purified	The Binding Site GmbH, Birmingham, UK
Schwefelsäure 95–97% (H ₂ SO ₄)	Merck KG, Darmstadt
Tetramethylbenzidin (TMB) ONE, (C ₃₇ H ₄₄ N ₂ O ₁₃ S ₁₉)	KEM EN TEC Diagnostics, Taastrup, Dänemark
Tween®20 (C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆)	Sigma-Aldrich Chemie, München

2.1.2 Puffer und Lösungen

Phosphate Bufferd Saline (PBS)-Lösung: 1 Tablette (0,14 M NaCl, 0,003 M KCl und 0,01 M PO₄) auf 500 ml Aqua dest.

Waschpuffer: 1 ml Tween®20 und 29 g NaCl auf 1l PBS-Lösung

Blockpuffer: 1 ml Tween®20 und 30 g Milchpulver auf 1l PBS

Verdünnungs-Puffer: 1 ml Tween®20 und 10 g Milchpulver auf 1l PBS

Serum-Verdünnungspuffer: 1 ml Tween®20, 10g Milchpulver und 2 ml Natriumazid auf 1l PBS

Stopplösung: 0,2 M H₂SO₄

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Produzent
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner GmbH, Frickenhausen
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Nunc TM -Immuno Platten MaxiSorp F96	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pipetten: Labmate TM L10, L20, L200, L1000	Abimed Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg

2.1.4 Laborgeräte

Material	Produzent
Analysenwaage PM 4000	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
ELISA-Schüttler Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH, & Co. KG, Wiesbaden
ELISA-Reader Expert 96, Type G018065	ASYS HiTech GmbH, Eugendorf, Österreich
Feinwaage AT 260-S DeltaRange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Multipipette Costar 12-pette	Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande
Nunc™-Immuno-Washer 12	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Pipettierhelfer accu-jet®	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex Schüttler	neoLab GmbH, Heidelberg
Zentrifuge Biofuge fresco Heraeus	DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, UK

2.1.5 Software

Programm	Produzent
Microsoft®Excel 2003	Microsoft® Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Tinn-R Version 1.17.2.4	Rgui, GNU General Public License
R Version 2.6.2	The R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich

2.2 Studienort

Die Studie (Studiennummer NCT00424944) wurde zwischen Juli 2007 und September 2008 im Forschungslabor (*Centre de Recherches Médicales de Lambaréné*, CERMEL) des Albert-Schweitzer-Krankenhauses in Lambaréné,

Gabun durchgeführt. Gabun liegt im zentralafrikanischen Regenwald, grenzt an Kamerun, Äquatorialguinea, an die Republik Kongo und an den Golf von Guinea. Lambaréné ist die Hauptstadt der Region Moyen Ogooué und hat etwa 20000 Einwohner. Sie liegt nahe dem Äquator und ist bezüglich der Malaria-Transmission als hyperendemisches Gebiet einzustufen. Der Großteil der Infektionen wird hier von *P. falciparum* verursacht. *P. malariae* und *P. ovale* spielen eine nur untergeordnete Rolle, *P. vivax* kommt nicht vor. Es gibt im Jahr zwei Regen- und zwei Trockenzeiten, während denen sich jedoch Temperatur und Feuchtigkeit nicht stark unterscheiden (Wildling, Winkler et al. 1995).

In Gabun stellt die Malaria eines der größten Gesundheitsprobleme dar. Mit einer entomologischen Inokulationsrate (EIR) von 50 infektiösen Stichen pro Person und Jahr und nur einer geringen Schwankung der Transmissionsrate und Parasitenprävalenz, wird diese Region zu den hyper- bis holoendemischen Malariagebieten gezählt (Sylla, Kun et al. 2000). *P. falciparum* ist hier verantwortlich für über 95% der Krankheitsfälle, wobei Erwachsene selten eine klinisch relevante Malaria entwickeln. Etwa 500 Kinder werden jährlich im Albert-Schweitzer-Krankenhaus in Lambaréné auf Grund einer *P. falciparum*-Infektion behandelt (Sylla, Lell et al. 2001).

2.3 Teilnehmer und Studiendesign

In einer randomisierten doppelblinden klinischen Studie der Phase Ib wurden in Lambaréné und Umgebung 40 männliche Probanden im Alter von 18 bis 45 Jahren rekrutiert. Zwanzig von ihnen wurden drei Dosen von 100 µg GMZ2 mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans im Abstand von vier Wochen verabreicht. Die 20 Teilnehmer in der Kontrollgruppe erhielten den Tollwutimpfstoff Verorab® zu denselben Zeitpunkten (Tag 0, Tag 28 und Tag 56). Die Impfungen wurden abwechselnd links und rechts im Bereich des *Musculus deltoideus* verabreicht, wobei der Tollwut-Impfstoff intramuskulär appliziert wurde, der GMZ2-Impfstoff dagegen subkutan. Der Teil des Teams, der die Impfstoffe vorbereitete und applizierte, war ansonsten nicht in die Studie involviert. Die Studienteilnehmer sowie die Studienärzte und der Rest des Teams blieben während der gesamten

Studiendauer verblindet. Nach jeder Impfung wurden die Probanden für 30 Minuten beobachtet. Zu einer ärztlichen Untersuchung mussten sie einen Tag, drei Tage und 14 Tage nach jeder Impfung ins Forschungslabor kommen. Am fünften, achten und elften Tag nach jeder Impfung wurden die Studienteilnehmer von nicht-ärztlichen Mitarbeitern zuhause besucht und nach Nebenwirkungen befragt. Zur routinemäßigen Laboranalyse wurde an den Tagen 0, 3, 28, 31, 56, 59, 84 und 365 Blut zur Überprüfung des Gesundheitszustandes abgenommen. An den Tagen 0, 28, 56, 84 und 365 wurde zusätzlich Blut für die immunologischen Analysen entnommen.

Die Studie wurde vom regionalen Ethik-Komitee und dem Gabuner Gesundheitsministerium genehmigt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Regeln der Deklaration von Helsinki und den *Good Clinical Practice Guidelines* (ICH-GCP). Die Teilnehmer wurden ausführlich über den Verlauf der Studie und über sämtliche Risiken aufgeklärt und gaben anschließend ihr schriftliches Einverständnis.

Eine Infektion mit *P. falciparum* wurde mikroskopisch nach der Lambaréné-Methode diagnostiziert (Planche, Krishna et al. 2001).

2.3.1 Einschlusskriterien

- Männer im Alter zwischen 18 und 45 Jahren
- Aufenthalt in der Umgebung von Lambaréné für die Dauer der Studie und Erreichbarkeit über die gesamte Dauer der Nachverfolgung von 13 Monaten
- Guter Gesundheitszustand in Anamnese und klinischer Untersuchung

2.3.2 Ausschlusskriterien

- Bereits erfolgte Impfung mit einem Studienimpfstoff oder mit dem Tollwutimpfstoff
- Einnahme eines nicht-registrierten Medikamentes bis 30 Tage vor der ersten oder 30 Tage nach der dritten Immunisierung

- Einnahme eines immunmodulierenden Medikamentes bis sechs Monate vor der ersten Immunisierung
- Verdacht auf eine Immunschwäche oder eine Autoimmunerkrankung
- Allergische Reaktionen auf Impfungen in der Anamnese
- Splenektomie in der Anamnese
- Laborwerte mit Hinweisen auf eine Leber-, Nieren- oder hämatologische Erkrankung
- Verabreichung von Immunglobulinen oder Blutprodukten drei Monate vor der ersten Studienimpfung
- Gleichzeitige Teilnahme an anderen interventionellen klinischen Studien
- Jede Erkrankung oder Beeinträchtigung, die nach ärztlicher Beurteilung ein Risiko für den Studienteilnehmer bedeuten könnte

2.4 Messung der Antikörper-Antwort

Um die IgG-Produktion der Probanden zu untersuchen, wurden an den Tagen 0, 28, 56, 84 und 365 die spezifischen IgG-Konzentrationen gegen die Impfantigene gemessen. Die Antikörper-Konzentration wurde im Serum bestimmt, das durch Zentrifugation aus dem Vollblut der Probanden gewonnen und bei -20 °C gelagert wurde. So war es möglich, zur selben Zeit die Seren der verschiedenen Tage unter denselben Bedingungen zu untersuchen. Die Bestimmung der Serumkonzentration der Antikörper erfolgte mittels *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assays* (ELISA). Bei jedem Probanden wurde die IgG-Antwort im Serum auf GLURP, MSP3 sowie GMZ2 untersucht.

2.4.1 Prinzip des *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Der ELISA ist ein routinemäßig verwendeter quantitativer Immunoassay. Bekannt ist er seit den frühen 1970er Jahren (Engvall and Perlmann 1971). Ziel des von uns verwendeten direkten ELISAs ist es, die Konzentration der Antigen-spezifischen Antikörper im Serum der Studienteilnehmer mit Hilfe eines Markerenzym zu bestimmen. Zu Beginn wird das Antigen an eine feste Phase

in Form einer 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden (*coaten*). Diese Bindung ermöglicht es, durch Waschvorgänge freie, unspezifische Antikörper im Serum zu entfernen, während die spezifischen Antikörper an dem fixierten Antigen haften bleiben. Durch das Blocken freier Proteinbindestellen mittels eines Milchpulver enthaltenden Puffers wird die Hintergrundaktivität durch unspezifische Antikörper reduziert. Als Markerenzym verwendeten wir Meerrettich-Peroxidase (HRP), die an einen gegen menschliches IgG gerichteten Antikörper gekoppelt war. Durch Zugabe der Substratlösung Tetramethylbenzidin (*TMB One*) wird die Enzymreaktion gestartet. Das Enzym katalysiert die Oxidation von TMB, was dazu führt, dass TMB seine Absorption bei 450 nm ändert. Dies kann mit Hilfe der Messung der optischen Dichte quantifiziert werden. Das anfangs farblose Substrat wird über eine Enzymreaktion in das blaufarbene Tetramethylbenzidin-Kation umgesetzt. Durch die Zugabe von Schwefelsäure wird diese Reaktion beendet. Beobachtet werden kann nun ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der hierbei entstandenen Gelbfärbung ist proportional zur Konzentration der Antikörper im Serum der untersuchten Personen. Nach dem Abstoppen der Reaktion erfolgt die photometrische Messung der optischen Dichte. Durch Vergleich mit der Standardkurve des polyklonalen humanen IgGs kann mit Hilfe der Programme R und Tinn-R die optische Dichte in die Konzentration der spezifischen Antikörper umgerechnet werden.

2.4.2 Messung der Antikörper-Antwort (Gesamt-IgG)

Verdünnungen der Antigene wurden auf Nunc-Immuno-Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten aufgetragen. GLURP und GMZ2 wurden zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml verdünnt, MSP3 zu einer Konzentration von 1 µg/ml. Als Verdünnungsmedium diente *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Jeweils 100 µl des verdünnten Antigens wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten gegeben. In die ersten beiden Spalten der 96-Well-Platten wurde als Standard eine IgG-Verdünnungsreihe aufgebracht. Als Startpunkt diente eine IgG-Konzentration von 1000 ng/ml. Das in PBS verdünnte IgG wurde in die ersten

Material und Methoden

beiden Kavitäten der Zeile A gegeben. Durch weiteres seriell Verdünnen in PBS entstand in den ersten beiden Spalten eine Verdünnungsreihe mit den weiteren Konzentrationen 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,2 ng/ml, 15,6 ng/ml und 7,8 ng/ml. Pro Studienteilnehmer wurden drei Platten beschichtet, jeweils eine Platte pro Antigen. Um eine gute Bindung zu ermöglichen, wurde die Platte über Nacht bei 4 °C gekühlt. Zur Entfernung der gebundenen Antigene wurden die Platten danach viermal mit 200 µl des Waschpuffers befüllt und eine Minute stehen gelassen, bevor sie entleert und wieder befüllt wurden. Nach dem vierten Waschgang mussten die Platten gründlich entleert und ausgeklopft werden, bis sie trocken waren. Anschließend wurden 150 µl des Blockpuffers aufgetragen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem ELISA-Schüttler. An das Blocken der freien Proteinbindungsstellen schloss sich ein viermaliger Waschvorgang an, worauf die Platten wieder trocken geklopft werden mussten. Die Serum-Proben der Probanden wurden in Serum-Verdünnungspuffer 1:50 verdünnt. Nach dem Auftragen der Proben entsprechend Abbildung 3 wurden die Platten für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Antikörper im Probanden-Serum an die an der Mikrotiterplatte haftenden Antigene binden konnten. Dabei wurden zuerst in die Spalte A die 1:50 verdünnten Proben eingefügt. Die weiteren Verdünnungen wurden direkt auf der Platte mit einer Multipipette pipettiert, so dass eine Verdünnungsreihe von 1:100 (B), 1:200 (C), 1:400 (D), 1:800 (E) und 1:1600 (F) entstand. Als Positivkontrolle (PC) verwendeten wir einen Serumpool semiimmuner afrikanischer Personen, bei dem vorher eine hohe Konzentration der Antikörper gegen die drei Impfantigene festgestellt wurde. Als Negativkontrolle (NC) diente das Serum verschiedener Malaria-naiver Europäer.

