

Università degli Studi di Genova
Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche
Dipartimento di Farmacia
Corso di Laurea in Farmacia

Tesi di Laurea

**Farmaci e composti in grado di bloccare
la trasmissione della malaria**

Relatore:

Prof. Bruno Tasso

Candidata:

Federica Cavanna

Anno accademico 2019-2020

INDICE

Introduzione	1
1. Attività di blocco della trasmissione dei farmaci antimalarici usati in clinica	8
1.1 Cloroquina	8
1.2 Meflochina	11
1.3 Lumefantrina	13
1.4 Pironaridina	14
1.5 Atovaquone-proguanile	15
1.6 Sulfadossina e pirimetamina	18
1.7 Artemisinina	20
1.7.1 Diidroartemisinina	22
1.7.2 Artemetere	24
1.7.3 Artesunato	26
1.8 Tipi di ACT	27
1.8.1 Artemetere + lumefantrina	28
1.8.2 Artesunato + amodiachina	28
1.8.3 Artesunato + meflochina	29
1.8.4 Artemetere + sulfadossina/pirimetamina	29
1.8.5 Diidroartemisinina + piperachina	30
1.9 Primachina	31
1.10 Tafenochina	33
1.11 Blu di metilene	35
1.12 Arterolano	37
1.13 Bulachina	38
1.14 Doxiciclina	39
2. Potenziale di blocco della trasmissione di candidati farmaci antimalarici in fase di sviluppo clinico	40
2.1 DDD107498 o M5717	40
2.2 Cipargamina	42
2.3 KAF156 (Ganaplacide)	42
2.4 Artefenomel	43
2.5 DSM265	45

2.6	MMV390048	46
2.7	Artemisone	47
2.8	Fosfodomicina	48
2.9	Ferrochina	48
2.10	AQ-13	49
2.11	P218	50
2.12	ACT-451840	51
2.13	Artemisinina-naftochina	51
2.14	(+)-SJ733	52
2.15	PA21A092	53
2.16	Triossachine	53
2.17	Tricostatina A	55
2.18	NPC-1161B	56
2.19	ELQ-300	57
2.20	BRD0608	59
2.21	Decochinato	60
2.22	MEFAS	60
2.23	Epoxomicina e altri inibitori del proteasoma	61
2.24	Tiostrepton	63
2.25	Cicloesimide	65
2.26	Puromicina	66
2.27	Inibitori della proteasi dell'HIV	67
2.28	Coloranti sintetici	69
2.29	β -Artelinato di sodio	70
2.30	$\alpha\beta$ -Arteetere	70
2.31	4-(1 <i>H</i>)-Chinoloni e tetraidroacridoni	70
2.32	Riboflavina	73
2.33	Neem	74
2.34	MMV malaria box	76
2.35	Molecole varie	79
3.	Endectocidi: una classe completamente nuova di agenti antiparassitari	81
4.	Prospettive	84
	Bibliografia	87

Introduzione

La malaria, una delle malattie tropicali più devastanti, è causata dai parassiti del genere *Plasmodium*. Tra le diverse specie di parassiti della malaria che infettano l'uomo, il *Plasmodium falciparum* è responsabile della forma più letale, spesso associata a gravi complicazioni come la malaria cerebrale, l'epatomegalia, la splenomegalia, l'insufficienza epatica e renale e l'anemia grave [1-4], arrecando la massima mortalità e morbilità [5].

Anche dopo aver ottenuto un notevole successo nella riduzione della mortalità e della morbilità, la malaria rimane un problema sanitario globale, soprattutto nelle aree tropicali e subtropicali del mondo [6].

Una delle ragioni principali per cui non si riesce a eradicare questa malattia è la complessità del ciclo di vita del parassita che alterna due diversi ospiti e coinvolge numerosi stadi parassitari distinti dal punto di vista proteomico e morfologico (Figura 1).

Quando una zanzara anofele femmina infetta preleva un pasto di sangue dall'ospite umano, introduce gli sporozoiti (forme parassitarie aploidi competenti per l'invasione delle cellule epatiche) negli spazi extravascolari all'interno del derma dell'ospite. Dal sito della puntura di zanzara, gli sporozoiti usano la loro motilità per trovare la strada verso il flusso sanguigno, tramite il quale alla fine raggiungono il fegato e invadono gli epatociti, in cui completano la crescita e lo sviluppo eso-eritrocitario asessuato. Dopo aver subito lo sviluppo pre-eritrocitario all'interno degli epatociti, decine di migliaia di merozoiti per cellula epatica vengono rilasciati nella circolazione sanguigna dell'ospite. I merozoiti invadono gli eritrociti e iniziano il ciclo eritrocitario asessuato nutrendosi dell'emoglobina dell'eritrocita, che funge da fonte proteica per i parassiti.

Dopo il completamento di un ciclo eritrocitario asessuato (merozoiti – anelli – trofozoiti – schizonti - merozoiti), i parassiti rilasciati nella circolazione sanguigna invadono altri

eritrociti per iniziare un altro ciclo asessuato. Questi parassiti in fase asessuata sono i responsabili dei sintomi della malaria.

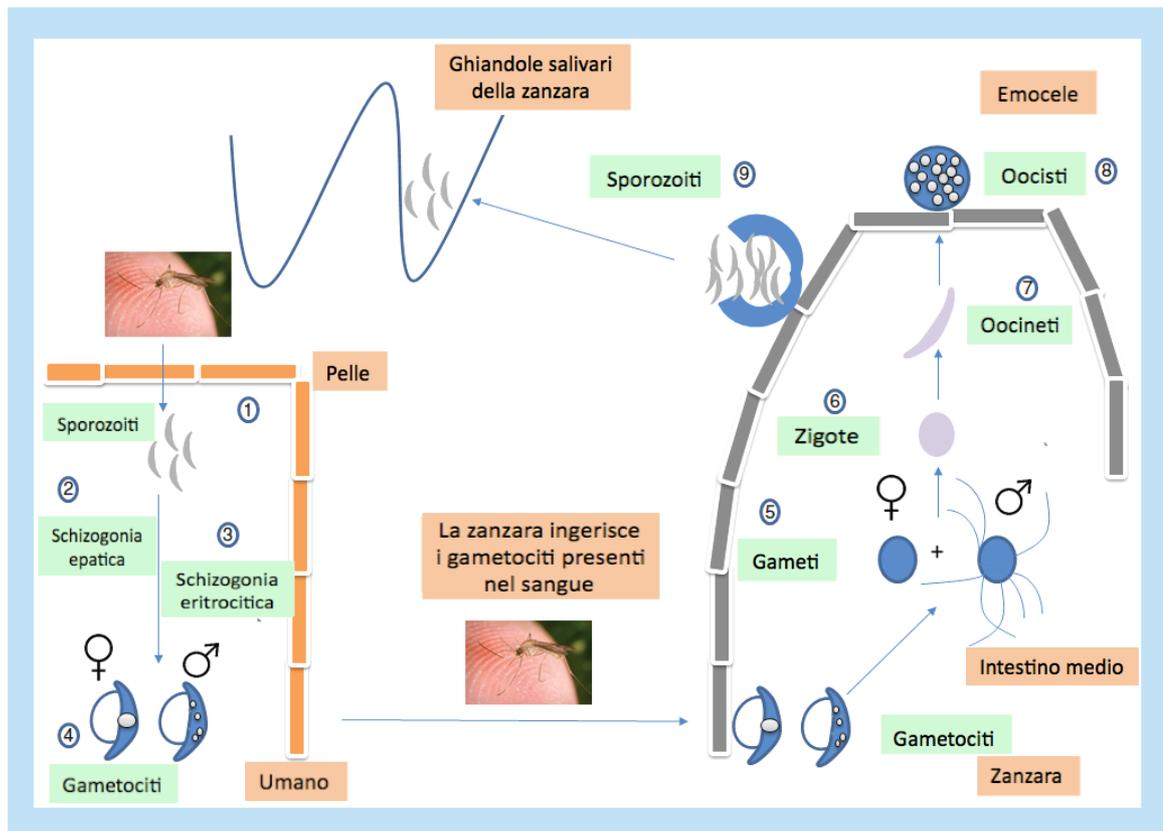


Figura 1. Ciclo di vita del parassita della malaria *Plasmodium falciparum*, con particolare attenzione sui gametociti e sulle fasi sporogoniche (1-9). [Tratto da I. Wadi et al., Fut. Med. Chem., 10, 2018, 2619-2639]

La moltiplicazione asessuata di questi parassiti continua fino a quando non si differenziano in forme aploidi sessualmente dimorfe conosciute come gametociti [7].