Material und Methoden

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG	IgG	PC	PC	d0	d0	d28	d28	d56	d56	d84	d84
B	IgG	IgG	PC	PC	d0	d0	d28	d28	d56	d56	d84	d84
C	IgG	IgG	PC	PC	d0	d0	d28	d28	d56	d56	d84	d84
D	IgG	IgG	PC	PC	d0	d0	d28	d28	d56	d56	d84	d84
E	IgG	IgG	NC	NC	d0	d0	d28	d28	d56	d56	d84	d84
F	IgG	IgG	NC	NC	d0	d0	d28	d28	d56	d56	d84	d84
G	IgG	IgG	NC	NC								
H	IgG	IgG	NC	NC								

Abbildung 3: Schema des Seren-Auftrags auf die ELISA-Platten. Tag 365 wurde zu einem späteren Zeitpunkt entsprechend diesem Schema analysiert

Auf die zweistündige Inkubation folgte ein erneuter Waschschrift. Die ungebundenen Bestandteile wurden dadurch entfernt, so dass nur der am *coating*-Antigen gebundene Antikörper zurückblieb. Um die Serum-Antikörper zu binden, wurde ein Antikörper verwendet, der sich gegen die menschlichen Antikörper des Serums richtet und mit der Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish* = *HRP*) konjugiert ist. Dieses *anti-human* Immunglobulin wurde im Verhältnis 1:3000 in Verdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wurden je 100 µl des verdünnten Antikörpers in die Kavitäten der Spalten 3 bis 12 pipettiert. Daraufhin erfolgte wieder eine Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde. Somit konnte ein Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex entstehen. Zur Quantifizierung der im Serum der Probanden vorhandenen Antikörper musste daraufhin ein Substrat für die Peroxidase angeboten werden. Dies geschah nach erneutem 4-maligem Waschen in Form der Farblösung *TMB One*. Nach dem Auftragen von 100 µl *TMB One* konnten die Platten für 20 Minuten im Dunkeln inkubieren. Nach dieser Zeit war eine Blaufärbung zu beobachten. Danach musste die Reaktion vor dem photometrischen Messen mit Schwefelsäure gestoppt werden, damit für alle Platten dieselbe Inkubationszeit eingehalten werden konnte. Nach der Zugabe von 100 µl einer 0,2-molaren Schwefelsäure kam es zu einem sichtbaren Farbumschlag von blau nach gelb. Die Proben wurden in den ELISA-Reader gegeben und die Absorption bei 450 nm mit einer Referenz von 620 nm gemessen. Aus den

Werten der optischen Dichte erfolgte die Kalkulation der Konzentrationen durch den Vergleich zum pipettierten Standard mit bekannter Konzentration.

2.4.3 Messung der IgG-Subklassen

Zur Beurteilung der Qualität der Immunantwort wurden die Subklassen der Immunglobuline bestimmt. Die jeweilige Konzentration der Immunglobulin-Subtypen IgG1 bis IgG4 wurde ebenfalls mit der ELISA-Methode gemessen. Die Platten wurden mit denselben Antigen-Verdünnungen beschichtet. GMZ2 und GLURP wurden zu einer Konzentration von 0,5 µg pro ml PBS verdünnt, MSP3 zu 1 µg pro ml PBS. In den Spalten 1 und 2 wurde eine Verdünnungsreihe mit den polyklonalen Immunglobulinen der Subklassen geschaffen. Den Beginn bildete für jeden der Subtypen jeweils eine IgG-Konzentration von 1000 ng/ml. Anschließend wurde seriell verdünnt, so dass Konzentrationen von 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 250 ng/ml, 125 ng/ml, 62,5 ng/ml, 31,2 ng/ml, 15,6 ng/ml und 7,8 ng/ml entstanden. Die Platten inkubierten über Nacht bei 4 °C, wurden nach dem oben beschriebenen Waschvorgang am nächsten Tag geblockt und mit den Seren befüllt. Nach jeder Inkubation erfolgte ein Waschgang, immer mit dem Ziel, die nicht gebundenen Bestandteile zu entfernen. Die aufgetragenen Seren waren im Verhältnis 1:25 in Serum-Verdünnungspuffer verdünnt. Eine weitere Verdünnung wurde direkt auf der Platte gemacht, so dass eine zweite Konzentration von 1:50 entstand. Anschließend wurden die sekundären Antikörper auf die Platten gegeben, in der für die verschiedenen Subtypen unterschiedlichen Konzentration. Nachdem *TMB One* aufgetragen wurde und die Platten für 20 Minuten inkubierten, konnte die Enzymreaktion mit Hilfe der 0,2-molaren Schwefelsäure abgestoppt werden. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Aus der photometrisch ermittelten optischen Dichte, die mit der Standardkurve des Immunglobulins in Spalte 1 und 2 verglichen wurde, konnte mit Hilfe eines Programms die Konzentrationen der Antikörper ermittelt werden. Die Bestimmung der Antikörper-Konzentration der

Material und Methoden

Subklassen erfolgte vor der ersten Impfung an Tag 0 und vier Wochen nach der dritten Impfung an Tag 84.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IgG1	IgG1	PC	PC	V1d0	V1d0	V1d84	V1d84	V2d0	V2d0	V2d84	V2d84
B	IgG1	IgG1	PC	PC	V1d0	V1d0	V1d84	V1d84	V2d0	V2d0	V2d84	V2d84
C	IgG1	IgG1			V3d0	V3d0	V3d84	V3d84	V4d0	V4d0	V4d84	V4d84
D	IgG1	IgG1			V3d0	V3d0	V3d84	V3d84	V4d0	V4d0	V4d84	V4d84
E	IgG1	IgG1	NC	NC	V5d0	V5d0	V5d84	V5d84	V6d0	V6d0	V6d84	V6d84
F	IgG1	IgG1	NC	NC	V5d0	V5d0	V5d84	V5d84	V6d0	V6d0	V6d84	V6d84
G	IgG1	IgG1			V7d0	V7d0	V7d84	V7d84	V8d0	V8d0	V8d84	V8d84
H	IgG1	IgG1			V7d0	V7d0	V7d84	V7d84	V8d0	V8d0	V8d84	V8d84

Abbildung 4: Schema der Seren-Auftragung für die IgG-Subklassen. Beispielhaft für IgG1

V= Versuchsperson.

2.4.3.1 IgG1

Die Mikrotiterplatten wurden entsprechend der obigen Abbildung beschichtet. Auf jeder Platte fanden Seren von acht Probanden Platz. Als Positivkontrolle diente ein Serumpool von semiimmunen Afrikanern, wahren die Negativkontrolle von Europäern stammte, die noch nie in Kontakt mit Malaria waren. Nach der zweistündigen Inkubation und dem folgenden Waschschrift wurden 100 µl des 1:3000 in Verdünnungspuffer verdünnten Antikörpers gegen IgG1 aufgetragen. Der in der Maus entwickelte Anti-IgG1-Antikörper ist gegen menschliches IgG1 gerichtet. Da dieser Antikörper nicht mit einem Enzym gekoppelt ist, mussten nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Stunde 100 µl eines sekundären Antikörpers in der Verdünnung 1:3000 aufgetragen werden. Dieser zweite Antikörper ist gegen den primären Anti-IgG1-Antikörper gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Durch die Zugabe von *TMB One* konnte die Enzymreaktion gestartet und die Umsetzung des Substrates photometrisch bestimmt werden.

2.4.3.2 IgG2

Die Auftragung der Seren erfolgte wie bei IgG1.

Nach der zweistündigen Inkubation des Serums auf den beschichteten und anschließend geblockten Platten und dem folgenden Waschschrift wurden 100 µl des 1:5000 in Verdünnungs-Puffer verdünnten Anti-IgG2-Antikörpers aufgetragen. Anschließend wurden auch hier 100 µl des mit Peroxidase konjugierten sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:3000 in die Kavitäten pipettiert.

2.4.3.3 IgG3

Die Auftragung der Seren erfolgte nach gleichem Schema wie bei IgG1.

Nach der zweistündigen Inkubation und dem folgenden Waschschrift wurden 100 µl des 1:5000 im Verdünnungs-Puffer verdünnten Anti-IgG3-Antikörper aufgetragen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl des Peroxidase-konjugierten Anti-Maus-IgG in einer Verdünnung von 1:3000.

2.4.3.4 IgG4

Die Seren wurden ebenfalls nach dem für IgG1 dargestellten Schema aufgetragen.

Nach der zweistündigen Inkubation und dem folgenden Waschschrift wurden 100 µl des 1:1000 in Verdünnungs-Puffer verdünnten Anti-IgG4 auf die Platten gegeben. Dieser Antikörper war schon mit der Meerrettich-Peroxidase konjugiert, weshalb hier kein sekundärer Antikörper nötig war und die Zugabe von *TMB One* direkt folgen konnte.

2.5 Auswertung

In die Analyse der Immunogenität wie auch der Sicherheit wurden alle geimpften Personen aufgenommen.

Die Daten wurden in Papierform erfasst und später zur Vermeidung von Übertragungsfehlern doppelt von zwei verschiedenen Personen in eine elektronische Datenbank eingegeben.

Die Antikörperkonzentrationen wurden in Korrelation zu einer IgG-Standardkurve in $\mu\text{g/ml}$ berechnet. Dazu wurden die Programme Microsoft Excel 2007, R in Version 2.15-1 und Tinn-R verwendet.

Antikörperkonzentrationen von Null wurden als linkszensierte Einträge betrachtet und durch den kleinsten Wert des jeweiligen Antigens der jeweiligen Gruppe ersetzt.

Für jedes Antigen wurde das Verhältnis des geometrischen Mittelwertes der Antikörperkonzentrationen an den Impftagen zu dem geometrischen Mittelwert der Konzentrationen vor der Impfung berechnet. Das 95%- Konfidenzintervall wurde nach der Methode von Wald bestimmt.

Eine Kovarianz-Analyse auf den *log*-transformierten Daten wurde durchgeführt, um die geometrischen Mittelwerte der Konzentrationen zwischen den Impfgruppen zu vergleichen. Korrigiert wurde dabei für die IgG-Konzentration zum Zeitpunkt Null (vor der ersten Impfung). Der Unterschied der mittleren Konzentrationen zwischen den Gruppen wird dabei als Ratio angegeben mit 95% Konfidenzintervall und p-Wert.

3 Ergebnisse

Vom 18. Juli 2007 bis zum 12. August 2007 wurden von einem Team aus Ärzten und Krankenschwestern in Lambaréné und Umgebung insgesamt 89 männliche Personen auf die Möglichkeit zur Studienteilnahme untersucht. Von diesen 89 untersuchten Männern konnten 39 nicht in die Studie eingeschlossen werden. Die Gründe waren vor allem die Nichterfüllung von Einschlusskriterien bezüglich medizinischer Voraussetzungen oder der Rückzug der Einwilligung zur Studienteilnahme (Abbildung 1). Für den Fall, dass einer der Studienteilnehmer vor Verabreichung der ersten Impfdosis aus der Studie ausgeschlossen worden wäre, wurden zehn der 50 Personen, die als Teilnehmer in Frage kamen, als Ersatzprobanden auf eine Liste gesetzt. Die 40 in die Studie aufgenommenen Männer wurden in zwei Gruppen zu je 20 Studienteilnehmern randomisiert. Die Probanden der GMZ2-Gruppe erhielten im Abstand von je vier Wochen jeder drei Dosen mit 100 µg des GMZ2-Impfstoffes, während die Personen in der Kontrollgruppe nach dem gleichen Schema gegen Tollwut geimpft wurden.

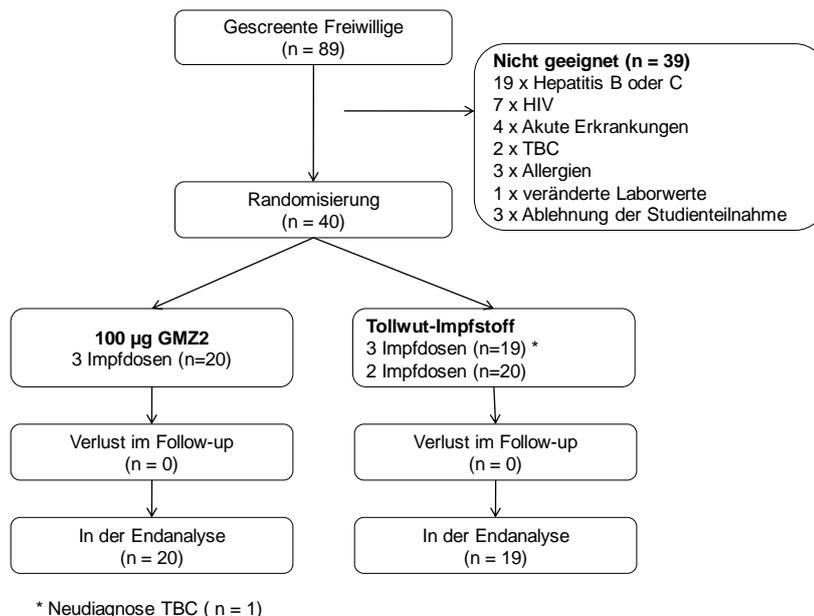


Abbildung 5: Diagramm zur Zuordnung der Studienteilnehmer zu den beiden Gruppen

Ergebnisse

Sämtliche Teilnehmer, die der GMZ2-Gruppe zugeteilt waren, beendeten die Studie mit allen drei vorgesehenen Impfungen. Alle wurden regelmäßig in den Nachverfolgungsvisiten bis ein Jahr nach der ersten Impfung gesehen und untersucht. Kein Studienteilnehmer dieser Gruppe musste im Verlauf ausgeschlossen werden oder zog seine Einwilligung zurück. In der Kontrollgruppe wurde bei einem Probanden zwischen der zweiten und dritten Impfung eine neu aufgetretene Tuberkulose diagnostiziert, was laut des Studienprotokolls einen Ausschluss von den weiteren Impfdosen zur Folge hatte. Dieser Proband hatte außerdem ein hepatozelluläres Karzinom und verstarb 155 Tage nach der ersten Tollwutimpfstoff-Injektion. Somit beendeten nur 19 Probanden in dieser Gruppe die Studie mit allen drei Impfungen. Während der einjährigen Nachsorge kam es auch in dieser Gruppe zu keinem weiteren Ausscheiden eines Probanden. Mit der Nachsorgeuntersuchung des letzten Probanden am 11. August 2008 wurde die einjährige klinische Beobachtung der Teilnehmer abgeschlossen.

Die beiden Gruppen waren sich ähnlich in Bezug auf Alter, Gewicht, Hämoglobinwert und die vor der Impfung bestehenden Serum-Konzentrationen der Antikörper gegen GMZ2, GLURP und MSP3 (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einschluss-Werte der Probanden mit Mittelwert (*), bzw. geometrischem Mittelwert (); (Minimal- bzw. Maximalwert)**

	GMZ2-Gruppe	Tollwut-Gruppe
Alter (Jahre) *	26,8 (18,0 – 42,6)	25,8 (18,3 – 44,2)
Gewicht (kg) *	65,0 (55,6 – 78,6)	61,4 (44,4 – 77,8)
Hämoglobin (g/dl) *	13,8 (11,6 – 17,9)	14,1 (10,9 – 16,7)
Anti-GMZ2 (mg/dl) **	0,29 (0,05 – 2,00)	0,22 (0,03 – 2,06)
Anti-GLURP (mg/dl) **	0,10 (0,02 – 0,35)	0,10 (0,04 – 0,37)
Anti-MSP3 (mg/dl) **	0,25 (0,07 – 1,42)	0,20 (0,07 – 1,09)

3.1 Sicherheit

Alle Nebenwirkungen waren von mildem bis mittlerem Schweregrad (Grad 1 und Grad 2). Während des gesamten Jahres, über das die Studie lief, trat kein schweres unerwünschtes Ereignis (Grad 3), jedoch mehrere schwerwiegende unerwünschte Ereignisse auf. Am häufigsten klagten die Studienteilnehmer über Schmerzen an der Injektionsstelle. Es kam zu nur einer sofortigen systemischen Nebenwirkung milden Schweregrades (Grad 1) in Form von Kopfschmerzen. Eine Übersicht über alle unerwünschten Ereignisse (*Adverse Events, AE*) gibt Tabelle 2. Es gab insgesamt zehn schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (*Serious Adverse Events, SAE*) bei sieben Personen. Sechs davon entfielen auf vier Teilnehmer, die der Tollwut-Gruppe zugeordnet waren. Einer der Männer musste auf Grund einer Schultergelenksluxation im Krankenhaus stationär aufgenommen werden, derselbe Proband kam später noch einmal wegen einer Ibuprofen-Überdosierung in die Klinik. Weitere Krankenhauseinweisungen erfolgten auf Grund eines Schlangenbisses und einer Tuberkulose. Außerdem ließ ein Proband während der einjährigen Studiendauer eine elektive Leistenhernienoperation durchführen. Es kam zu einem Todesfall in der Tollwut-Gruppe. Der Teilnehmer, bei dem 155 Tage nach Einschluss in die Studie ein hepatozelluläres Karzinom diagnostiziert wurde, verstarb daran. Bei demselben Probanden wurde zuvor, vier Tage vor der letzten Impfung, eine Tuberkulose diagnostiziert. Aus diesem Grund konnte er diese dritte Impfung nicht erhalten. In der GMZ2-Gruppe kam es zu vier SAEs bei drei Individuen. Zwei Männer mussten wegen eines Traumas hospitalisiert werden. Der eine mit einer Verletzung des rechten Auges, der andere einmal wegen einer zervikalen Kontusion und das zweite Mal mit traumabedingten Thoraxschmerzen. Ein Teilnehmer der GMZ2-Gruppe entwickelte sieben Tage nach der dritten Impfung eine Eosinophilie und wurde deshalb schließlich in die Klinik eingewiesen. Zunächst war unklar, ob diese Eosinophilie mit der Impfung in Verbindung zu bringen war. Allerdings wurde bei dem Studienteilnehmer eine persistierende Infektion mit *Loa loa* diagnostiziert und diese als der wahrscheinlichere Grund für die Erhöhung der eosinophilen Granulozyten angenommen. Bei allen anderen aufgetretenen

Ergebnisse

schwerwiegenden Nebenwirkungen gab es keinen Hinweis auf eine Kausalität der Impfung. Insgesamt wurden sieben Malaria-Episoden bei sechs Individuen beobachtet. Die Erkrankten waren gleichmäßig in den beiden Gruppen verteilt. Es gab vier Episoden bei drei Probanden der Tollwut-Gruppe und drei Episoden bei drei Probanden der GMZ2-Gruppe.

Ergebnisse

Tabelle 2: Anzahl der Teilnehmer mit Nebenwirkungen innerhalb von 14 Tagen nach den Impfungen; alle Reaktionen waren von mildem oder mittelgradigem Schweregrad (Grad 1 oder 2)

	Tollwut-Gruppe			GMZ2-Gruppe		
	Impfung 1 (n = 20)	Impfung 2 (n = 20)	Impfung 3 (n = 19)	Impfung 1 (n = 20)	Impfung 2 (n = 20)	Impfung 3 (n = 20)
Lokale Reaktionen:						
Schmerz	4	6	9	12	18	11
Rötung	0	2	5	2	1	2
Verhärtung	3	3	5	4	5	8
Ödem	0	2	5	2	1	2
Pruritus	2	2	5	1	2	2
Überwärmung	0	2	5	1	1	2
Systemische Reaktionen:						
Fieber	0	0	0	0	0	0
Reaktion auf Gegenseite der Einstichstelle	0	2	5	1	1	2
Erschöpfung	4	4	5	4	3	4
Schläfrigkeit	0	3	5	2	3	3
Malaise	1	4	9	1	2	2
Kopfschmerz	3	5	6	4	3	9
Gelenkschmerz	0	2	5	1	1	2
Myalgie	0	3	6	3	1	3
Appetitverlust	0	4	6	4	1	4
Übelkeit	0	2	5	3	2	3
Erbrechen	0	2	5	1	1	3
Diarrhoe	0	4	7	2	2	5
Tachykardie	0	2	5	1	1	2

3.2 Immunogenität

3.2.1 Immunglobulin G (IgG) gegen die Impfantigene

Zur Messung der Immunantwort auf die Impfung wurden die Antikörper gegen das fusionierte Impfantigen GMZ2 und seine beiden Einzelkomponenten GLURP und MSP3 mittels ELISA bestimmt.

Wie zu erwarten war, konnten bei den semiimmunen Probanden bereits vor der ersten Impfung antigen-spezifische Immunglobuline gemessen werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Höhe der Antikörper-Konzentrationen zwischen den einzelnen Studienteilnehmern (Abbildung 6).

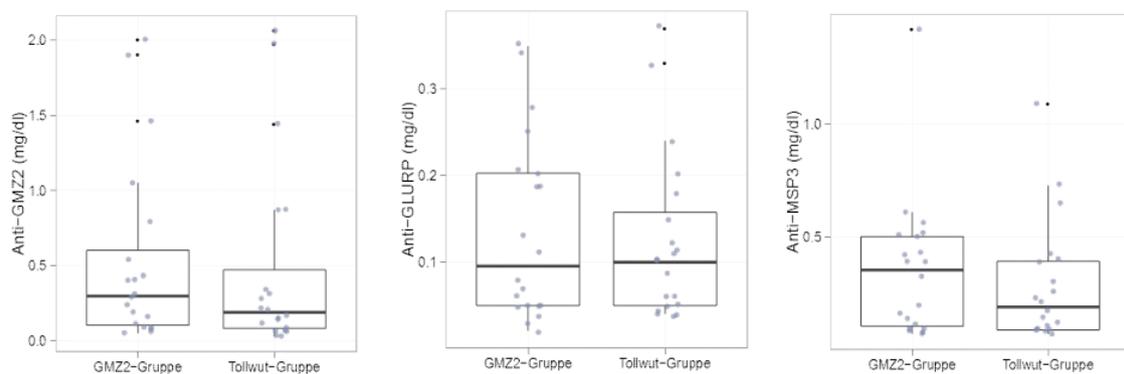


Abbildung 6: Verteilung der Antikörperkonzentrationen vor der ersten Impfung

Die geometrischen Mittelwerte der Antikörperkonzentrationen beider Gruppen waren sich dagegen sehr ähnlich (Abbildung 6).

3.2.1.1 IgG-Antikörper gegen das GMZ2-Antigen

Die Messung der Antikörperkonzentrationen gegen das GMZ2-Antigen ergab einen signifikanten Anstieg bei den Teilnehmern der Verumgruppe, nicht jedoch bei den Teilnehmern, die den Tollwutimpfstoff erhalten hatten (Tabelle 3).

Ergebnisse

Tabelle 3: Verhalten der Antikörper gegen GMZ2 an den Tagen 28 bis 365 im Vergleich zu Tag 0

Tage nach der ersten Impfung	Anti-GMZ2	
	Impfgruppe (95% Konfidenzintervall)	Kontrollgruppe (95% Konfidenzintervall)
28	1,06 (1,05 - 1,07)	0,80 (0,60 - 1,07)
56	1,36 (1,24 - 1,47)	0,78 (0,74 - 0,84)
84	1,79 (1,08 - 2,97)	0,83 (0,63 - 1,10)
365	2,02 (1,90 - 2,15)	1,92 (1,54 - 2,40)

3.2.1.2 Antikörperantwort auf das GLURP-Antigen

Auch gegen das GLURP-Antigen kam es nach den Impfungen zu einem Antikörper-Anstieg bei den Probanden der Impfgruppe. In der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Anstieg des Anti-GLURP-IgGs ausgemacht werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Verhalten der Antikörper gegen GLURP an den Tagen 28 bis 365 im Vergleich zu Tag 0

Tage nach der ersten Impfung	Anti-GLURP	
	Impfgruppe (95% Konfidenzintervall)	Kontrollgruppe (95% Konfidenzintervall)
28	1,20 (0,90 - 1,59)	1,00 (0,78 - 1,28)
56	1,65 (1,00 - 2,72)	0,96 (0,60 - 1,53)
84	1,76 (1,75 - 1,76)	0,89 (0,71 - 1,12)
365	3,36 (1,49 - 3,36)	1,92 (0,87 - 4,25)

3.2.1.3 Antikörperantwort auf das MSP3-Antigen

In keiner der beiden Gruppen kam es nach den Impfungen zu einem signifikanten Anstieg der MSP3-spezifischen Antikörper (Tabelle 5).

Ergebnisse

Tabelle 5: Verhalten der Antikörper gegen MSP3 an den Tagen 28 bis 365 im Vergleich zu Tag 0

Tage nach der ersten Impfung	Anti-MSP3	
	Impfgruppe (95% Konfidenzintervall)	Kontrollgruppe (95% Konfidenzintervall)
28	0,97 (0,91 - 1,03)	0,83 (0,72 - 0,95)
56	1,07 (0,98 - 1,16)	0,83 (0,70 - 0,98)
84	1,01 (0,93 - 1,10)	0,84 (0,65 - 1,10)
365	1,07 (0,51 - 2,27)	1,02 (0,41 - 2,55)

3.2.1.4 Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: IgG

Außerdem wurde eine Kovarianz-Analyse auf den *log*-transformierten Daten durchgeführt.

Die gemessene Effektgröße (Ratio) dabei beurteilt die Größe des Unterschieds der spezifischen Antikörperkonzentration zwischen GMZ2- und Kontrollgruppe, korrigiert für den Wert am Tag der ersten Impfdosis als Ratio (x-facher Anstieg).

Tabelle 6: Kovarianzanalyse: Vergleich zwischen der Impf- und Kontrollgruppe adjustiert für die IgG-Konzentration an Tag 0

	Tag	p-Wert	Ratio (95% CI)
Anti-GMZ2	28	0,0066	1,27 (1,08 - 1,50)
	56	0,02	1,57 (1,08 - 2,28)
	84	0,0025	2,17 (1,34 - 3,51)
	365	0,36	1,17 (0,83 - 1,64)
Anti-GLURP	28	0,17	1,19 (0,92 - 1,53)
	56	0,01	1,73 (1,45 - 2,60)
	84	0,0003	1,99 (1,40 - 2,83)
	365	0,01	1,84 (1,17 - 2,91)
Anti-MSP3	28	0,014	1,19 (1,04 - 1,35)
	56	0,0068	1,32 (1,08 - 1,59)
	84	0,026	1,25 (1,02 - 1,51)
	365	0,86	1,04 (0,67 - 1,60)

Ergebnisse

Hier wird deutlich, dass die Antikörper-Konzentrationen an den Tagen 28, 56 und 84, korrigiert für den Wert vor der ersten Impfung, in der Impfgruppe höher sind als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht auch für die MSP3-spezifischen Antikörper, allerdings hier geringer ausgeprägt als bei den GMZ2- und GLURP-spezifischen Antikörpern. An Tag 365 zeigte sich bei den Anti-GMZ2- und Anti-MSP3-IgGs zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied mehr in der Höhe der Antikörperantwort. In der GLURP-Gruppe jedoch war ein Unterschied auszumachen (Tabelle 6).