I gametociti subiscono la maturazione attraverso cinque stadi distinti per svilupparsi infine nelle forme mature maschili e femminili. I gametociti maschili e femminili costituiscono lo stadio parassitario terminale all'interno dell'ospite vertebrato e vengono assunti dall'ospite definitivo, la zanzara, durante un pasto di sangue, entrando così nell'intestino medio della zanzara anofele femmina [8-10].

All'interno dell'intestino medio della zanzara, questi parassiti subiscono un ciclo distinto di crescita e moltiplicazione noto come ciclo sporogonico o sporogonia. In breve, i gametociti maschili e femminili subiscono la gametogenesi per formare gameti maschili e femminili,

che si fondono a formare uno zigote. Lo zigote matura ulteriormente per formare una forma molto allungata e mobile nota come oocinete. L'ocinete invade la parete dell'intestino medio della zanzara ed emerge dal lato basale (verso l'emocele) per stabilirsi infine sotto la lamina basale e svilupparsi in un ovocita multinucleato. L'ocinete matura gradualmente e alla fine si rompe per rilasciare migliaia di sporozoi nell'emolinfa. Gli sporozoi in questa fase possiedono una certa motilità e migrano attraverso l'emolinfa nelle ghiandole salivari, dove subiscono la maturazione per perpetuare il ciclo vitale quando la stessa zanzara assume un altro pasto di sangue [8-11].

Questo complesso ciclo di vita all'interno di due diversi ospiti, è ciò che rende il parassita molto difficile da colpire con gli interventi attualmente disponibili.

Sebbene gli approcci di gestione integrata dei vettori (Integrated Vector Management - IVM) stiano guidando le campagne di eliminazione della malaria, la sua completa eradicazione rimane ancora una sfida formidabile [11,12]. Una delle principali ragioni per cui non si riesce ad eliminare la malaria dai paesi endemici dell'Africa subsahariana è la continua emergenza e la rapida diffusione della resistenza dei parassiti e dei loro vettori agli antimalarici e agli insetticidi comunemente usati.

Diverse strategie di controllo della malaria, come l'uso di farmaci antimalarici standard (per la profilassi, il trattamento e il blocco della trasmissione) e misure di prevenzione e controllo non terapeutiche (zanzariere trattate con insetticidi, irrorazione di residui interni e altre misure di controllo dei vettori) si sono rivelate insufficienti per realizzare l'obiettivo ancora lontano della completa eliminazione della malaria.

Per questo motivo, i ricercatori stanno elaborando nuovi farmaci antimalarici per colpire separatamente i singoli stadi del parassita: stadi epatici [13,14], stadi ematici asessuati [15-19] e gametociti [20-22] o per colpire contemporaneamente più stadi parassitari [23-26].

Interrompere la trasmissione del parassita dall'uomo alla zanzara e/o viceversa è uno dei passi più cruciali per liberarsi di questa malattia mortale. Considerando il fatto che un vaccino antimalarico efficace è ancora lontano dal mercato [27], una parte fondamentale delle ricerche è rappresentata dall'interruzione del ciclo di vita con farmaci che bloccano la trasmissione [11,28].

Il bersaglio principale dei comuni farmaci che bloccano la trasmissione è rappresentato dai gametociti maturi presenti nel sangue umano [29-32]. I gametociti possono essere direttamente colpiti dai farmaci grazie alla loro presenza nel sangue umano. I gametociti maturano attraverso cinque stadi [33-35] accompagnati da una sovraregolazione di circa 200 geni specifici (stadi I-V) [36].

La maggior parte degli attuali farmaci antimalarici sono attivi contro gli stadi di sviluppo/iniziali (stadi I-III) dei gametociti, ma sono inattivi contro gli stadi maturi (stadi IV-V). Le fasi I-III, note complessivamente come fasi iniziali dello sviluppo dei gametociti, sono caratterizzate da processi a rapida metabolizzazione e quindi suscettibili alla maggior parte dei comuni farmaci schizonticidi, mentre le fasi mature (soprattutto la fase V) sono a lenta metabolizzazione e refrattarie ai comuni farmaci schizonticidi.

La primachina è l'unico farmaco, raccomandato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), in grado di bloccare la trasmissione [37] con potenziale gametocitocida contro lo stadio maturo ed è anche indicato per l'uso insieme alla terapia combinata con artemisinina (ACT) [38]. Tuttavia, la primachina non può essere ampiamente utilizzata a causa dei suoi problemi di tossicità emolitica in individui con deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD).[39-41] Attualmente è in corso un'ampia ricerca per scoprire nuovi farmaci che possano efficacemente colpire questi stadi sessuati del parassita della malaria [42-48].

Sono attualmente disponibili molti test di screening ad alto rendimento per la valutazione dell'attività gametocitocida [11]. Alcuni di questi saggi si basano sulla misurazione del

metabolismo del parassita che agisce come marcatore di vitalità e possono essere misurati utilizzando diversi approcci, tra cui la valutazione di 1) attività pLDH [44,49] e 2) intensità del segnale di bioluminescenza [50-52] o del segnale di fluorescenza emesso da una linea di parassiti transgenici che esprime un tipo di gene reporter fluorescente come GFP [53] o GFP-luciferasi [43,48,50,54]. A questo scopo possono essere utilizzati anche vari coloranti ad ossido-riduzione (Alamar Blue, Presto Blue) [50,55,56]. Altri approcci per la valutazione dell'attività di blocco della trasmissione comportano l'uso di test di vitalità funzionale che misurano la capacità dei composti di inibire la gametogenesi maschile e/o femminile [42,45,57-59]. Sebbene gli approcci sopra descritti siano estremamente utili nell'identificazione dei risultati e nello screening iniziale dei composti, la misurazione della reale attività di blocco della trasmissione è fornita dai saggi standard di alimentazione a membrana (SMFA) [44,46], che si sovrappongono maggiormente al ciclo di vita del parassita rispetto a qualsiasi altro saggio per l'attività gametocitocida o per l'inibizione della gametogenesi [11]. Sono utilizzate molte varianti dei saggi SMFA, tra cui il più usato SMFA "indiretto" (prevede l'incubazione dei gametociti con i composti, seguita dall'alimentazione delle zanzare attraverso un alimentatore a membrana), l'SMFA "washout" indiretto (comprende una fase di lavaggio supplementare per rimuovere i composti in prova prima dell'alimentazione delle zanzare) e un SMFA "diretto" (prevede l'assunzione dei gametociti e della miscela di composti di prova da parte delle zanzare senza precedente incubazione).

Oltre ad uccidere i gametociti, la trasmissione della malaria può essere interrotta prendendo di mira anche altri stadi parassitari, noti collettivamente come stadi sporogonici (gameti, zigoti, oocineti, oocisti e sporozoit), [21,60-63] che sono presenti all'interno della zanzara. Anche questi stadi all'interno della zanzara sono attraenti bersagli per i farmaci. Sebbene gli antigeni di questi stadi sporogonici siano stati ampiamente studiati per mettere a punto alcuni vaccini che possano bloccare la trasmissione [64,65], questi stessi stadi sono

anche sotto studio come bersagli farmacologici [11]. Ci possono essere numerose ragioni per cui questi stadi non ricevono un'adeguata attenzione come bersaglio dei farmaci antimalarici, nonostante siano metabolicamente più attivi dei gametociti maturi. Per esempio, la modalità di somministrazione del farmaco agli stadi sporogonici del parassita è indiretta a causa della presenza di questi stadi, non nel flusso sanguigno dell'ospite, ma all'interno del corpo della zanzara. In altre parole, se un farmaco deve mirare agli stadi sporogonici all'interno della zanzara, deve essere presente nel flusso sanguigno dell'ospite ad una concentrazione superiore a quella necessaria per uccidere questi parassiti all'interno della zanzara e per un periodo di tempo sufficiente [11]. È quasi impossibile, con i metodi attualmente disponibili, studiare la complessa dinamica che comporta l'interazione tra i vari fattori legati all'ospite e quelli legati al vettore, all'interno del vettore, e stimare con precisione questa concentrazione. Per essere più precisi, la concentrazione del farmaco all'interno della zanzara dipende da vari fattori come il comportamento alimentare della zanzara, la concentrazione del farmaco all'interno dell'ospite durante il periodo della puntura della zanzara e la quantità di farmaco ingerito nel pasto di sangue, l'effetto degli enzimi disintossicanti della zanzara sul farmaco ingerito ed altri ancora; poiché questi fattori sono al di fuori del nostro controllo, sono difficili da studiare. Questo, insieme alla mancanza di metodi standardizzati per lo studio della farmacocinetica e della farmacodinamica dei farmaci all'interno delle zanzare, rende estremamente difficile sviluppare farmaci mirati per le fasi sporogoniche [11]. Tuttavia, i farmaci che possono efficacemente colpire questi stadi sporogonici hanno il potenziale per ritagliarsi una propria nicchia nelle varie strategie di blocco della trasmissione e agire come farmaci antimalarici del futuro. In una parte di questa Tesi, sono trattate le proprietà gametocitocide e sporontocide degli attuali farmaci antimalarici e di candidati farmaci antimalarici in sviluppo clinico. Un punto da considerare è che molti farmaci hanno mostrato risultati coerenti in vari studi, mentre altri hanno mostrato ampie variazioni di