3.2.1.5 Verlauf der impfspezifischen Antikörper

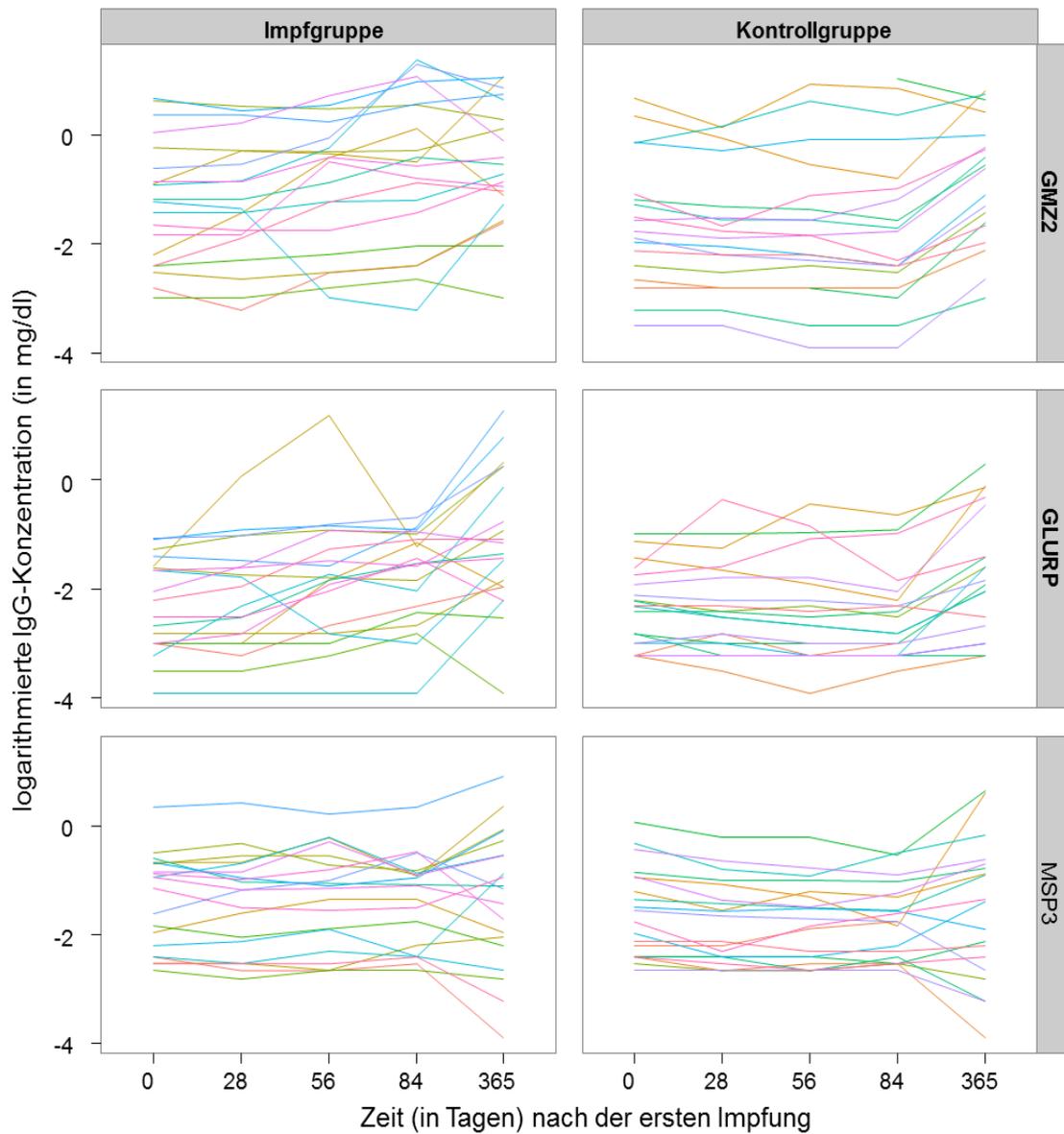


Abbildung 7: Verlauf der Antikörperkonzentrationen vom Einschluss bis zu Tag 365. Logarithmierte Darstellung der IgG-Konzentrationen

3.2.2 Antikörper-Antwort der IgG-Subtypen

Zur Beurteilung der Qualität der humoralen Immunantwort wurden zu Beginn (Tag 0) und vier Wochen nach der vollständigen Impfung (Tag 84) die Konzentrationen der IgG-Subklassen (IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) bestimmt.

Ergebnisse

Wie auch beim Gesamt-IgG zeigten sich hier große Unterschiede zwischen den einzelnen Studienteilnehmern in den bereits vor der Impfung vorhandenen Antikörperkonzentrationen.

3.2.2.1 Zytophile Antikörper

Die beiden Antikörper-Subtypen IgG1 und IgG3 sind in der Lage über eine Bindung an den Fc-Rezeptor mononukleäre Blutzellen zu aktivieren. Sie vermitteln somit neben direkten und komplementvermittelten auch zelluläre Immunreaktionen.

Die Antikörperkonzentrationen und ihre Veränderungen im Verlauf der Impfung wurden mittels ELISA in den Proben, die vor der ersten und einem Monat nach der letzten Injektion (Tag 84) abgenommen wurden, bestimmt.

3.2.2.1.1 IgG1

Die Anfangskonzentration des GMZ2-spezifischen IgG1 war in den beiden Gruppen sehr ähnlich, mit einem geometrischen Mittel von 0,65 mg/dl in der GMZ2-Gruppe und 0,70 mg/dl in der Kontrollgruppe.

Während es in der Verumgruppe zu einem signifikanten Anstieg des geometrischen Mittelwerts um den Faktor 2,41 kam, zeigte sich in der Kontrollgruppe kein Anstieg der impfspezifischen IgG1-Antikörper (Tabelle 7).

Auch die Konzentration der IgG1-Antikörper gegen GLURP stieg in der GMZ2-Impfgruppe signifikant an. In der Kontrollgruppe dagegen war im geometrischen Mittel keine Zunahme zu betrachten.

In keiner der beiden Gruppen konnte ein signifikanter Anstieg der IgG1-Antikörper gegen das MSP3-Antigen gemessen werden (Tabelle 7).

Ergebnisse

Tabelle 7: Relation der IgG1-Konzentrationen an Tag 84 verglichen mit den IgG1-Konzentrationen vor der Impfung (Tag0)

	GMZ2-Gruppe (95% Konfidenzintervall)	Kontrollgruppe (95% Konfidenzintervall)
Anti-GMZ2	2,41 (1,10 - 5,24)	0,93 (0,84 - 1,03)
Anti-GLURP	3,3 (1,32 - 8,27)	0,84 (0,61 - 1,14)
Anti-MSP3	1,28 (0,76 - 2,14)	0,93 (0,85 - 1,19)

3.2.2.1.2 IgG3

Bei dem zweiten zytophilen Antikörper, IgG3, zeigte sich im geometrischen Mittelwert keine signifikante Erhöhung der Antikörperkonzentration gegen GMZ2 oder GLURP in einer der Gruppen nach der Impfung (Tabelle 8). Die Antikörper gegen MSP3 stiegen in beiden Gruppen minimal an.

Tabelle 8: Relation der IgG3-Konzentrationen an Tag 84 verglichen mit den IgG3-Konzentrationen vor der Impfung (Tag0)

	GMZ2-Gruppe (95% Konfidenzintervall)	Kontrollgruppe (95% Konfidenzintervall)
Anti-GMZ2	1,67 (0,57 - 4,89)	0,86 (0,81 - 0,90)
Anti-GLURP	2,35 (0,89 - 6,20)	0,88 (0,78 - 1,00)
Anti-MSP3	1,15 (1,03 - 1,28)	1,019 (1,018 - 1,021)

3.2.2.2 Nicht-zytophile Antikörper

Zu den nicht-zytophilen Antikörpern, die nicht in die zelluläre Immunantwort eingreifen können, gehören die Subtypen IgG2 und IgG4.

Ergebnisse

3.2.2.2.1 IgG2

Die gegen das GLURP-Antigen gerichteten IgG2-Antikörper stiegen in der GMZ2-Gruppe leicht an. Bei den Anti-GMZ2- und Anti-MSP3-IgG2 kam es zu keinem signifikanten Anstieg. (Tabelle 9)

Tabelle 9: Relation der IgG2-Konzentrationen an Tag 84 verglichen mit den IgG2-Konzentrationen vor der Impfung (Tag0)

	GMZ2-Gruppe (95% Konfidenzintervall)	Kontrollgruppe (95% Konfidenzintervall)
Anti-GMZ2	1,89 (0,94 - 3,80)	0,99 (0,93 - 1,06)
Anti-GLURP	1,52 (1,25 - 1,85)	0,97 (0,93 - 1,01)
Anti-MSP3	1,24 (0,82 - 1,88)	1,02 (0,84 - 1,25)

3.2.2.2.2 IgG4

Die gemessenen Konzentrationen der IgG4-Antikörper waren sehr niedrig und zum Teil unterhalb des messbaren Bereichs. Somit standen nur sehr wenige Werte zur Verfügung, so dass hier auf weitere Berechnungen verzichtet wurde.

3.2.2.3 Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: IgG-Subtypen

Die berechnete Effektgröße (Ratio) beschreibt, um welchen Faktor die IgG-Konzentration in der Impfgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Berücksichtigung des Ausgangswertes nach Impfung verschieden ist.

Vor allem bei den zytophilen Antikörpern (IgG1 und IgG3), weniger ausgeprägt auch bei IgG2, war ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen (Tabelle 10). Dies trifft jedoch nur auf die GMZ2- und GLURP-spezifischen Antikörper zu, bei den MSP3-spezifischen zytophilen Antikörper bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Ergebnisse

Tabelle 10: Kovarianzanalyse der Subgruppen IgG1-IgG3: Vergleich zwischen der Impf- und Kontrollgruppe an Tag 84 adjustiert für die IgG1- IgG3-Konzentrationen an Tag 0

	Subgruppe	p-Wert	Ratio (95% CI)
Anti-GMZ2	IgG1	0,000000576	2,53 (1,85 - 3,46)
	IgG2	0,00092	1,85 (1,31 - 2,61)
	IgG3	0,000299	2,20 (1,47 - 3,27)
Anti-GLURP	IgG1	0,00000143	3,72 (2,33 - 5,91)
	IgG2	0,00036	1,62 (1,26 - 2,08)
	IgG3	0,000098	2,98 (1,80 - 4,96)
Anti-MSP3	IgG1	0,057	1,43 (0,99 - 2,07)
	IgG2	0,024	1,33 (1,04 - 1,69)
	IgG3	0,23	1,16 (0,91 - 1,49)

IgG4 wurde auf Grund der sehr niedrigen beziehungsweise nicht messbaren Konzentrationen nicht in der Analyse verwendet.

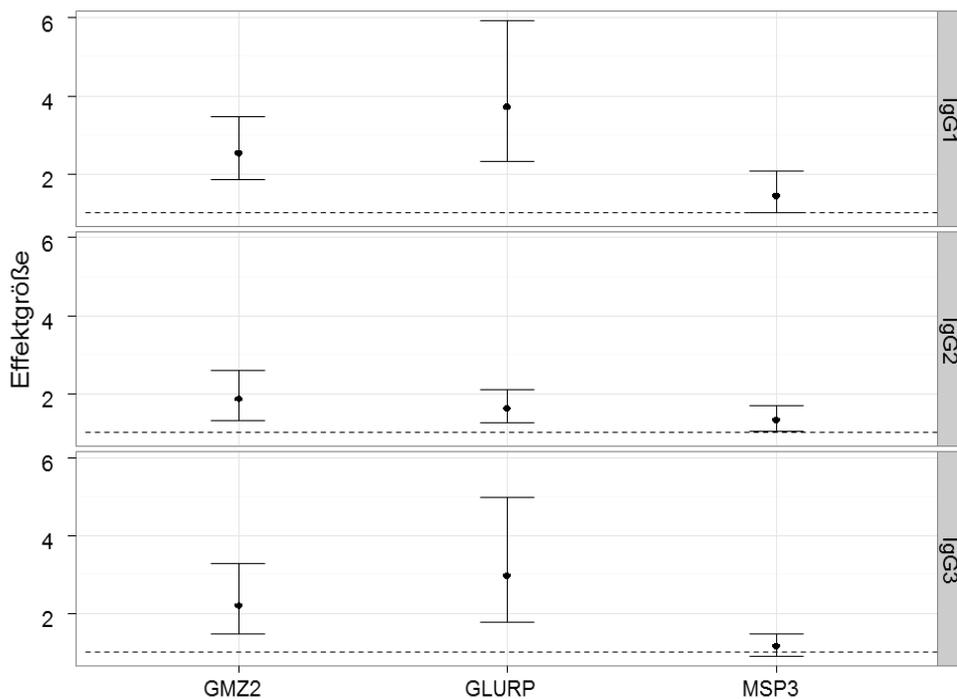


Abbildung 8: Unterschied der Antikörper-Konzentration nach Impfung mit GMZ2 und dem Kontrollvakzin (Ratio GMZ2:Kontrolle)

4 Diskussion

Für viele der betroffenen Länder stellt Malaria neben dem gesundheitlichen Aspekt auch ein großes ökonomisches Problem dar (Sachs and Malaney 2002). Durch zunehmende Resistenzen gegen Chemotherapeutika (Avery, Seoung-Ryoung et al. 2008) und Insektizide rückt die Entwicklung eines kostengünstigen und effizienten Impfstoffes gegen Malaria weiter in den Blickpunkt der klinischen Forschung (Tarleton 2005). Viele Antigene aus mehreren Stadien des Lebenszyklus von *P. falciparum* wurden in präklinischen Versuchen und auch in klinischen Impfstudien auf ihre immunologische Wirkung hin untersucht (Carvalho, Daniel-Ribeiro et al. 2002; Schwartz, Brown et al. 2012).

Am weitesten in der Entwicklung fortgeschritten ist der RTS,S-Impfstoff, der im präerythrozytären Stadium des Parasiten ansetzt und eine sterile Immunität erzielen soll (Alonso, Sacarlal et al. 2004; Agnandji, Lell et al. 2012). Ein Problem der präerythrozytären Impfstoffe ist allerdings, dass bisher noch kein langanhaltender und hoch-effektiver Impfschutz erzielt werden konnte. Durch diese zeitliche Begrenzung des Schutzes besteht die Gefahr, dass bei den geimpften Personen zu einem späteren Zeitpunkt im Leben Malariaepisoden mit schweren Komplikationen auftreten können (Stoute, Kester et al. 1998).

Auch verschiedene erythrozytäre Impfstoffkandidaten befinden sich aktuell in klinischer Entwicklung. Dazu zählen unter anderem solche, die auf den *P. falciparum*-Proteinen AMA1 (Dicko, Sagara et al. 2008) und MSP1 (Holder, Blackman et al. 1992) basieren. In Phase-II-Studien konnten jedoch bei diesen Impfstoffkandidaten bisher keine bzw. bei AMA1 nur eine isolatspezifische Wirksamkeit (Thera, Doumbo et al. 2011) nachgewiesen werden, so dass nach anderen Kandidaten für einen Malaria-Impfstoff gesucht werden sollte (Ogutu, Apollo et al. 2009; Sagara, Dicko et al. 2009). Außerdem werden Impfstoffe, die AMA1- und MSP1-Antigene enthalten, weiter verbessert (Malkin, Hu et al. 2008; Ellis, Wu et al. 2012).

Diskussion

Ein großes Problem bei der Impfstoffentwicklung stellt die Variabilität von Oberflächenproteinen des Parasiten dar. Dadurch wird der Aufbau einer Immunität gegen *P. falciparum* erschwert (Takala and Plowe 2009).