potenza. Ci possono essere varie ragioni per tali variazioni e in alcuni casi si è cercato di discutere le ragioni delle incoerenze osservate negli studi [50]. In generale, la variazione nei saggi gametocitocidi ad alto rendimento e nei saggi di inibizione della gametogenesi è in parte attribuibile alle differenze intrinseche nei parametri del saggio, come i tipi di saggio/letture, la popolazione di gametociti (ceppo, numero, rapporto tra i sessi e stadio di maturità), il tempo di incubazione e l'uso di AlbuMAX II o di siero umano, tra gli altri. Inoltre, i farmaci (ad esempio, la primachina) che agiscono tramite i metaboliti attivi si rivelano relativamente meno efficaci *in vitro* rispetto al modello *in vivo* di laboratorio o agli studi clinici. Questi test ad alto rendimento, anche se estremamente variabili, possono fornire informazioni sufficienti per differenziare i composti attivi dagli inattivi, ma non sempre consentono un confronto diretto tra i diversi composti saggiati. Allo stesso modo, le variazioni di potenza osservate nei saggi di alimentazione delle zanzare sono in parte attribuibili all'uso di due diversi parametri di lettura - intensità delle oocisti (numero di oocisti visibili per zanzara) e prevalenza delle oocisti (proporzione di zanzare che ospitano oocisti). Mentre si utilizza la prevalenza delle oocisti come parametro, le ricerche spesso ignorano il numero medio di oocisti/zanzara per gli esperimenti di alimentazione. Inoltre, questo parametro è diverso per ogni esperimento di alimentazione della zanzara e non vi è alcun mezzo preciso per controllarlo. Questo è rilevante in quanto l'intensità delle oocisti nella popolazione di zanzare infette in laboratorio è superiore rispetto a quella della popolazione di zanzare di tipo selvatico. A causa di questa variabilità, i risultati di potenza per diversi farmaci o per lo stesso farmaco studiato con diversi dosaggi/letture non sono sempre comparabili [11].

Un ultimo punto da considerare è che gli investigatori clinici dovrebbero sempre essere attenti nella progettazione dei loro studi e cauti nel segnalare l'aumento dei parametri relativi ai gametociti - densità dei gametociti nel sangue, durata media della circolazione ematica dei gametociti, prevalenza dei gametociti, per le combinazioni di farmaci che

agiscono principalmente sugli stadi eritrocitari asessuati. La comparsa di gametociti precedentemente sequestrati non deve essere interpretata come una nuova induzione di gametociti. Ciò diventa più rilevante a causa dell'estrema difficoltà di stimare, dalle tecniche attualmente disponibili, la densità dei gametociti sequestrati e l'effetto dei farmaci su questi gametociti sequestrati, i tassi di sequestro dei gametociti in via di sviluppo nei siti di sequestro e di de-sequestro dai siti di sequestro nel sangue dopo aver raggiunto la maturità e la posizione precisa e la distribuzione dei siti di sequestro.

In questa Tesi verrà trattato anche il potenziale di blocco della trasmissione (gametocitocida e sporontocida) di piccole molecole/candidati preclinici che non sono in fase di sviluppo preclinico ma che hanno un potenziale di blocco della trasmissione. L'analisi complessiva delle strutture e delle attività biologiche di questi composti potrebbero aiutare a far progredire le conoscenze sugli antimalarici che bloccano la trasmissione e queste conoscenze possono essere utilizzate per scoprire nuovi punti di partenza per lo sviluppo della prossima generazione di farmaci antimalarici.

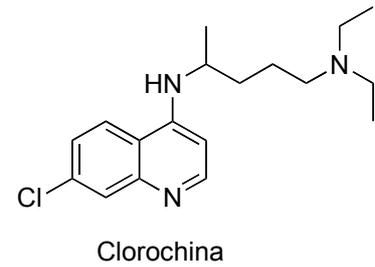
1. Attività di blocco della trasmissione dei farmaci antimalarici usati in clinica

In questa sezione vengono discusse le attività di blocco della trasmissione dei farmaci antimalarici attualmente disponibili per l'uso clinico. In questo ambito per gametociti in fase iniziale/sviluppo si intendono i gametociti di stadio I-III mentre quelli in stadio tardivo/maturo corrispondono agli stadi IV-V.

1.1 Cloroquina

La cloroquina (CQ) è una 4-amminochinolina antimalarica considerata il più economico, il più sicuro e uno dei più efficaci farmaci antimalarici sviluppati, tanto che per molti anni è stato l'antimalarico di prima linea [66] fino a quando ha iniziato ad emergere la resistenza.

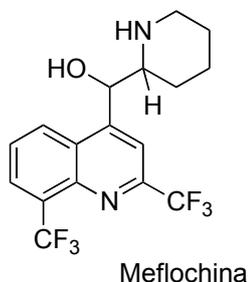
Vari studi *in vitro* hanno descritto la potenza della CQ contro gli stadi iniziali (stadio I-III) dei gametociti di *P. falciparum* (IC_{50} : 96-98 nM [stadio I-II] [67]; 76,7 nM [48]; 300 nM [stadio II-III] [68]), ma la potenza diminuisce non appena i gametociti maturano fino agli stadi IV e V ($IC_{50} > 6,25 \mu\text{M}$ [67]; $> 25 \mu\text{M}$ [45]; 1,1-8,8 μM [44]; 63-70% di attività a 5 μM [46]; $> 2 \mu\text{M}$ [49]; 23,47 μM [51]; $> 20 \mu\text{M}$ [69]; 10,7 μM [68]). La mancanza di sensibilità degli stadi maturi dei gametociti alla cloroquina è attribuita alla sua modalità d'azione che comporta l'inibizione della formazione di emozoina e la degradazione dell'eme mediata dal glutazione (GSH) [63,70], reazioni metaboliche assenti nei gametociti maturi [35,51]. Inoltre, la CQ non possiede una notevole potenza contro gli stadi sporogonici di *P. falciparum* (30% di inibizione della formazione di oocisti a 5 μM (SMFA diretto) [46]) o *P. berghei* (~0% di inibizione della formazione di oocinetti, formazione di oocisti e maturazione di oocisti a 10 μM [71]; 25-49% di inibizione della formazione di oocisti di *P. berghei* a 10 μM [72]). La cloroquina migliora la gametocitogenesi *in vitro* [63,73,74] e l'exflagellazione di almeno il 20% [63,72] e ha dimostrato un aumento significativo della gametocitemia di *P. chaubaudi* nei topi quando somministrata a dosi subterapeutiche rispetto ai controlli non trattati [74]. Butcher et al. hanno descritto che i sieri ottenuti da volontari trattati con CQ erano responsabili di un aumento della produzione di oocisti nelle zanzare nutrite con i gametociti di *P. falciparum* e *P. berghei* [63]. Tuttavia, non è stato osservato alcun aumento significativo della produzione di oocisti all'interno delle zanzare a seguito dell'aggiunta diretta di cloroquina al sangue infetto [63]. Gli studi clinici in Mozambico [75], Gambia [76-78] e Camerun [79] non hanno riportato alcun cambiamento significativo nella gametocitemia dopo il trattamento con CQ. Tuttavia, Drakeley et al. hanno riscontrato che i pazienti affetti da malaria dopo trattamento con CQ mostrano una densità di gametociti più elevata, una maggiore prevalenza di gametociti e una maggiore



durata della loro circolazione ematica rispetto ai pazienti trattati con la combinazione artesunato/CQ [76]. Questo studio, condotto in bambini del Gambia, ha dimostrato che la monoterapia con CQ è insufficiente per uccidere i gametociti, e una co-somministrazione con un derivato dell'artemisinina, come l'artesunato, è necessaria per causare un significativo effetto gametocitocida. In questo caso, la somministrazione di una combinazione di CQ (25 mg/kg) e tre dosi di artesunato (4 mg/kg; CQ/3AS) è associata a una durata significativamente inferiore della circolazione dei gametociti rispetto al gruppo trattato con la monoterapia di CQ (5,2 vs 1,5 giorni; CQ vs CQ/3AS). Il gruppo CQ/3AS è associato ad una prevalenza di gametociti significativamente più bassa (7° giorno: 12,7%, 14° giorno: 3,7%) e di densità relativamente più bassa (7° giorno: 6,2 gametociti/ μ L, 14° giorno: 5,2 gametociti/ μ L) rispetto al gruppo trattato con sola cloroquina (prevalenza dei gametociti (7° giorno): 43,7%, densità dei gametociti (7° giorno): 62,4 gametociti/ μ L, prevalenza dei gametociti (14° giorno): 32,9%, densità dei gametociti (14° giorno): 21,9 μ L). Il gruppo CQ/3AS è risultato anche associato ad una minore prevalenza di infettività delle zanzare (0,9%) e densità media delle oocisti (0,01) nel 7° giorno di follow-up rispetto al gruppo trattato con cloroquina (prevalenza di infettività delle zanzare: 11,5%, densità media delle oocisti: 0,3). I pazienti che non hanno risposto con successo al trattamento con cloroquina entro 28 giorni dal follow-up sono associati ad una maggiore prevalenza di gametociti (81,4%) rispetto ai pazienti trattati con successo (27,8%). Altri studi hanno riportato che la cloroquina aumenta l'infettività delle zanzare e che promuove anche la diffusione di parassiti resistenti [63,80]. Densità/prevalenza dei gametociti significativamente più alta [81,82], densità/prevalenza delle oocisti [82,83] e maggiori possibilità di infettività delle zanzare [84] sono state osservate nei parassiti resistenti alla CQ rispetto a quelli sensibili.