Ein effizienter Impfstoff sollte daher mehrere Antigene enthalten. Auch Vakzine mit kombinierten *P. falciparum*-Antigenen, die sowohl gegen präerythrozytäre als auch gegen erythrozytäre Parasitenstadien gerichtet sind, werden weiter erforscht (Crompton, Pierce et al. 2010).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem erythrozytären Impfstoffkandidat GMZ2. Dieses Fusionsprotein aus GLURP₂₅₋₅₀₀ und MSP3₂₁₂₋₃₈₂ soll die natürlich erworbene Semiimmunität imitieren und somit vor Komplikationen der schweren Malaria schützen (Theisen, Soe et al. 2004).

Ein möglicher Vorteil dieses recht neuen Impfstoffkandidaten liegt darin, dass sowohl MSP3 als auch GLURP hochkonservierte Regionen zwischen *P. falciparum*-Isolaten aus verschiedenen geographischen Regionen mit hoher Malaria-Transmissionsrate besitzen (de Stricker, Vuust et al. 2000; Singh, Soe et al. 2009) und ein Assay zur funktionalen Analyse der Antikörper existiert (Jepsen, Jogdand et al. 2013).

Der GMZ2-Impfstoff wurde bereits in einer Reihe von Studien sowohl *in vitro* (Theisen, Soe et al. 2004) als auch am Tiermodell untersucht (Carvalho, Alves et al. 2005). Es konnte die Überlegenheit von GMZ2 gegenüber einer Mischung der beiden Einzelkomponenten gezeigt werden (Theisen, Soe et al. 2004).

Die Theorie, dass eine erfolgreiche Malariainpfung mehrere Antigene enthalten sollte, wird durch eine Studie in Burkina Faso an Kindern im Alter von sechs Monaten bis neun Jahren unterstützt. Das gleichzeitige Vorkommen der Antikörper auf mehr als ein Antigen korrelierte hierbei mit einer geringeren Häufigkeit einer Malaria-Erkrankung (Meraldi, Nebié et al. 2004). Das Fusionsprotein GMZ2 wurde in Kombination mit zwei verschiedenen Adjuvantien an 18 Totenkopffaffen (*Saimiri sciureus*) untersucht. Die splenektomierten Tiere wurden nach einer GMZ2-Impfung mit *P. falciparum* infiziert (Carvalho, Alves et al. 2005). Die Entfernung der Milz war im Vorfeld erfolgt, um die natürliche Suszeptibilität gegenüber *P. falciparum* zu erhöhen (Fandeur, Mercereau-Puijalon et al. 1996). Eine hohe Parasitämie kann so

Diskussion

reproduzierbar erzeugt werden. In dieser Studie konnte eine Korrelation zwischen hohen Antikörpertitern und einem Schutz vor einer exzessiven Parasitenvermehrung beobachtet werden (Carvalho, Alves et al. 2005).

Im Jahr 2006 wurde GMZ2 zum ersten Mal an Menschen im Rahmen einer Studie der Phase Ia verabreicht (Esen, Kremsner et al. 2009). Bei dieser Dosisfindungsstudie an nicht-malariaexponierten Europäern zeigte sich GMZ2 in allen drei untersuchten Dosierungen (10 µg, 30 µg und 100 µg) als sicher und immunogen. Da sich keine Sicherheitsbedenken zeigten, wurde für die dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie der Phase Ib die Dosis von 100 µg ausgewählt. Damit ist in Folgestudien die Möglichkeit einer Dosisreduktion jederzeit gegeben.

In dieser Studie erhielten zum ersten Mal afrikanische, dem Malaria-Parasiten exponierte Teilnehmer den neuen Impfstoff. Durch die vorherige Exposition gegenüber den in der Impfung enthaltenen *P. falciparum*-Antigene könnten die afrikanischen Studienteilnehmer stärker als zuvor die europäischen Probanden auf die Impfung reagieren. Deshalb wäre es nicht gerechtfertigt, Kinder in solche einer frühen Phase zu impfen. Es wurden daher vorerst nur Erwachsene geimpft. Die Impfung afrikanischer Kleinkinder, der eigentlichen Zielpopulation, konnte erst erfolgen, nachdem sich in der Phase Ib bei exponierten Erwachsenen keine Sicherheitsbedenken zeigten.

Das Impfschema mit einem Impfabstand von jeweils vier Wochen entsprach dem der ersten Studie. Dieses Intervall wurde vor dem Hintergrund gewählt, die Impfung in bereits bestehende Impfschemata eingliedern zu können. Im erweiterten Impfprogramm der WHO (*Expanded Program on Immunization*, EPI), das eine weltweite Versorgung aller Kinder mit den wichtigsten Impfungen zum Ziel hat, werden unter anderem eine orale Poliomyelitisimpfung und die Diphtherie-Pertussis-Tetanus-Impfung im Abstand von vier Wochen empfohlen (Bennett, Woods et al. 1991). In den Ländern in denen Malaria endemisch ist und wo diese Impfung somit eingesetzt werden soll, gibt es oft nur eingeschränkte Versorgungsstrukturen. Hier hat sich das EPI als gut

Diskussion

funktionierendes System etabliert, um regelmäßige Kontakte mit Gesundheitseinrichtungen zu gewährleisten (Hutton and Tediosi 2006).

Ein anderer Abstand zwischen den Impfungen als im EPI-Schema bzw. eine zusätzliche vierte Impfung mit GMZ2 könnte möglicherweise zu einer besseren Immunität führen. Jedoch ist in den meisten afrikanischen Ländern die einzige realistische Möglichkeit Kleinkinder mit einer Impfung zu erreichen die Einhaltung des Schemas des erweiterten Impfprogramms der WHO (Schellenberg, Acosta et al. 1999)

Die Expression von GMZ2 erfolgte in *Lactococcus lactis*, einem grampositiven Bakterium. Dieses Expressionsmedium ist gut charakterisiert, gilt als sicher und wird schon lange Zeit in der Milchindustrie genutzt. Weitere Vorteile von *L. lactis* sind die Sekretion der gewünschten rekombinanten Proteine in den Überstand und die fehlende Produktion von toxischen Substanzen (Theisen, Soe et al. 2004). In der Vergangenheit ist bereits die Expression verschiedener Regionen der Impfantigene im häufig verwendeten System mit *Eschericia coli* erfolgt (Theisen, Vuust et al. 1995). Im Rahmen der Entwicklung eines Expressionssystem für die Produktion eines Impfstoffes für die Anwendung am Menschen wurde aber auf *L. lactis* gewechselt, da man hier GMZ2 in größeren Mengen und ohne Protein-Tag produzieren kann (Theisen, Soe et al. 2004).

Bereits seit vielen Jahren werden verschiedene Adjuvantien für Vakzine getestet (Singh and O'Hagan 2002). In der GMZ2-Studie wurde Aluminiumhydroxid als Adjuvans benutzt, dessen Sicherheitsprofil sehr gut bekannt ist. Die Aluminium-Verbindungen Aluminiumhydroxid, Aluminiumphosphat und Kaliumaluminiumsulfat sind als Bestandteile von Impfstoffen zugelassen und werden seit Jahrzehnten millionenfach verwendet (Baylor, Egan et al. 2002). In mehreren Malaria-Impfstoff-Studien konnte mit Aluminiumhydroxid eine akzeptable Immunantwort erreicht werden (Audran, Cachat et al. 2005; Sirima, Tiono et al. 2009). Allerdings ist Aluminiumhydroxid im Vergleich mit modernen Adjuvantien ein eher schwaches Adjuvans mit nur geringer immunogener Wirkung (Gupta 1998; Singh and O'Hagan 2002).

Diskussion

Als weitere Möglichkeit der Wirkungsverstärkung wurde die Kopplung von GMZ2 mit immunverstärkenden Influenza Virosomen (IRIV, *immunopotentiating reconstituted influenza virosomes*) getestet. Interessanterweise wurde dadurch die Immunogenität durch MSP3 erhöht, während in der Kombination mit den anderen Adjuvantien die GLURP-Domäne als immunogener getestet wurde (Tamborrini, Stoffel et al. 2011).

Die Möglichkeit, statt Aluminiumhydroxid ein stärker immunogenes aber bisher weniger auf die Verträglichkeit getestetes Adjuvans zu benutzen, ist eine Überlegung wert. Die Frage der Sicherheit für die gesunden Geimpften muss aber in jedem Fall an erster Stelle stehen und darf nicht zugunsten der Immunität vernachlässigt werden.

Bei Impfstudien der Phase I ist in Malariaendemiegebieten ein Kontrollimpfstoff sinnvoll, da die Hintergrundimmunität und natürliche Exposition die Interpretation der immunologischen und sicherheitsrelevanten Daten erschweren können. Einer Zunahme der Antikörpertiter können mehrere Ursachen zugrunde liegen. Sie kann zum einen durch die Immunisierung bedingt sein, jedoch kann auch die natürliche Exposition oder eine Kombination aus beidem dafür verantwortlich sein. Mit einer Kontrollgruppe wird diese natürliche Exposition berücksichtigt, so dass eine klarere Interpretation der serologischen Ergebnisse möglich ist. Die Möglichkeit der Placeboimpfung wurde wegen des Nutzens für die Teilnehmer durch eine Tollwutimpfung verworfen. Weitere Gründe für eine Immunisierung gegen Tollwut sind die gute Toleranz und die Effektivität des Impfproteins. Obwohl sie häufig mit milden, vorübergehenden lokalen Reaktionen assoziiert sind, werden alle zugelassenen Tollwutimpfstoffe als sicher und gut verträglich angesehen. Der registrierte und in Gabun empfohlene Tollwutimpfstoff Verorab® wurde als Kontrollimpfstoff ausgewählt. Nach der Entblindung wurde allen Teilnehmern, die der GMZ2-Gruppe zugeteilt waren, ebenfalls eine Immunisierung gegen Tollwut angeboten.

4.1 Sicherheit der Impfung; klinische Beobachtungen

Primäres Ziel dieser Studie war es, die Sicherheit von GMZ2 in einer Personengruppe, die dem Malariaparasiten ausgesetzt ist, zu beurteilen. Durch die vorherige Exposition gegenüber den Impfantigenen war es wichtig zu untersuchen, ob bei den afrikanischen Studienteilnehmern die bestehende Immunantwort gegen das Impfantigen verstärkt wird und wenn ja, ob diese Verstärkung zu unerwünschten Wirkungen führt. Im Gegensatz zu der Vorläuferstudie in Tübingen, kam es in Gabun zu keinen unerwünschten Ereignissen dritten Grades. Die Teilnehmer klagten jedoch häufig über lokale Nebenwirkungen, wie Schwellung, Rötung und Schmerz. Diese lokalen Reaktionen waren bereits in einer Studie in Burkina Faso mit MSP3 als Komponente des an Kinder verabreichten Impfstoffes zu beobachten gewesen (Sirima, Tiono et al. 2009) und sind typisch für adjuvantierte Proteinimpfstoffe. In unserer Studie der Phase Ib wurde GMZ2, wie auch schon in der Tübinger Studie, subkutan verabreicht. Bei dieser Applikationsform ist durch die Depotbildung im empfindlichen Unterhautfettgewebe allgemein mit mehr lokalen Reaktionen zu rechnen als bei der Applikation in den Muskel. Andere Studien beschreiben ebenfalls hohe lokale Nebenwirkungen bei subkutaner Injektion (Lusingu, Gesase et al. 2009). In den nachfolgenden Studien bei Kindern in Gabun (Belard, Issifou et al. 2011) und einer im Moment noch laufenden multizentrischen Phase-II-Studie (*Pan African Clinical Trials Registry*, Studiennummer PACTR2010060002033537) wurde GMZ2 intramuskulär injiziert und damit die lokale Verträglichkeit verbessert.

Alle schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse, die im Verlauf der Studie auftraten, waren nicht mit der Impfung in Verbindung zu bringen. Zunächst wurde zwar eine neu aufgetretene Eosinophilie eines Studienteilnehmers als mögliche Impffolge in Erwägung gezogen. Allerdings wurde bei diesem Probanden während der daraufhin folgenden, umfassenden Diagnostik eine persistierende Infektion mit *Loa Loa* gefunden, welche die Vermehrung der eosinophilen Granulozyten erklärt. Damit ist die Eosinophilie als Impffolge unwahrscheinlich.

Im Verlauf der Studie wurden insgesamt sieben Malariaepisoden beobachtet. Es waren sechs Studienteilnehmer betroffen, die gleichmäßig in den beiden Gruppen verteilt waren. Die Tatsache, dass Malariaepisoden genauso häufig in der Impfgruppe wie in der Kontrollgruppe auftraten, spricht nicht für ein Versagen der GMZ2-Impfung. Ziel dieser erythrozytären Impfung ist ja keine sterile Immunität wie bei den präerythrozytären Impfstoffen sondern eine Abschwächung der Infektion.

Alle unsere Studienteilnehmer haben durch häufige Malariainfektionen schon ihre natürliche Semiimmunität erworben. Genau dieser Zustand soll durch die Impfung bei Kindern erreicht werden. Ziel ist die Entwicklung einer Semiimmunität ohne das häufige Durchleben einer Malaria mit all den möglichen Risiken. Diese sogenannte nicht-sterile Immunität bezeichnet den Zustand, dass der Erreger nicht eliminiert wird, aber neutralisierende Antikörper seine Wirkung abschwächen. Somit besteht zwar kein Schutz vor einer Malariainfektion, aber die oft lebensgefährlichen Komplikationen werden verhindert. Eine Infektion mit leichtem Verlauf oder eine asymptomatische Infektion ist weiter möglich und wird durch die Impfung nicht verhindert (Theisen, Soe et al. 2004).

4.2 Immunogenität - Humorale Immunantwort

Das Verständnis der erworbenen Immunität gegenüber Malaria ist noch sehr lückenhaft und möglicherweise von sehr vielen zum Teil noch unbekanntem Faktoren abhängig. Es gibt gute Hinweise, dass die natürliche Semiimmunität vor allem durch Immunglobuline vermittelt wird (Bull and Marsh 2002). Es wird postuliert, dass Antikörper durch die Bindung an Erregerstrukturen direkt die Funktion dieser Proteine neutralisieren. Eine weitere Fähigkeit der Antikörper ist das Markieren von Erregern, so dass Zellen des angeborenen Immunsystems über bestimmte Rezeptoren die markierten Erreger erkennen können. Durch die neutralisierenden Antikörper gegen Toxine des Parasiten steigt die Toleranz gegenüber dem Erreger (Naik, Branch et al. 2000).