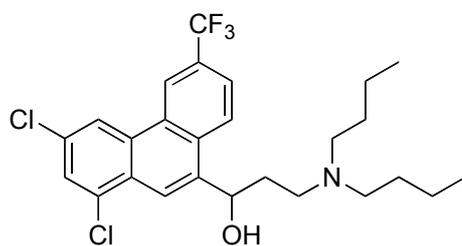
1.2 Meflochina

La meflochina, un derivato della chinolina, non è solo utilizzata come parte di una terapia antimalarica di prima linea insieme all'artesunato, ma anche come farmaco



chemioprolattico dalle persone che viaggiano nelle zone endemiche per la malaria. Come la cloroquina, la meflochina è più potente contro i gametociti di *P. falciparum* di stadio precoce (valori $IC_{50} < 100$ nM) [48,53,67] rispetto agli stadi maturi (IC_{50} : 2,31-3,39 μ M [43]; 7,48 μ M, [45]; > 1 μ M [44]; 0.83 μ M [47]; $< 30\%$ di inibizione della formazione di gameti maschili e femminili a 1 μ M, [58]; 51,45% di inibizione della formazione di gameti maschili a 1 μ M e 34,20% di inibizione della formazione di gameti femminili a 10 μ M [59]; 4,7 μ M [51]; 50-74% di inibizione dell'exflagellazione a 10 μ M [72]). Tuttavia, pochi studi hanno dimostrato una elevata potenza della meflochina contro i gametociti maturi di *P. falciparum* (IC_{50} : 132 nM (solo stadio V) [67]; 100 nM [85]). La ragione esatta di questa discrepanza non è nota, ma, come descritto in precedenza, può essere in parte dovuta alla natura disomogenea di ciascun sistema di saggio, comprese le variazioni del ceppo parassita, il numero di gametociti esposti al farmaco (numero totale e rapporto tra gametociti maschili e femminili), gli stadi dei gametociti esposti al farmaco, il tempo di incubazione, il metodo di rivelazione del saggio e l'uso di siero umano/AlbuMAX II per la coltura *in vitro* [67]. Ad esempio un calo significativo della potenza della meflochina contro i gametociti maturi è stato osservato quando è stato utilizzato siero umano al posto di AlbuMAX II. Sembra plausibile che questa leggera variazione possa aver reso il saggio ipersensibile agli amminoalcoli come la meflochina (IC_{50} : 132 nM nel gruppo AlbuMAX II contro 5,77 μ M nel gruppo con siero umano, per gametociti di stadio V) [67]. Inoltre, alcune proprietà fisico-chimiche dei farmaci, come la scarsa idrosolubilità della meflochina, possono influenzarne la potenza [43]. Infine, come la maggior parte dei farmaci, i gametociti maschili sono più sensibili

alla meflochina rispetto ai gametociti femminili (51,25% di inibizione della formazione dei gameti maschili e 0,31% di inibizione della formazione dei gameti femminili a 1 μM , [59]). Peartey et al. hanno riportato un aumento della gametocitogenesi di *P. falciparum in vitro* dopo il trattamento con meflochina 10 nM [73]. La meflochina non ha alcuna significativa attività sporontocida contro *P. berghei* come dimostrato dalla scarsa (< 25%) inibizione nella formazione di oocineti di *P. berghei* a 10 μM [72]. Ciò è stato confermato anche nel saggio SMFA diretto, in cui la meflochina è risultata inattiva alla concentrazione 5 μM [46]. E' stata osservata una prevalenza di gametociti post-trattamento maggiore del 25% con una dose di 25 mg/kg rispetto alla prevalenza di gametociti dell'11,4% pre-trattamento [86]. Anche in studi precedenti, la meflochina non è stata trovata in possesso di alcun effetto gametocitocida significativo contro *P. falciparum* quando utilizzata singolarmente in singola dose di 750 mg o quando utilizzata in combinazione con sulfadoxina/pirimetamina (750 mg singola dose più tre dosi di 500 mg sulfadoxina/25 mg pirimetamina) [87]. I derivati dell'artemisinina sono risultati superiori alla meflochina e all'alofantrina in termini di riduzione del tempo di circolazione ematica dei gametociti in studi clinici condotti in Thailandia [88]. La meflochina è risultata inferiore all'alofantrina ma superiore alla chinina e alla cloroquina in termini di riduzione della prevalenza post-



Alofantrina

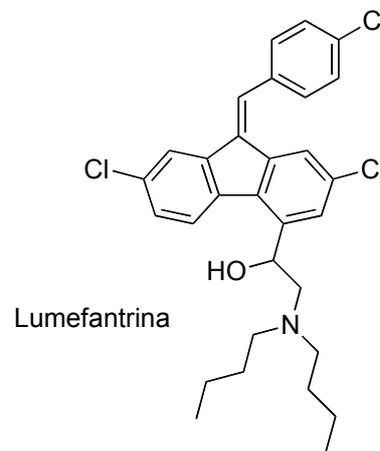
trattamento dei gametociti, come valutato da studi condotti in Thailandia, Gambia e Tanzania (il 3% dei pazienti ha sviluppato gametocitemia con alofantrina, il 6% con meflochina, il 22% con chinina, il 9% con cloroquina) [89]. Infine il

MEFAS, un ibrido derivato dalla meflochina e dall'artesunato e segnalato come schizontocida, è risultato, rispettivamente, 280 volte e 15 volte più efficace della meflochina e dell'artesunato nell'inibire l'attivazione dei gametociti femminili [90].

1.3 Lumefantrina

La lumefantrina è un amminoalcol arilico utilizzato in combinazione con l'artemetere come ACT di prima linea ed è privo di problemi di cardiotoxicità [91] associati all'alofantrina, ora sospesa.

Gli studi hanno confermato l'attività della lumefantrina contro i gametociti di stadio iniziale (IC_{50} : 13-15 nM [67]; 7,82 nM [48]; 107 nM [85]; > 75% di attività a 330 nM [stadio I-II] [54]). Tuttavia, nella maggior parte degli studi *in vitro*, la lumefantrina si è dimostrata relativamente inattiva contro i gametociti maturi di *P. falciparum* (IC_{50} : >



25 μ M [45]; 19% di attività a 5 μ M [pLDH test][46]; 17% di inibizione nella formazione di gameti femminili a 5 μ M [46]; < 25% di inibizione dell'exflagellazione a 10 μ M [72]; IC_{50} : > 50 μ M [51]; < 25% di attività [GFP-Luciferasi] a 330 nM [54]). Pochi studi hanno riportato una elevata potenza della lumefantrina contro i gametociti maturi (IC_{50} : 52 nM [stadio V] [67]; 59 nM [47]; 2,07 nM [85]). Inoltre la lumefantrina riduce la densità delle oocisti nelle zanzare anofele (SMFA indiretto; > 75% di attività a 330 nM [54]; 75-99% a 10 μ M [72]; 69% a 5 μ M [46]). Tuttavia, non è stato osservato alcun effetto sulla prevalenza delle oocisti a 330 nM [54]. Inoltre, non è stata osservata alcuna inibizione nella formazione di oocisti nel saggio SMFA diretto su *P. falciparum* a 5 μ M [46], evidenziando l'assenza di qualsiasi attività sporontocida contro *P. falciparum*.

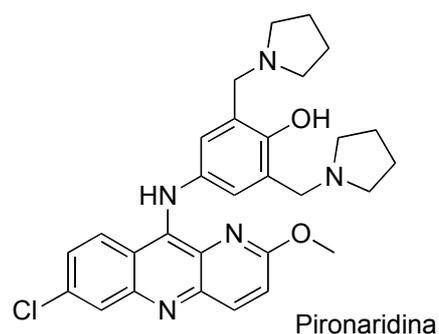
Tuttavia, in un saggio SMFA diretto su *P. berghei*, è stata osservata una riduzione di 84,75-89,15% [92] e 75-99% [72] della densità delle oocisti a 10 μ M. Inoltre, nello stesso protozoo e alla stessa concentrazione (10 μ M), la lumefantrina ha dimostrato un'attività *in vitro* > 50%, < 50% e > 50%, rispettivamente contro gameti/zigoti, oocinetti e oocisti [71].

Gli studi clinici con la lumefantrina sono stati effettuati per lo più in combinazione con l'artemetere e sono discussi in una sezione successiva.

1.4 Pironaridina

La pironaridina è una base di Mannich recentemente inclusa come farmaco partner dell'artesunato in un nuovo ACT per la malaria non complicata da *P. falciparum*. È uno schizontocida molto potente con attività antimalarica sia per il *P. falciparum* CQ-sensibile che per quello CQ-resistente [72,93]. Tuttavia, i rapporti che dimostrano la proprietà gametocitocida della pironaridina sono risultati contraddittori e quindi necessitano di ulteriore convalida. La pironaridina è potente solo

contro i gametociti di *P. falciparum* di stadio iniziale nella maggior parte degli studi (IC₅₀: 10-125 nM [67]; 61% di attività a 5 μM (pLDH test) [46]; 250 nM [85]; 168,09 nM [48]; 2-6 nM (stadi II-IV)

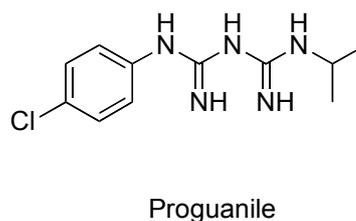
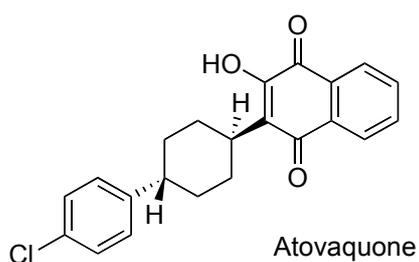


[94]) e ha dimostrato una potenza relativamente minore rispetto agli stadi maturi (IC₅₀: 2,07- 2,57 μM [67]; 1,85 μM [95]; 1,57 μM [45]; 1,8 μM [47]; > 1 μM (pLDH test) [44]; 4,2 μM [85]; 14,03% di inibizione della gametogenesi maschile a 1 μM [59]; IC₅₀: 3,25 μM [51]). Tuttavia, alcuni studi hanno riportato una potenza relativamente maggiore contro gli stadi maturi dei gametociti di *P. falciparum* (100% inibizione della formazione di gameti maschili e femminili a 10 μM [45]; 100% inibizione della formazione di gameti femminili a 5 μM [44]; 95,56% di inibizione della formazione di gameti femminili a 10 μM [59]; 100% di inibizione della formazione di gameti maschili a 10 μM [72]; IC₅₀: 280 nM [96]). Inoltre, il trattamento *in vitro* di *P. falciparum* con pironaridina 1 nM ha migliorato significativamente la gametocitogenesi [73]. Sebbene pochi studi abbiano riportato la potenza della pironaridina nel ridurre la densità delle oocisti in saggio SMFA indiretto su *P. falciparum* (attività del 100% a 5 μM [46]; attività > 75% a 85 nM [54]) Delves et al. hanno osservato un aumento del numero di oocisti di *P. falciparum* (rispetto al controllo a 10 μM) e lo 0% di attività nel saggio SMFA diretto su *P. berghei* [72]. Inoltre, la pironaridina è comparativamente meno efficace nel ridurre la densità delle

oocisti (attività del 21% a 5 μM) [46] e la prevalenza delle oocisti (attività < 25% a 85 nM) [54] nei saggi SMFA diretti su *P. falciparum*, dimostrando la mancanza di qualsiasi attività sporontocida significativa. Infine, è stata osservata un'inibizione del 75-99% nella formazione di oocinete di *P. berghei* a 10 μM (IC_{50} : 6 μM) nel test di inibizione dello sviluppo di oocineti [72]. Azevedo et al. hanno dimostrato un'attività > 50% contro i gameti/zigoti di *P. berghei* a 10 μM . Nello stesso studio e alla stessa concentrazione, la pironaridina ha dimostrato una completa inattività contro gli oocineti e < 50% di attività contro le oocisti di *P. berghei* [71]. Uno studio su pazienti africani con malaria da *P. falciparum* non complicata non ha riportato alcuna attività gametocitocida significativa con pironaridina 32 mg/kg durante il follow-up post-trattamento [79]. In un'analisi di uno studio clinico integrato, la combinazione pironaridina-artesunato si è dimostrata gametocitocida in quanto i gametociti presenti al basale (8,9%) sono stati completamente eliminati nel corso dello studio (42 giorni). Tuttavia, questa combinazione non è risultata superiore a meflochina-artesunato o artemetere-lumefantrina. Inoltre, la pironaridina-artesunato è stata più efficace nell'inibire l'emergenza dei gametociti quando non erano presenti gametociti al basale [97].

1.5 Atovaquone-proguanile

L'atovaquone/proguanile è una combinazione di farmaci composta da atovaquone, un inibitore della catena di trasporto degli elettroni a struttura idrossi-1,4-naftochinonica e proguanile, un inibitore della diidrofolato reduttasi (DHFR).



Tale combinazione è utilizzata per la prevenzione e il trattamento della malaria soprattutto nelle aree con ceppi CQ-resistenti. Il proguanile agisce in sinergia con l'atovaquone e fa collassare il potenziale della membrana mitocondriale [98]. Per l'atovaquone, non è stata osservata alcuna significativa attività gametocitocida in fase iniziale (IC_{50} : > 12,5 μ M [67]; 24 μ M [68]) o in fase avanzata (IC_{50} : > 2,3 μ M [67]; 50,4 μ M [68]; 5,31 μ M [45]; 16,1 μ M [51]; < 5% di attività a 5 μ M (dosaggio pLDH) e 29% di inibizione nella formazione di gameti femminili a 5 μ M [46]; ~12% di inibizione nella formazione di gameti maschili e femminili a 1 μ M [59]). Tuttavia, Ruecker et al. hanno dimostrato una potenza comparativamente maggiore dell'atovaquone contro i gametociti in fase avanzata e una notevole differenza di suscettibilità tra i gametociti maschili (78,13% di inibizione nella formazione di gameti maschili a 1 μ M) e i gametociti femminili (22,26% di inibizione nella formazione di gameti femminili a 1 μ M) [58]. L'atovaquone è anche induttore della gametocitogenesi a concentrazioni sub-letali [53,73]. Inoltre, saggi SMFA indiretti e diretti hanno riportato un'attività rispettivamente del 100 e del 99% alla concentrazione 5 μ M [46]. L'incapacità dell'atovaquone di prendere di mira i gametociti maturi, e la potente attività dimostrata nei saggi SMFA suggeriscono che il potenziale di blocco della trasmissione dell'atovaquone è probabilmente attribuibile alla sua potenziale azione contro gli stadi sporogonici di *P. falciparum* rispetto al suo effetto diretto sui gametociti. Inoltre, Azevedo et al. hanno riportato un'inibizione > 50% nella formazione di oocineti e nella maturazione delle oocisti a 10 μ M in *P. berghei*. Nello stesso studio, è stata osservata una marcata riduzione del numero di sporozoiti (da > 4×10^4 nel controllo a < 1×10^4) e un blocco completo dell'infezione epatica nei topi a 50 μ M [71]. Tuttavia, secondo Azevedo l'atovaquone è relativamente meno potente nell'inibire la formazione di oocisti (< 50% di inibizione a 10 μ M) rispetto alla maturazione delle oocisti (> 50% di inibizione a 10 μ M) [71]. Allo stesso modo, per il proguanile, è stata osservata una potenza micromolare contro i gametociti allo stadio iniziale (IC_{50} : > 12,5 μ M [67]; 6,5 μ M [85]) e gli stadi maturi (IC_{50} :