Diskussion

Die Präsenz von *Plasmodium*-spezifischen Immunglobulinen im Blut spricht für eine entwickelte klinische Immunität. Zur Beurteilung des Impferfolges bestimmten wir deshalb vor und nach den Impfungen die Höhe der Immunglobulinkonzentration. Da alle geimpften Personen in einem Malariaendemiegebiet leben, ist es zu erwarten, dass schon vor der ersten Impfung bei den Studienteilnehmern ein gewisser Basistiter der Antikörper gegen die Impfantigene vorhanden war (Dal-Bianco, Koster et al. 2007). Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zu der Vorläuferstudie in Tübingen dar, bei der die Probanden noch nie in Kontakt mit *P. falciparum* waren und somit vor Beginn der Studie keine Antikörper gegen die Impfantigene aufwiesen (Esen, Kremsner et al. 2009).

Die Antikörperkonzentration befand sich nach der Randomisierung wie erwartet in beiden Gruppen im gleichen Größenbereich.

Während die IgG-Konzentration gegen das GMZ2-Antigen im geometrischen Mittel in der Verumgruppe anstieg, konnte in der Kontrollgruppe kein signifikanter Anstieg der Antikörper beobachtet werden. In der Kontrollgruppe war in der Messung nach der zweiten Impfung (Tag 56) sogar ein Rückgang der GMZ2-spezifischen Antikörper zu verzeichnen. Als mögliche Ursachen kann über eine verminderte Exposition der Studienteilnehmer gegenüber dem Parasiten, z.B. durch die engmaschigen Kontrollen, in der Zeit vor der Messung nachgedacht werden. Dies würde den Anstieg in der Impfgruppe umso bedeutender erscheinen lassen, da auch die Probanden dieser Gruppe weniger exponiert gewesen wären.

Allerdings wurde ein signifikanter Rückgang der Antikörper nur an einem Tag bei nur einem Antigen gemessen. Somit scheint ein ebenso möglicher Zusammenhang mit der Tollwut-Impfung unwahrscheinlich.

Auch im geometrischen Mittelwert der Antikörperkonzentration gegen das GLURP-Antigen in der Verumgruppe zeigte sich eine Zunahme im Vergleich zum Ausgangstiter. Dies bestätigt die Vermutung, dass die GMZ2-Vakzination zu einer Erhöhung der schon vorhandenen Antikörper gegen das GMZ2- und das GLURP-Antigen führt. Trotz der hohen Hintergrundaktivität durch die bei

Diskussion

der exponierten Bevölkerung bereits vorhandenen Antikörper gegen *P. falciparum*-Antigene konnte der Anstieg der Antikörper deutlich gemessen werden.

Ein signifikanter Anstieg im geometrischen Mittelwert des Anti-MSP3-IgGs wurde nicht festgestellt. Die Kovarianzanalyse veranschaulicht dagegen, dass zwischen den beiden Gruppen durchaus ein signifikanter, wenn auch nur geringer Unterschied in der Höhe der nach den Impfungen gemessenen IgG-Konzentrationen jeweils im Vergleich zu den IgG-Konzentrationen vor der ersten Impfung besteht.

Der fehlende bzw. nur gering ausgeprägte Anstieg der MSP-spezifischen Antikörper steht im Gegensatz zu der Studie der Phase Ia in Tübingen. Hier konnte im Serum der Studienteilnehmer, die noch nie mit Malaria in Kontakt gekommen waren, ein Anstieg der MSP3-Konzentration gemessen werden. Dieser war allerdings auch hier deutlich geringer ausgefallen als der Anstieg der Antikörper gegen GLURP oder GMZ2 (Esen, Kremsner et al. 2009).

Auch in anderen Studien wird ein deutlicher Anstieg der MSP3-spezifischen Antikörper bei nicht malaria-exponierten Teilnehmern beschrieben (Audran, Cachat et al. 2005). Bei semiimmunen Erwachsenen wurde dagegen bereits in anderen Studien eine geringere Zunahme der MSP3-spezifischen Antikörper im Vergleich zu den GLURP-spezifischen Antikörpern festgestellt (Nebie, Diarra et al. 2008). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass MSP3 bei Kindern, die noch keine Semiimmunität entwickeln konnten, eine ähnliche immunologische Wirkung auslöst wie bei den Malaria-naïven Europäern.

Als anderer möglicher Grund für den fehlenden Anstieg der MSP3-spezifischen Antikörper käme auch ein schlechteres Ansprechen auf den verwendeten Assay in Frage. Es ist möglich, dass das MSP3-Antigen weniger gut an die Platte bindet oder die Blockier-, Wasch- und Binde-Bedingungen, die für alle Antigene gleich verwendet wurden, nicht optimal auf die Bindecharakteristika von MSP3 abgestimmt waren. Die Coating-Konzentration von 1 µg/ml war für MSP3 bereits doppelt so hoch wie für GLURP und GMZ2 mit jeweils 0,5 µg/ml. Außerdem erfolgte die Expression des in den immunologischen Tests

verwendeten MSP3-Antigens in *E. coli* und unterscheidet sich somit von der im GMZ2-Impfstoff enthaltenen MSP3-Komponente.

Nach einem Jahr konnte bei keinem Antigen ein Unterschied in der Höhe der Antikörper-Antwort zu der Kontrollgruppe mehr festgestellt werden. Eine mögliche Impfung müsste somit jährlich verabreicht werden. Hier stellt sich die Frage, bis zu welchem Alter eine solche Impfung regelmäßig durchgeführt werden muss, um die natürliche Semiimmunität zu erreichen.

Alternativ sollte der Effekt einer vierten Impfung (Boosterimpfung) untersucht werden, mit dem Ziel, eine länger andauernde Immunität zu erreichen.

4.2.1 IgG - Subklassen

Als entscheidend für die Wirkung der Immunglobuline im ADCI-Assay zeigte sich die Verteilung der Isotypen der Antikörper (Bouharoun-Tayoun, Attanath et al. 1990; Aribot, Rogier et al. 1996). Die Subtypen IgG1 und IgG3 induzieren zusätzlich zur direkten Eliminierung der Toxine durch die Antikörper auch eine Monozyten-vermittelte Eliminierung des Parasiten, was die Wirkung gegen die Infektion verstärkt. Sie aktivieren Monozyten zur Sekretion des Tumornekrosefaktors (TNF) und anderer Substanzen, die das Parasitenwachstum hemmen (Bouharoun-Tayoun, Oeuvray et al. 1995). Daten einer in Ghana durchgeführten Studie lassen auf die Wichtigkeit der Antikörper-vermittelten zellulären Inhibition für eine GLURP-spezifische protektive Immunität schließen. Hohe Spiegel der zytophilen Antikörper korrelieren dabei mit einem Schutz vor klinischer Malaria (Dodoo, Theisen et al. 2000).

Die IgG-Subklassen wurden zu Beginn der Studie (an Tag 0) und einen Monat nach Beendigung der Impfungen (an Tag 84) analysiert. Auch hier konnten wieder große interindividuelle Unterschiede in der Höhe der Anfangstitere beobachtet werden. In der GMZ2-Gruppe, nicht aber in der Tollwut-Gruppe wurde ein signifikanter Anstieg der zytophilen Subklasse IgG1 gegen die Antigene GMZ2 und GLURP gemessen. Unsere Ergebnisse bestätigen die in der Literatur in verschiedenen Studien beschriebene Erhöhung der zytophilen

Diskussion

Antikörper gegen eine der beiden Impfstoffkomponente (Oouvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994; Theisen, Soe et al. 1998).

Ein Anstieg der zytophilen Antikörper ist erwünscht, da diese die Fähigkeit zur Antikörper-abhängigen zellulären Hemmung (ADCI) besitzen. Sie agieren so zusammen mit den mononukleären Blutzellen, was die Wirkung gegen die Infektion verstärkt.

Wie bei der in Tübingen durchgeführten Studie der Phase Ia war der Anstieg v.a. des IgG1 gegen die Impfantigene zu erkennen (Esen, Kremsner et al. 2009). Die Konzentrationen von IgG3 stiegen in der afrikanischen Population nicht signifikant an. Bei Betrachtung des Unterschieds zwischen den beiden Gruppen in der Kovarianzanalyse zeigte sich jedoch auch bei der in Lambaréné durchgeführten Studie ein deutlicher und signifikanter Unterschied der GMZ2- und GLURP-spezifischen IgG1- wie auch der IgG3-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Bei den nicht-zytophilen IgG2-Antikörpern war in der Kovarianzanalyse ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen, jedoch war dieser deutlich weniger ausgeprägt als bei den zytophilen Subklassen.

Die Konzentrationen der IgG4-Antikörper waren bei fast allen Probanden sehr niedrig, so dass hier keine aussagekräftige Analyse durchgeführt werden konnte. Es ist zu überlegen, ob das Protokoll für den IgG4-ELISA in zukünftigen Studien modifiziert werden kann. Allerdings wurde auch in anderen Studien sehr niedrige Konzentrationen bzw. fehlende IgG4-Antikörper beschrieben (Sirima, Nebie et al. 2007). Da die nicht-zytophilen IgG-Subklassen mit den zytophilen IgG-Subklassen um dieselben Antigen-Bindungsstelle konkurrieren und damit die Kontrolle der Parasitenvermehrung via ADCI herabsetzen, kann das Fehlen der nicht-zytophilen Antikörper auch als durchaus positives Zeichen gewertet werden (Bouharoun-Tayoun, Oouvray et al. 1995).

Gegen das MSP3-Antigen konnten wir keine Konzentrationserhöhung der zytophilen Antikörper messen. Da andere Studien MSP3 als wichtigen Induktor der Antikörper-vermittelten zellulären Reaktion identifiziert haben, wäre es wichtig in der weiteren Entwicklung von GMZ2 darauf zu achten, dass eine

stärkere Immunantwort gegen MSP3 erreicht wird (Ouvray, Bouharoun-Tayoun et al. 1994).

4.3 Limitationen der Arbeit

Da in dieser frühen Studienphase das Hauptaugenmerk auf die Sicherheit dieses potentiellen Impfstoffes gelenkt wurde, nahm nur eine recht kleine Anzahl von 40 Probanden an der Studie teil. Eine solche Größenordnung entspricht der üblichen Personenzahl in Phase-I-Studien und ist für die Beurteilung der Sicherheit und Verträglichkeit sinnvoll. Für eine solide Aussage über die Immunogenität von GMZ2 wäre jedoch eine größere Teilnehmerzahl wünschenswert und nötig. Dies wird auch in den weiteren Phasen der Studie geschehen. Dennoch kann auch mit dieser Zahl schon eine erste Einschätzung bezüglich des immunologischen Effekts getroffen werden, worauf weitere Studien aufbauen können.

Ein weiterer Punkt ist, dass ausschließlich Männer beteiligt waren, womit die Gruppe nicht repräsentativ für die Bevölkerung ist. Da in Gabun eine hohe Geburtenrate herrscht und bei Frauen in gebärfähigem Alter das Risiko einer nicht bekannten Schwangerschaft sehr groß ist, wurde aus Sicherheitsgründen in dieser Anfangsphase der Impfstoff nur an erwachsenen Männern getestet. Nachdem in dieser Phase der Studie der Impfstoff-Kandidat jedoch ohnehin noch nicht an der eigentlichen Zielpopulation, nämlich Kleinkindern, getestet wurde, kann man davon ausgehen, dass das Fehlen weiblicher Studienteilnehmer nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Studienteilnehmer lebten alle schon seit Jahrzehnten in einem Malariaendemiegebiet und haben daher bereits die erwünschte klinische Immunität entwickelt. Sie sind somit nicht die eigentliche Zielpopulation der Impfung. Die Impfung wurde für Kleinkinder entwickelt. Sie sollen mit Hilfe des Impfstoffes früh eine klinische Immunität ähnlich der natürlichen Semiimmunität erlangen, die ohne wiederholte, potentiell lebensbedrohliche Malariainfektionen erreicht werden kann. Allerdings wäre es in dieser frühen Phase nicht

Diskussion

gerechtfertigt, das Vakzin an kleinen Kindern zu testen, da der neue Impfstoff zum ersten Mal an in Afrika lebenden Personen verabreicht wurde.

Die Impfung der eigentlichen Zielpopulation, Kindern im Alter von unter fünf Jahren, wurde in Folgestudien nach weitgehendem Ausschluss von Sicherheitsbedenken untersucht.

Ziel ist es, die Impfung in die bereits bestehenden Impfschemata der betroffenen Länder zu integrieren. Deshalb wurde der Impfabstand von jeweils vier Wochen gewählt. Jedoch wurde schon nach einem Jahr kein Unterschied mehr festgestellt in der Höhe der impfspezifischen Antikörper zwischen der GMZ2- und der Kontrollgruppe. Somit müsste die Impfung jährlich zumindest aufgefrischt werden. Die praktische Durchführung würde die Möglichkeiten der lokalen Gesundheitssysteme in den betroffenen Ländern vor große Probleme stellen.

Die geimpften Kinder leben aber weiter in einem holoendemischen Gebiet und sind von vielen Infektionen betroffen, die durch die Impfung hoffentlich sehr milde verlaufen. Dadurch hat ihr Immunsystem die Möglichkeit die Semiimmunität auszubilden. Somit wäre es durchaus möglich, dass eine Impfung nicht über viele Jahre aufgefrischt werden muss, was die Praktikabilität sehr erleichtern würde.

Im Unterschied zur Tollwutimpfung wurde die GMZ2-Impfung nicht intramuskulär sondern subkutan verabreicht. Somit bestand die Gefahr einer frühzeitigen Entblindung. Durch die strikte Abtrennung des Teils des Studienteams, das die Impfung vorbereiteten und verabreichten, konnte die Verblindung jedoch aufrechterhalten werden.