> 12,5 μM [67]; 11,94 μM [45]; attività del 32,3% a 5 μM (dosaggio pLDH) e inibizione del 16,6% nella formazione di gameti femminili a 5 μM [44]). Inoltre, è stata osservata un'inibizione del 43% nella formazione di oocisti nel saggio SMFA indiretto su *P. falciparum* a 5 μM mentre non è stata osservata alcuna attività nel saggio SMFA diretto alla stessa concentrazione [46]. Questi studi suggeriscono che il proguanile non possiede alcuna significativa attività gametocitocida o sporontocida, almeno alle concentrazioni testate. Il siero (contenente farmaco) raccolto da volontari trattati con atovaquone [99] e atovaquone/proguanile [100,101] è risultato efficace nel ridurre lo sviluppo di oocisti di *P. falciparum* [99] e di *P. berghei* [99,101] in zanzare *anopheles stephensi* infette. Questi dati suggeriscono che l'atovaquone o una combinazione di atovaquone e proguanile potrebbero possedere attività sporontocida e potrebbero essere in grado di ridurre l'infettività delle zanzare, influenzando così la trasmissione della malaria. Ciò è stato confermato da Blagborough et al. che hanno scoperto che, sebbene l'atovaquone fosse moderatamente efficace (riduzione del 57% nell'intensità delle oocisti e riduzione del 32% nella prevalenza delle oocisti a 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), era comunque in grado di ridurre il numero di cicli riproduttivi del 20% ed eliminare l'infezione in ambienti a bassa trasmissione [102]. Tuttavia, potrebbe non avere alcun effetto significativo sul parametro di clearance dei gametociti a causa dell'assenza di qualsiasi attività gametocitocida diretta *in vivo* (è stata osservata solo una leggera riduzione del carico dei gametociti (9,1-6,2%) per i pazienti trattati con atovaquone/proguanile in un studio effettuato in Thailandia [103]). Rispetto al proguanile, un altro antifolato, il clorproguanile, sembra essere più attivo contro i gametociti in fase avanzata (IC_{50} : 2 μM [43]; 4,68 μM [45]; 2,6-3,2 μM [44]; 4,3 μM [85]), un'osservazione che punta verso un meccanismo d'azione alternativo diverso dall'inibizione della DHFR. Inoltre, il clorproguanile è attivo sia nel saggio SMFA indiretto (inibizione del 100% a 5 μM) che in quello diretto (inibizione dell'87% a 5 μM) [46]. Il

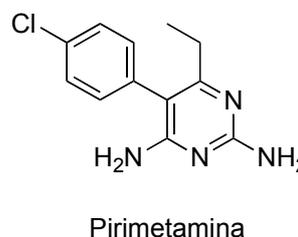
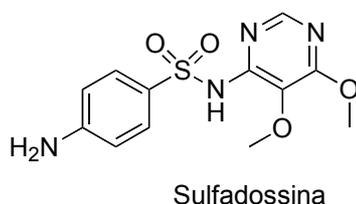


Clorproguanile

clorproguanile/dapsone (LapDap) è stato utilizzato come farmaco antimalarico per la malaria da *P. falciparum* non complicata fino a quando non è stato ritirato nel 2008 a causa delle crescenti preoccupazioni di tossicità emolitica nei pazienti con deficit di G6PD [104,105].

1.6 Sulfadossina e pirimetamina

La sulfadossina e la pirimetamina (SP) è la combinazione di farmaci più ampiamente utilizzata, sia come parte di ACT insieme all'artesunato, sia come trattamento preventivo intermittente in gravidanza [106].



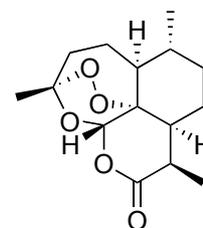
Per la sulfadossina, non è stata osservata alcuna significativa attività gametocitocida in fase iniziale o avanzata nella maggior parte degli studi riportati (IC_{50} : > 12,5 μ M (fasi iniziali e tardive) [67]; > 40 μ M (fasi iniziali e finali) [85]; 0% di attività a 5 μ M (saggi pLDH e Pfs25) [46]). Inoltre, le inibizioni del 32% e dello 0% nella formazione di oocisti rispettivamente in SMFA indiretto e diretto, a 5 μ M, indicano l'assenza di qualsiasi attività sporontocida della sulfadossina [46]. Per la pirimetamina, non è stata segnalata alcuna attività sui gametociti sia nella fase iniziale che in quella avanzata (IC_{50} : > 12,5 μ M [fasi iniziali e tardive] [67]; > 40 μ M [fasi iniziali] [48]; > 25 μ M [fasi finali] [45]; > 40 μ M [fasi iniziali e finali] [85]; > 50 μ M [fasi finali] [51]). Tuttavia, nei saggi di vitalità funzionale, è stato riscontrato che colpisce preferenzialmente i gametociti maschili di *P. falciparum* causando l'inibizione della formazione di gameti maschili (attività del 73,2% a 1 μ M [58]; attività del 93,53% a 1 μ M [59]; 25–49% di attività a 10 μ M [72]), e una potenza trascurabile contro i gametociti femminili a 1 μ M [58], 5 μ M [44] e 10 μ M

[45,59]. La pirimetamina è anche potente nei saggi SMFA indiretto e diretto su *P. falciparum*, causando, alla concentrazione 5 μM , rispettivamente, un'inibizione del 100% e del 99%, confermando la sua capacità di colpire gli stadi sporogonici del parassita della malaria [46]. Delves et al. hanno anche riportato una forte inibizione della formazione di oocisti in *P. falciparum* (attività del 100% a 10 μM , SMFA indiretto) e in *P. berghei* (attività del 75-99% a 10 μM , SMFA diretto) [72]. Azevedo et al. hanno riportato un'inibizione < 50% nella formazione di oocinetti e di oocisti di *P. berghei* mentre è stata osservata un'inibizione comparativamente più alta (> 50%) della maturazione di oocisti [71]. Sebbene SP sia efficace nei saggi SMFA, molti studi clinici hanno riportato un aumento del tempo di circolazione, della prevalenza e della densità dei gametociti, dopo il trattamento con SP sia in aree geografiche in cui conserva l'efficacia sia in aree con efficacia ridotta o resistenza documentata [78,82,106-113]. Inoltre, è stato anche riscontrato che i gametociti trattati con SP hanno una maggiore resistenza conferendo mutazioni a DHFR (diidrofolato reduttasi) e DHPS (diidropteroato sintasi) rispetto ai parassiti asessuati della stessa popolazione [106]. Le mutazioni in DHFR e DHPS conferiscono ai parassiti asessuati un tempo di clearance prolungato che successivamente aumenta la prevalenza dei gametociti [112,114]. Molti studi hanno riportato che la somministrazione di SP aumenta l'infettività delle zanzare anofele [77,115] mentre altri studi hanno dimostrato una diminuzione di questo parametro [82,106,114,116,117]. La riduzione dell'infettività delle zanzare è stata osservata in studi che hanno coinvolto l'alimentazione delle zanzare anofele con gametociti miscelati con la combinazione di sulfadossina, pirimetamina e SP in dosi corrispondenti alle concentrazioni fisiologiche dei pazienti dei giorni 3, 7 e 14 (giorno 3 - dose massima, giorno 14 - dose più bassa; SMFA diretto). Sempre nello stesso studio è stata riportata una diminuzione significativa rispetto ai controlli nella prevalenza di oocisti al terzo giorno, nelle zanzare alimentate con gametociti trattate separatamente con concentrazione di sulfadossina (61 $\mu\text{g/mL}$),

pirimetamina (154,7 ng/mL) e combinazione SP (61 µg/mL e 154,7 ng/mL). Inoltre, la riduzione della prevalenza di oocisti dopo la somministrazione di farmaci corrispondenti alle concentrazioni del giorno 7 è significativa solo per la combinazione di sulfadossina (33,8 µg/mL) + pirimetamina (66,7 ng/mL) mentre la riduzione dopo trattamento con concentrazione corrispondente al giorno 14 (sulfadossina = 14,2 µg/mL, pirimetamina = 15,7 ng/mL) non era significativa in nessuna delle combinazioni di sulfadossina, pirimetamina o SP. Una significativa diminuzione della densità delle oocisti è stata riportata anche quando le zanzare sono state alimentate con farmaci corrispondenti alle concentrazioni fisiologiche del giorno 3 e del giorno 7 per sulfadossina e SP, tuttavia per le concentrazioni corrispondenti al giorno 14 questa diminuzione era significativa solo per SP. Inoltre, la concentrazione fisiologica di SP del giorno 3 ha ridotto la sopravvivenza delle zanzare fino al 65%, il che è indicativo di un'azione endectocida [114]. Questa azione endectocida può avere implicazioni sulla dinamica di trasmissione nelle aree in cui la combinazione artesunato + SP è utilizzata come antimalarico di prima linea. Tuttavia sono necessari ulteriori esperimenti di conferma per convalidare tale attività.