Die Frage der Effizienz der Impfung wurde hier nur mit Hilfe der Zunahme der spezifischen Antikörper beantwortet. Die Bedeutung der humoralen Immunantwort ist seit langem bekannt, so dass die Antikörpererhöhung als Marker für eine Immunität herangezogen wird. Inwieweit die vorhandenen Antikörper dann auch tatsächlich zu einem Schutz vor schwerer Malaria führen wird kontrovers diskutiert (Good and Doolan 1999; Crompton, Pierce et al.

2010). Dies kann erst beantwortet werden, wenn die Impfung an eine recht große Zahl exponierter Kinder verabreicht wurde und ein Rückgang der schweren Malariaepisoden zu beobachten ist.

Allerdings konnte vor kurzem schon *in vitro* gezeigt werden, dass die durch die Impfung mit GMZ2 gebildeten Antikörper funktionell aktiv sind, unabhängig von einer vorherigen Exposition der Geimpften gegenüber dem Malaria-Parasiten (Jepsen, Jogdand et al. 2013).

Die vorliegende Arbeit geht nicht auf die Bedeutung des zellulären Immunsystems und die Ausbildung einer zellulären Immunität ein. Die Freisetzung von verschiedenen Mediatoren spielt für die Ausbildung der klinischen Immunität gegenüber Malaria jedoch eine bedeutende Rolle (Doolan, Sedegah et al. 1996). In anderen und weiterführenden Studien wird dies weiter untersucht werden.

4.4 Fazit und Ausblick

Mit dieser Studie konnte die Sicherheit und Immunogenität von GMZ2 bestätigt werden. Da keine Sicherheitsbedenken bestehen und Hinweise auf die immunologische Wirksamkeit des Impfstoffs vorhanden sind, kann die Studie in weitere Phasen gehen. Eine Studie mit afrikanischen Kindern, die mit GMZ2 geimpft wurden, fand in Lambaréné vor kurzem ihr Ende (Belard, Issifou et al. 2011). In Kürze werden Ergebnisse einer multizentrischen Phase-II-Studie erwartet. Hier wird die Wirksamkeit, die Sicherheit und die Immunogenität von GMZ2 bei 1840 Kindern im Alter von 12 bis 60 Monaten untersucht. Ob es GMZ2 schafft, als Impfstoff anerkannt zu werden, wird sich im Verlauf der nächsten Jahre in zahlreichen weiterführenden Studien zeigen.

5 Zusammenfassung

Malaria bleibt eines der größten Gesundheitsprobleme der Länder südlich der Sahara. Die Inzidenz wird auf 216 Millionen klinischer Fälle mit bis zu 655000 Todesfällen pro Jahr geschätzt. Ein wirkungsvoller Malariainpfstoff wird als hoffnungsvolles Mittel im Kampf gegen die Krankheit angesehen. Jedes Stadium des *Plasmodium falciparum*-Lebenszyklus stellt einen Ansatzpunkt für einen Impfstoff dar. Ein Impfstoff, der im präerythrozytären Stadium ansetzt, sollte Antikörper und Effektor-T-Zellen gegen Sporozoiten produzieren. Impfstoffe gegen sexuelle Stadien des Parasiten sollen die Übertragung auf den Vektor verhindern. Eine Vakzine, die im erythrozytären Stadium ansetzt, zielt auf die Induktion einer Immunität, die die Parasitämie kontrolliert und somit vor schweren Komplikationen mit oft tödlichem Ausgang schützt. Das Hybridprotein GMZ2 ist ein rekombinanter Impfstoffkandidat des erythrozytären Stadiums, zusammengesetzt aus konservierten Fragmenten von zwei Proteinen des Malariaparasiten *P. falciparum*, dem *Glutamat Rich Protein* (GLURP) und dem *Merozoite Surface Protein 3* (MSP3). Die beiden Regionen GLURP₂₅₋₅₀₀ und MSP3₂₁₂₋₃₈₂ wurden gekoppelt und als rekombinantes Fusionsprotein im Expressionssystem *Lactococcus lactis* produziert. Das Fusionsprotein ist immunogener als die Einzelkomponenten und zeigte partielle Wirksamkeit in einem Tiermodell. Zur Beurteilung der Sicherheit und Immunogenität von GMZ2 wurde eine Studie der Phase Ia in Tübingen und eine der Phase Ib in Gabun gestartet. In der dosisfindenden Studie in Tübingen wurde den Probanden 10 µg, 30 µg oder 100 µg GMZ2 an den Tagen 0, 28 und 56 gegeben. In der anschließenden randomisierten doppelblinden Studie in Gabun erhielten 40 männliche Probanden entweder 100 µg des GMZ2-Impfstoffes oder den Tollwut-Impfstoff *Verorab*®. Im Rahmen der Studie wurden Sicherheit und Immunogenität untersucht. Die Höhe der Impfstoff-spezifischen Immunglobuline wurde mittels ELISA bestimmt. Zusätzlich wurden die IgG-Isotypen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 gemessen, um die Qualität der Immunantwort zu analysieren. Sowohl der Tollwut- als auch der GMZ2- Impfstoff wurden gut vertragen. Es kam zu keinem unerwünschten Ereignis vom Schweregrad III. Die

Zusammenfassung

aufgetretenen schwerwiegenden unerwünschten Ereignisse waren nicht mit der Impfung in Verbindung zu bringen. Im Gegensatz zu den deutschen Studienteilnehmern wiesen die Probanden in Gabun durch ihre Exposition gegenüber *P. falciparum* schon vor der ersten Impfung Impfstoff-spezifische Antikörper auf. Trotzdem konnte eine Erhöhung der Konzentrationen der GMZ2- und GLURP-spezifischen Antikörper nach den Impfungen gemessen werden. Des Weiteren zeigte sich in der GMZ2-Gruppe ein Anstieg des zytophilen Antikörper IgG1 gegen das GLURP- und das GMZ2-Antigen. Insgesamt kann GMZ2 als sicher und immunogen bezeichnet werden. Die Impfung stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Bekämpfung der Malaria dar. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl von Probanden sollen weitere Aufschlüsse bringen.

6 Literaturverzeichnis

- Ackerman, H., S. Usen, et al. (2005). "A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria." Ann Hum Genet **69**(Pt 5): 559-565.
- Agnandji, S. T., B. Lell, et al. (2012). "A phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African infants." N Engl J Med **367**(24): 2284-2295.
- Allison, A. C. (1954). "Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malarial infection." Br Med J **1**(4857): 290-294.
- Alonso, P. L., J. Sacarlal, et al. (2005). "Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of Plasmodium falciparum disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial." The Lancet **366**(9502): 2012-2018.
- Alonso, P. L., J. Sacarlal, et al. (2004). "Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against Plasmodium falciparum infection and disease in young African children: randomised controlled trial." The Lancet **364**(9443): 1411-1420.
- Aribot, G., C. Rogier, et al. (1996). "Pattern of Immunoglobulin Isotype Response to Plasmodium falciparum Blood-Stage Antigens in Individuals Living in a Holoendemic Area of Senegal (Dielmo, West Africa)." Am J Trop Med Hyg **54**(5): 449-457.
- Audran, R., M. Cachat, et al. (2005). "Phase I Malaria Vaccine Trial with a Long Synthetic Peptide Derived from the Merozoite Surface Protein 3 Antigen." Infect. Immun. **73**(12): 8017-8026.
- Avery, M. A., C. Seoung-Ryoung, et al. (2008). "The Fight Against Drug-Resistant Malaria: Novel Plasmodial Targets and Antimalarial Drugs." Current Medicinal Chemistry **15**(2): 161-171.
- Baylor, N. W., W. Egan, et al. (2002). "Aluminum salts in vaccines--US perspective." Vaccine **20**(Supplement 3): S18-S23.
- Belard, S., S. Issifou, et al. (2011). "A randomized controlled phase Ib trial of the malaria vaccine candidate GMZ2 in African children." PLoS One **6**(7): 28.

Literaturverzeichnis

- Bennett, S., T. Woods, et al. (1991). "A simplified general Method for cluster-sample surveys of health in developing countries." World health statistics quarterly **44**(3): 98-106.
- Borre, M. B., M. Dziegiel, et al. (1991). "Primary structure and localization of a conserved immunogenic Plasmodium falciparum glutamate rich protein (GLURP) expressed in both the preerythrocytic and erythrocytic stages of the vertebrate life cycle." Mol Biochem Parasitol **49**(1): 119-131.
- Bouchaud, O., M. Cot, et al. (2005). "Do African immigrants living in France have long-term malarial immunity?" Am J Trop Med Hyg **72**(1): 21-25.
- Bouharoun-Tayoun, H., P. Attanath, et al. (1990). "Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes." J Exp Med **172**: 1633 - 1641.
- Bouharoun-Tayoun, H., C. Oeuvray, et al. (1995). "Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages." J Exp Med **182**(2): 409-418.
- Bull, P. C. and K. Marsh (2002). "The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria." Trends in Microbiology **10**(2): 55-58.
- Carvalho, L. J., C. T. Daniel-Ribeiro, et al. (2002). "Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects." Scand J Immunol **56**(4): 327-343.
- Carvalho, L. J. M., F. A. Alves, et al. (2005). "Immunization of Saimiri sciureus Monkeys with a Recombinant Hybrid Protein Derived from the Plasmodium falciparum Antigen Glutamate-Rich Protein and Merozoite Surface Protein 3 Can Induce Partial Protection with Freund and Montanide ISA720 Adjuvants." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **12**(2): 242-248.
- Chumpitazi, B. F., J. P. Lepers, et al. (1996). "IgG1 and IgG2 antibody responses to Plasmodium falciparum exoantigens correlate inversely and positively, respectively, to the number of malaria attacks." FEMS Immunol Med Microbiol **14**(2-3): 151-158.
- Cohen, S., G. I. Mc, et al. (1961). "Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria." Nature **192**: 733-737.

Literaturverzeichnis

- Cortes, A. (2008). "Switching Plasmodium falciparum genes on and off for erythrocyte invasion." Trends Parasitol **24**(11): 517-524.
- Cox-Singh, J. and B. Singh (2008). "Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance?" Trends in parasitology **24**(9): 406-410.
- Crompton, P. D., S. K. Pierce, et al. (2010). "Advances and challenges in malaria vaccine development." J Clin Invest **120**(12): 4168-4178.
- Dal-Bianco, M. P., K. B. Koster, et al. (2007). "High Prevalence of Asymptomatic Plasmodium falciparum Infection in Gabonese Adults." Am J Trop Med Hyg **77**(5): 939-942.
- de Stricker, K., J. Vuust, et al. (2000). "Conservation and heterogeneity of the glutamate-rich protein (GLURP) among field isolates and laboratory lines of Plasmodium falciparum." Mol Biochem Parasitol **111**(1): 123-130.
- Dicko, A., I. Sagara, et al. (2008). "Phase 1 study of a combination AMA1 blood stage malaria vaccine in Malian children." PLoS One **3**(2): 0001563.
- Dodoo, D., M. Theisen, et al. (2000). "Naturally Acquired Antibodies to the Glutamate-Rich Protein Are Associated with Protection against Plasmodium falciparum Malaria." The Journal of Infectious Diseases **181**(3): 1202-1205.
- Doolan, D. L., M. Sedegah, et al. (1996). "Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity." The Journal of Experimental Medicine **183**(4): 1739-1746.
- Edozien, J. C., H. M. Gilles, et al. (1962). "Adult and cord-blood gamma-globulin and Immunity to Malaria in Nigerians." The Lancet **280**(7263): 951-955.
- Ellis, R. D., Y. Wu, et al. (2012). "Phase 1 study in malaria naive adults of BSAM2/Alhydrogel(R)+CPG 7909, a blood stage vaccine against P. falciparum malaria." PLoS One **7**(10): 4.
- Engvall, E. and P. Perlmann (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-874.
- Esen, M., P. G. Kremsner, et al. (2009). "Safety and immunogenicity of GMZ2 -- a MSP3-GLURP fusion protein malaria vaccine candidate." Vaccine **27**(49): 6862-6868.

Literaturverzeichnis

- Fandeur, T., O. Mercereau-Puijalon, et al. (1996). "Plasmodium falciparum: genetic diversity of several strains infectious for the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*)." Exp Parasitol **84**(1): 1-15.
- Ferreira, A., I. Marguti, et al. (2011). "Sickle hemoglobin confers tolerance to Plasmodium infection." Cell **145**(3): 398-409.
- Fischer, P. R. and P. Boone (1998). "Short report: severe malaria associated with blood group." Am J Trop Med Hyg **58**(1): 122-123.
- Flint, J., R. M. Harding, et al. (1993). "The population genetics of the haemoglobinopathies." Baillieres Clin Haematol **6**(1): 215-262.
- Fowkes, F. J., S. J. Allen, et al. (2008). "Increased microerythrocyte count in homozygous alpha(+)-thalassaemia contributes to protection against severe malarial anaemia." PLoS Med **5**(3): 0050056.
- Good, M. F. and D. L. Doolan (1999). "Immune effector mechanisms in malaria." Current Opinion in Immunology **11**(4): 412-419.
- Greenwood, B. M. (1987). "Asymptomatic malaria infections -- Do they matter?" Parasitology Today **3**(7): 206-214.
- Guindo, A., R. M. Fairhurst, et al. (2007). "X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria." PLoS Med **4**(3).
- Gupta, R. K. (1998). "Aluminum compounds as vaccine adjuvants." Advanced Drug Delivery Reviews **32**(3): 155-172.
- Gupta, S., R. W. Snow, et al. (1999). "Immunity to non-cerebral severe malaria is acquired after one or two infections." Nat Med **5**(3): 340-343.
- Hamblin, M. T. and A. Di Rienzo (2000). "Detection of the signature of natural selection in humans: evidence from the Duffy blood group locus." Am J Hum Genet **66**(5): 1669-1679.
- Herold (2006). Innere Medizin, Dr. Gerd Herold.
- Hisaeda, H., A. Saul, et al. (2002). "Merozoite Surface Protein 3 and Protection against Malaria in *Aotus nancymai* Monkeys." The Journal of Infectious Diseases **185**(5): 657-664.

Literaturverzeichnis

- Holder, A. A., M. J. Blackman, et al. (1992). "A malaria merozoite surface protein (MSP1)-structure, processing and function." Mem Inst Oswaldo Cruz **3**: 37-42.
- Hutton, G. and F. Tediosi (2006). "The costs of introducing a malaria vaccine through the expanded program on immunization in Tanzania." Am J Trop Med Hyg **75**(2 Suppl): 119-130.
- Jepsen, M. P., P. S. Jogdand, et al. (2013). "The malaria vaccine candidate GMZ2 elicits functional antibodies in individuals from malaria endemic and non-endemic areas." J Infect Dis **208**(3): 479-488.
- Jepsen, S. and N. H. Axelsen (1980). "Antigens and antibodies in Plasmodium falciparum malaria studied by immunoelectrophoretic methods." Acta Pathol Microbiol Scand [C] **88**(5): 263-270.
- Khusmith, S. and P. Druilhe (1983). "Cooperation between antibodies and monocytes that inhibit in vitro proliferation of Plasmodium falciparum." Infect. Immun. **41**(1): 219-223.
- Knobloch, J. (2002). Malaria - Grundlagen und klinische Praxis.
- Lang, W. (2000). Tropenmedizin in Klinik und Praxis. Stuttgart.
- Lell, B., J. r. May, et al. (1999). "The Role of Red Blood Cell Polymorphisms in Resistance and Susceptibility to Malaria." Clinical Infectious Diseases **28**(4): 794-799.
- Lusingu, J. P., S. Gesase, et al. (2009). "Satisfactory safety and immunogenicity of MSP3 malaria vaccine candidate in Tanzanian children aged 12-24 months." Malaria journal **8**(163): 1475-2875.
- Malkin, E., J. Hu, et al. (2008). "A phase 1 trial of PfCP2.9: an AMA1/MSP1 chimeric recombinant protein vaccine for Plasmodium falciparum malaria." Vaccine **26**(52): 6864-6873.
- McGuire, W., J. C. Knight, et al. (1999). "Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles." J Infect Dis **179**(1): 287-290.
- Menard, D., C. Barnadas, et al. (2010). "Plasmodium vivax clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(13): 5967-5971.

Literaturverzeichnis

- Meraldi, V., I. Nebié, et al. (2004). "Natural antibody response to Plasmodium falciparum Exp-1, MSP-3 and GLURP long synthetic peptides and association with protection." Parasite Immunology **26**(6-7): 265-272.
- Missinou, M. A., B. Lell, et al. (2003). "Uncommon asymptomatic Plasmodium falciparum infections in Gabonese children." Clin Infect Dis **36**(9): 1198-1202.
- Moorthy, V. S., M. F. Good, et al. (2004). "Malaria vaccine developments." Lancet **363**(9403): 150-156.
- Murray, C. J. L., L. C. Rosenfeld, et al. (2012). "Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis." The Lancet **379**(9814): 413-431.
- Naik, R. S., O. H. Branch, et al. (2000). "Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Plasmodium falciparum." The Journal of Experimental Medicine **192**(11): 1563-1576.
- Nebie, I., A. Diarra, et al. (2008). "Humoral Responses to Plasmodium falciparum Blood-Stage Antigens and Association with Incidence of Clinical Malaria in Children Living in an Area of Seasonal Malaria Transmission in Burkina Faso, West Africa." Infect. Immun. **76**(2): 759-766.
- Nussenzweig, R. S., J. Vanderberg, et al. (1967). "Protective Immunity produced by the Injection of X-irradiated Sporozoites of Plasmodium berghei." Nature **216**(5111): 160-162.
- Oeuvray, C., H. Bouharoun-Tayoun, et al. (1994). "Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote Plasmodium falciparum killing by cooperation with blood monocytes." Blood **84**(5): 1594-1602.
- Oeuvray, C., M. Theisen, et al. (2000). "Cytophilic immunoglobulin responses to Plasmodium falciparum glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal." Infect Immun **68**(5): 2617-2620.
- Ogutu, B. R., O. J. Apollo, et al. (2009). "Blood stage malaria vaccine eliciting high antigen-specific antibody concentrations confers no protection to young children in Western Kenya." PLoS One **4**(3): 5.
- Olotu, A., J. Lusingu, et al. (2011). "Efficacy of RTS,S/AS01E malaria vaccine and exploratory analysis on anti-circumsporozoite antibody titres and

protection in children aged 5-17 months in Kenya and Tanzania: a randomised controlled trial." Lancet Infect Dis **11**(2): 102-109.

Pasvol, G. (2006). "Does alpha+-thalassaemia protect against malaria?" PLoS Med **3**(5): 9.

Planche, T., S. Krishna, et al. (2001). "Comparison of methods for the rapid laboratory assessment of children with malaria." Am J Trop Med Hyg **65**(5): 599-602.

Polley, S. D., K. K. Tetteh, et al. (2007). "Plasmodium falciparum merozoite surface protein 3 is a target of allele-specific immunity and alleles are maintained by natural selection." J Infect Dis **195**(2): 279-287.

Ryan, J. R., J. A. Stoute, et al. (2006). "Evidence for transmission of Plasmodium vivax among a duffy antigen negative population in Western Kenya." Am J Trop Med Hyg **75**(4): 575-581.

Sabchareon, A., T. Burnouf, et al. (1991). "Parasitologic and clinical human response to immunoglobulin administration in falciparum malaria." Am J Trop Med Hyg **45**(3): 297-308.

Sachs, J. and P. Malaney (2002). "The economic and social burden of malaria." Nature **415**(6872): 680-685.

Sagara, I., A. Dicko, et al. (2009). "A randomized controlled phase 2 trial of the blood stage AMA1-C1/Alhydrogel malaria vaccine in children in Mali." Vaccine **27**(23): 3090-3098.

Schellenberg, D. M., C. J. Acosta, et al. (1999). "Safety in infants of SPf66, a synthetic malaria vaccine, delivered alongside the EPI." Trop Med Int Health **4**(5): 377-382.

Schwartz, L., G. V. Brown, et al. (2012). "A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table." Malaria journal **11**(11): 1475-2875.

Singh, B., L. K. Sung, et al. (2004). "A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings." The Lancet **363**(9414): 1017-1024.

Singh, M. and D. T. O'Hagan (2002). "Recent Advances in Vaccine Adjuvants." Pharmaceutical Research **19**(6): 715-728.

- Singh, S., S. Soe, et al. (2004). "Identification of a Conserved Region of *Plasmodium falciparum* MSP3 Targeted by Biologically Active Antibodies to Improve Vaccine Design." *The Journal of Infectious Diseases* **190**(5): 1010-1018.
- Singh, S., S. Soe, et al. (2009). "A conserved multi-gene family induces cross-reactive antibodies effective in defense against *Plasmodium falciparum*." *PLoS One* **4**(4): 30.
- Sirima, S. B., I. Nebie, et al. (2007). "Safety and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 long synthetic peptide (MSP3-LSP) malaria vaccine in healthy, semi-immune adult males in Burkina Faso, West Africa." *Vaccine* **25**(14): 2723-2732.
- Sirima, S. B., A. B. Tiono, et al. (2009). "Safety and Immunogenicity of the Malaria Vaccine Candidate MSP3 Long Synthetic Peptide in 12-24 Months-Old Burkinabe Children." *PLoS ONE* **4**(10): e7549.
- Snounou, G., S. Viriyakosol, et al. (1993). "Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections." *Molecular and Biochemical Parasitology* **58**(2): 283-292.
- Snow, R. W., M. Craig, et al. (1999). "Estimating mortality, morbidity and disability due to malaria among Africa's non-pregnant population." *Bull World Health Organ* **77**(8): 624-640.
- Snow, R. W., C. A. Guerra, et al. (2005). "The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria." *Nature* **434**(7030): 214-217.
- Snow, R. W., J. A. Omumbo, et al. (1997). "Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa." *The Lancet* **349**(9066): 1650-1654.
- Soe, S., M. Theisen, et al. (2004). "Association between protection against clinical malaria and antibodies to merozoite surface antigens in an area of hyperendemicity in Myanmar: complementarity between responses to merozoite surface protein 3 and the 220-kilodalton glutamate-rich protein." *Infect Immun* **72**(1): 247-252.
- Stoute, J. A., K. E. Kester, et al. (1998). "Long-Term Efficacy and Immune Responses following Immunization with the RTS,S Malaria Vaccine." *The Journal of Infectious Diseases* **178**(4): 1139-1144.

Literaturverzeichnis

- Sylla, E. H., J. F. Kun, et al. (2000). "Mosquito distribution and entomological inoculation rates in three malaria-endemic areas in Gabon." Trans R Soc Trop Med Hyg **94**(6): 652-656.
- Sylla, E. H., B. Lell, et al. (2001). "Plasmodium falciparum transmission intensity and infection rates in children in Gabon." Parasitol Res **87**(7): 530-533.
- Takala, S. L. and C. V. Plowe (2009). "Genetic diversity and malaria vaccine design, testing and efficacy: preventing and overcoming 'vaccine resistant malaria'." Parasite Immunol **31**(9): 560-573.
- Tamborrini, M., S. A. Stoffel, et al. (2011). "Immunogenicity of a virosomally-formulated Plasmodium falciparum GLURP-MSP3 chimeric protein-based malaria vaccine candidate in comparison to adjuvanted formulations." Malaria journal **10**: 359.
- Tarleton, R. L. (2005). "Microreview: New approaches in vaccine development for parasitic infections." Cellular Microbiology **7**(10): 1379-1386.
- Theisen, M., D. Dodo, et al. (2001). "Selection of glutamate-rich protein long synthetic peptides for vaccine development: antigenicity and relationship with clinical protection and immunogenicity." Infect Immun **69**(9): 5223-5229.
- Theisen, M., S. Soe, et al. (2004). "A Plasmodium falciparum GLURP-MSP3 chimeric protein; expression in Lactococcus lactis, immunogenicity and induction of biologically active antibodies." Vaccine **22**(9-10): 1188-1198.
- Theisen, M., S. Soe, et al. (1998). "The glutamate-rich protein (GLURP) of Plasmodium falciparum is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro." Infect Immun **66**(1): 11-17.
- Theisen, M., J. Vuust, et al. (1995). "Antigenicity and immunogenicity of recombinant glutamate-rich protein of Plasmodium falciparum expressed in Escherichia coli." Clin. Diagn. Lab. Immunol. **2**(1): 30-34.
- Thera, M. A., O. K. Doumbo, et al. (2011). "A field trial to assess a blood-stage malaria vaccine." N Engl J Med **365**(11): 1004-1013.
- Weatherall, D. J., L. H. Miller, et al. (2002). "Malaria and the red cell." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 35-57.
- WHO (2011). World Malaria Report 2011.

Literaturverzeichnis

Wildling, E., S. Winkler, et al. (1995). "Malaria epidemiology in the province of Moyen Ogoov, Gabon." Trop Med Parasitol **46**(2): 77-82.

Williams, T. N. (2006). "Human red blood cell polymorphisms and malaria." Curr Opin Microbiol **9**(4): 388-394.

Erklärung zum Eigenanteil

Die der Arbeit zugrunde liegende Studie ist eine Gemeinschaftsarbeit des Instituts für Tropenmedizin in Tübingen und der *Medical Research Unit of the Albert Schweitzer Hospital (MRU)* (jetzt: *Centre de Recherches Médicales de Lambaréné, CERMEL*) mit Unterstützung durch den *African Malaria Network Trust (Amanet)* und die *European Malaria Vaccine Initiative (EMVI)* (jetzt: *European Vaccine Initiative, EVI*).

Verantwortlich für die Konzeption des Gesamtprojekts und die Betreuung der Studie waren Prof. Dr. Peter G. Kremsner, Dr. Saadou Issifou, Dr. Benjamin Mordmüller und Mitarbeiter von EMVI. Die Verfassung der Veröffentlichung erfolgte durch alle Autoren unter der Leitung von Dr. Benjamin Mordmüller.

Die Rekrutierung der Teilnehmer sowie die klinische Untersuchungen während und nach Beendigung der Studie wurden hauptsächlich von Dr. Katja Szywon, Dr. Benedikt Greutelaers und Dr. Raymund Mürbeth durchgeführt.

Die immunologischen Tests wurden von Carolin Treut unter Anleitung von Dr. Meral Esen vorgenommen. Die Laborarbeit umfasste die Verarbeitung und Konservierung der entnommenen Proben sowie die Durchführung der antikörperbasierten Nachweisverfahren (verschiedene ELISA- Protokolle).

Die Datenauswertung erfolgte durch Carolin Treut unter Anleitung von Dr. Benjamin Mordmüller, hier wurden R in Version 2.15-1 und Tinn-R verwendet.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde von Carolin Treut alleine verfasst. Tabelle 2 wurde bereits in der englischen Publikation „Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria-exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon“ veröffentlicht.

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht

Mordmüller B., Szywon K., Greutelaers B., Esen M., Mewono L., Treut C., Mürbeth R. E., Chilengi R., Noor R., Kilama W. L., Imoukhuede E. B., Imbault N., Leroy O., Theisen M., Jepsen S., Milligan P., Fendel R., Kremsner P. G., Issifou S. (2010). "Safety and immunogenicity of the malaria vaccine candidate GMZ2 in malaria exposed, adult individuals from Lambaréné, Gabon." Vaccine **28**(41): 6698-703.

Danksagung

Ich danke...

... Professor Dr. Peter G. Kremsner für die freundliche Überlassung des Themas und erfahrene Leitung des gesamte Projekts,

Dr. Meral Esen und Dr. Benjamin Mordmüller für die nette und kompetente Betreuung während der gesamten Zeit,

allen Laborkollegen und -kolleginnen für die Hilfsbereitschaft und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre,

den Mitarbeitern des Albert-Schweitzer-Hospitals in Lambaréné für eine wunderbare Zeit und großartige Zusammenarbeit,

allen Teilnehmern der Studie für ihr Vertrauen in uns,

dem IZKF-Promotionskolleg Molekulare Medizin für die finanzielle Förderung und inhaltliche Begleitung dieser Arbeit,

Dr. Simon Müller für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung,

meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich in allen meinen Vorhaben unterstützt haben.