1.7 Artemisinina

L'artemisinina, un lattone sesquiterpenico, e i suoi derivati, che sono usati in ACT insieme ad altri antimalarici a più lunga emivita come lumefantrina, SP, meflochina e piperachina, sono potenti schizonticidi. Gli ACT sono i farmaci antimalarici di prima linea raccomandati dall'OMS contro *P. falciparum* [118]. L'artemisinina e i suoi derivati sono più attivi contro gli stadi sessuati di *P. falciparum* rispetto a qualsiasi altro farmaco schizonticida e hanno anche la capacità di ridurre la trasmissione della malaria [86,119,120]. Tuttavia, le dosi alle quali i derivati dell'artemisinina possono eliminare i parassiti asessuati non sono sufficienti per colpire i gametociti maturi, che di solito



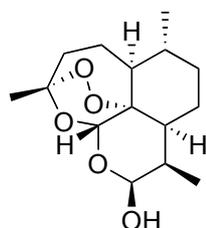
Artemisinina

richiedono una dose più alta [46,54]. La maggior parte degli studi ha riportato una riduzione di parametri come la durata della circolazione ematica dei gametociti, la densità e la prevalenza dei gametociti e l'infettività delle zanzare in seguito al trattamento con derivati dell'artemisinina [119,121–125]. Questa riduzione non è sempre correlata positivamente con la riduzione della trasmissione della malattia, che rimane moderata [77,126–129]. Oltre al loro effetto diretto sugli stadi sessuati di *P. falciparum*, i derivati dell'artemisinina/ACT contribuiscono anche alla riduzione generale della trasmissione della malaria a causa della loro potente attività schizonticida, prevenendo la generazione de novo di gametociti [130]. Nonostante la variazione del potenziale di blocco della trasmissione dei singoli ACT, questi ultimi in generale sono utili nel ridurre la trasmissione della malaria [119,126]. Diversi ACT possiedono un'attività gametocitocida variabile, in parte a causa della differenza nelle potenze dei farmaci usati in combinazione. Secondo test gametocitocidi *in vitro*, i gametociti in via di sviluppo sono più suscettibili alla meflochina e lumefantrina rispetto all'amodiachina e quindi la terapia di combinazione artemetere-lumefantrina e artesunato-meflochina potrebbe essere associata ad una minore gametocitemia post-trattamento [121]. Alcuni studi hanno suggerito che il trattamento dei portatori asintomatici con un ACT prima della stagione di trasmissione può eliminare l'infezione asintomatica e aiuta a ridurre la trasmissione della malaria [131]. Tuttavia si prevede anche che un maggiore utilizzo di ACT, come durante una campagna di massa, possa portare allo sviluppo di resistenza [126]. Inoltre, gli ACT sono meno efficaci nel ridurre la gametocitemia nei pazienti che si presentano con gametociti positivi al vetrino al momento del trattamento a causa dell'inattività degli ACT contro i gametociti allo stadio V [123,132]. Come dimostrato da vari studi, l'aggiunta di un farmaco gametocitocida diretto come la primachina [133] o il blu di metilene [30] al regime ACT riduce ulteriormente il trasporto dei gametociti (ridotto di 12 volte con l'aggiunta di primachina [133]). La combinazione di ACT e di un farmaco gametocitocida diretto potrebbe anche impedire lo

sviluppo e la diffusione della resistenza ai farmaci e quindi avere un'influenza maggiore nella riduzione del potenziale di trasmissione rispetto ai soli ACT; questo è particolarmente vero per le aree che si stanno avvicinando all'eliminazione della malaria [134–136]. Nella sezione successiva vengono descritti i vari derivati dell'artemisinina in termini di attività gametocitocida e sporontocida e la sezione si conclude con le proprietà di blocco della trasmissione dei singoli ACT. Va tuttavia notato che i test basati sull'ATP non sono buoni indicatori dell'attività gametocitocida *in vitro* degli endoperossidi, cioè dell'artemisinina e dei suoi derivati [50,51,96]. Ciò potrebbe essere dovuto alla persistenza del pool di ATP nei gametociti in risposta al trattamento prolungato con endoperossido [50].

1.7.1 Diidroartemisinina

La diidroartemisinina (DHA) o artemimolo è il metabolita attivo dell'artemisinina e dei suoi derivati come artesunato e artemetere ed è a sua volta disponibile come farmaco (per l'uso in combinazione con piperachina, come ACT). Molti studi hanno dimostrato l'attività della



Diidroartemisinina

DHA nel range nanomolare contro i gametociti allo stadio iniziale (IC_{50} : 3-7 nM [67]; 43 nM (saggio della luciferasi) [50]; 18,3 nM [85]; 0,90 nM [48]; 17 nM [49]; 12 nM [54]), mentre valori di IC_{50} più alti sono stati osservati per gli stadi maturi (IC_{50} : > 12,5 μ M (stadio V) [67]; 14,9 μ M (dosaggio ATP) [50]; 3,56 μ M (dosaggio

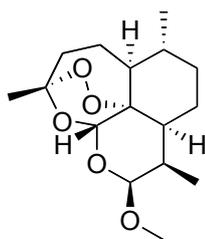
ATP) [51]). Tuttavia, molti studi hanno riportato una potenza più elevata della DHA nell'intervallo submicromolare anche tra i gametociti in fase avanzata (IC_{50} : 36 nM (dosaggio pLDH), 130 nM (dosaggio Pfs 25) [44]; 11-20 nM (pLDH e presto-blue dosaggi) [50]; 77 nM [47]; 200 nM [137]; 17 nM [49]; 2,17 nM [85]; ~70% di attività a 1 μ M [56]). Tale discrepanza nei risultati potrebbe essere parzialmente dovuta al fatto che la maggior parte degli studi che dimostrano la potenza della DHA contro gli stadi avanzati classificano gli stadi avanzati come da III a V [56] oppure da IV a V [47,50,51,85].

Un'altra fonte di variazione è la differenza nelle letture del dosaggio che può spiegare la variazione di potenza quando vengono usati farmaci specifici, a causa dei percorsi biochimici con cui i farmaci potrebbero interferire [50,67]. Reader et al. hanno testato la DHA in quattro saggi basati su rilevazioni diverse e solo il saggio basato su ATP e pLDH ha riportato una potenza inferiore (IC_{50} : 14,9 μ M [dosaggio ATP], < 50% di attività a 1 μ M [dosaggio pLDH]) mentre una potenza maggiore (range nanomolare) è riportata dai dosaggi della luciferasi e con Presto-blue [50]. La potenza inferiore rilevata nel test pLDH potrebbe essere dovuta al tempo di incubazione relativamente più breve (48 ore). L'attività residua di pLDH persiste all'interno dei parassiti per un periodo di tempo più lungo, anche dopo la morte e il test potrebbe richiedere un tempo di incubazione molto più lungo (72 ore o più dopo il trattamento) [49]. Inoltre, i test basati sull'ATP potrebbero non essere sempre adatti per testare l'attività gametocitocida degli endoperossidi [50]. Tuttavia, Gebru et al. hanno riportato una potenza maggiore (IC_{50} : 200 nM) della DHA anche con un test basato sull'ATP [137]. I saggi di vitalità funzionale hanno dimostrato una potente attività della DHA contro i gametociti allo stadio V (75-99% di inibizione dell'exflagellazione a 10 μ M [72]; 63,86% di inibizione dei gameti maschili e 49,23% di formazione dei gameti femminili a 1 μ M [58]). Inoltre, Delves et al. hanno dimostrato la selettività della DHA per i gametociti maschili rispetto a quelli femminili (80,27% di inibizione dell'exflagellazione contro 5,63% di inibizione nella formazione di gameti femminili a 1 μ M) [72]. Ad oggi le ragioni di queste variazioni sono sconosciute, ma segue la consueta tendenza secondo cui la maggior parte dei farmaci è più attiva contro i gametociti maschili. Plouffe et al. hanno valutato la potenza della DHA tra le singole fasi dei gametociti (I-V, utilizzando un test non basato sull'ATP) concludendo che la DHA è inattiva contro i gametociti dello stadio V (IC_{50} > 12,5 μ M) mentre dimostra potenza nanomolare contro gli stadi I-IV [67]. Delves et al. hanno riportato un'inibizione del 50-75% nella formazione di oocisti a 10 μ M in saggio SMFA indiretto su *P. falciparum* [72]. Nello stesso studio, l'attività contro gli stadi del

parassita all'interno della zanzara è stata valutata anche con SMFA diretto su *P. berghei* con inibizione del 25–49% a 10 μM [72]. Adjalley et al. hanno riportato un'inibizione del 50-75% nella formazione di oocisti di *P. falciparum* a 120 nM [54]. Secondo Bolscher et al. l'attività di blocco della trasmissione della DHA nel saggio SMFA indiretto era significativamente maggiore di quella del saggio diretto in termini di densità di oocisti a 100 nM e 1 μM e anche in termini di prevalenza di oocisti a 1 μM [44]. Risultati simili sono stati ottenuti anche da Vos, il cui studio ha dimostrato una inibizione del 94% nella formazione di oocisti alla concentrazione 5 μM nel SMFA indiretto senza attività in quello diretto [46]. Azevedo et al. hanno riportato un'attività < 50% contro gameti/zigoti di *P. berghei* e un'attività dello 0% contro oocinetti/oocisti a 10 μM [71]. Pertanto, esaminando simultaneamente tutti questi studi, sembra che l'attività osservata in *P. falciparum* [44,49,54,72] e *P. berghei* [46,71] negli SMFA indiretti possa essere in parte dovuta all'attività della DHA contro i gametociti maturi, perché in questi studi non è evidenziata l'attività sporontocida.

1.7.2 Artemetere

L'artemetere è l'etere metilico dell'artemisinina, utilizzato per il trattamento della malaria non complicata e di quella grave [138,139]. Fa parte di un popolare ACT insieme alla lumefantrina, una combinazione che costituisce anche il trattamento antimalarico di prima linea per la malaria non complicata in molti paesi. Gli studi hanno riportato una potente



Artemetere

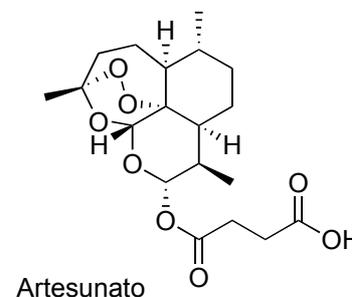
attività antiplasmodiale dell'artemetere contro i gametociti allo stadio iniziale (IC_{50} : 5-16 nM [67]; 3,73 nM [48]; 11 nM [85]) e i gametociti maturi (IC_{50} : 19 nM (stadio IV) [67]; > 50% di attività a 1 μM (saggi della luciferasi e PrestoBlue) [50]; 98% di inibizione nella formazione di gameti femminili di *P. falciparum* a 5 μM [46];

IC_{50} : 73 nM [47]; 3,13 [85]). Tuttavia, vari studi hanno osservato una potenza

relativamente minore nei saggi gametocitocidi [11] contro gametociti maturi (IC_{50} : $> 12,5 \mu M$ [stadio V] [67]; $< 50\%$ inibizione a $1 \mu M$ [dosaggi pLDH e ATP] [50]; attività del 69% a $5 \mu M$ [dosaggio pLDH] [44]). Queste osservazioni sono state supportate da altri studi intesi a valutare la vitalità funzionale; questi studi hanno evidenziato una minore potenza dell'artemetere contro gli stadi maturi ($45,65\%$ di inibizione dell'exflagellazione e 0% di inibizione nella formazione di gameti femminili a $1 \mu M$, 27% di inibizione nella formazione di gameti femminili a $10 \mu M$ [45]; $25-49\%$ di inibizione dell'exflagellazione a $10 \mu M$ [72]). Contrariamente ad altri derivati dell'artemisinina, Plouffe et al. hanno riportato una potenza significativamente maggiore dell'artemetere contro i gametociti allo stadio IV (IC_{50} : 19 nM) rispetto allo stadio V ($IC_{50} > 12,5 \mu M$) utilizzando un test non basato su ATP (incubazione di 72 ore); queste osservazioni evidenziano l'incapacità dell'artemetere di colpire i gametociti dello stadio V con potenza simile a quella dello stadio IV o una miscela di gametociti dello stadio IV e V [72]. Pertanto, non è semplice confrontare la potenza dei derivati dell'artemisinina tra gli studi, proprio come altri farmaci, ed è necessaria una piattaforma di analisi standardizzata con parametri di analisi uniformi per generare la riproducibilità dei risultati [11]. Anche l'attività contro gli stadi sporogonici è stata studiata da Vos, il cui studio ha riportato un'inibizione del 20% a $5 \mu M$ in SMFA diretto e un'inibizione maggiore (94%) in SMFA indiretto alla stessa concentrazione [46]. Allo stesso modo Delves et al. [72] hanno riportato un'inibizione del $25-49\%$ nel SMFA diretto su *P. berghei* e un'inibizione maggiore ($75-99\%$) nel SMFA indiretto su *P. falciparum*. Collettivamente questi risultati indicano che, come la DHA, l'artemetere potrebbe non possedere una potenza significativa contro gli stadi sporogonici del parassita. Inoltre, la scarsa idrosolubilità dell'artemetere, a parte le variazioni nei parametri di analisi [11], può giustificare le variazioni di potenza osservate nei vari studi [59,140].

1.7.3 Artesunato

L'artesanato è un derivato dell'artemisinina che non è solo raccomandato come parte di un ACT di prima linea per la malaria da *P. falciparum* non complicata insieme alla meflochina, ma raccomandato anche come trattamento di prima linea nella sua forma iniettabile per la malaria grave/complicata. L'artesanato ha dimostrato di essere gametocitocida in vari studi *in vitro* contro gametociti allo stadio iniziale (IC_{50} : 4–13 nM [67]; 2,9 nM [48]; 3,8 nM [85]; 72 nM [68]) e gametociti allo stadio maturo (IC_{50} : 49 nM [stadio IV] [67]; 50 nM [dosaggio pLDH] [44]; 380 nM [137]; 59 nM [47]; 2,53 nM [85]; 108 nM [68]). Al contrario, pochi studi hanno dimostrato una potenza comparativamente inferiore contro i gametociti in fase avanzata (IC_{50} : > 10,601 μ M [67]; 10,83 μ M [51]; 2,3 μ M [96]). Come riportato in precedenza, i test basati sull'ATP [51,96] sono indicatori errati dell'attività gametocitocida degli endoperossidi, quindi la scelta del test potrebbe essere parzialmente responsabile di questa variazione [50]. Pertanto, utilizzando questi test *in vitro*, è possibile eseguire solo un confronto limitato per gli endoperossidi. I saggi di vitalità funzionale o di formazione di gameti o SMFA potrebbero fornire una migliore comprensione dell'attività di blocco della trasmissione di tali farmaci. Bolscher, Miguel-Blanco e Vos hanno riportato una potente attività dell'artesanato nel bloccare la gametogenesi femminile (IC_{50} : 110 nM [44]; 640 nM e ~100% di inibizione a 5 μ M [45]; 100% di inibizione a 5 μ M [46]). Al contrario, in altri studi è stato riportato un potenziale inibitorio molto inferiore contro la formazione dei gameti femminili (~0% di inibizione a 1 μ M [58]; < 10% di inibizione a 1 μ M [59]). L'artesanato ha anche mostrato la capacità di ridurre il numero di oocisti di *P. falciparum* in SMFA indiretti (IC_{50} : 0,1 ng/mL [141]; inibizione del 100% a 5 μ M [46]; inibizione del 75-99% a 10 μ M [72]). Sebbene abbia mostrato una completa inibizione nel bloccare la formazione di oocisti di *P. falciparum* a 5 μ M (SMFA indiretto), nessuna



inibizione è stata osservata nel saggio SMFA diretto alla stessa concentrazione [46]. Delves et al. hanno riportato un'inibizione dello 0–25% nel saggio SMFA diretto su *P. berghei* [72]. Anche Bolscher et al. hanno dimostrato una riduzione > 50% nella densità delle oocisti a 1 µM in SMFA indiretto, mentre la riduzione è stata comparativamente minore nel saggio diretto. Nessuna significativa inibizione nella prevalenza di oocisti è stata osservata in SMFA diretti o indiretti a 1 µM [44]. Collettivamente questi risultati indicano che l'artesunato non possiede alcuna significativa attività sporontocida contro *P. falciparum*.

Nessuna diminuzione nella prevalenza dei gametociti (23% al basale vs 24% giorno 7) e della densità media dei gametociti (12 gametociti/µL al basale vs 16 gametociti/µL al giorno 7) è stata osservata dopo la fine del corso di 7 giorni di monoterapia orale con artesunato in uno studio condotto nel Mali. Anche se la prevalenza dei gametociti è diminuita significativamente al giorno 21, i gametociti maturi non erano ancora completamente eliminati (basale [23%] vs giorno 21 [6%]). Inoltre, anche la durata della circolazione dei gametociti è diminuita in modo significativo al 28° giorno di follow-up, ma la monoterapia orale con artesunato non ha avuto successo nell'eliminare completamente i gametociti maturi e nel prevenire la comparsa di nuovi gametociti di stadio V [142].

1.8 Tipi di ACT

La sezione seguente si occupa di vari ACT e del loro potenziale di blocco della trasmissione. Poiché tutti gli ACT sono potenti combinazioni di farmaci schizonticidi e accelerano l'eliminazione dei parassiti asessuati, impediscono la produzione di nuovi gametociti da parassiti asessuati [143].

1.8.1 Artemetere + lumefantrina

Questa combinazione è stata approvata dalla FDA nel 2009 per il trattamento della malaria da *P. falciparum* non complicata. Artemetere + lumefantrina (AL) è associata ad una rapida riduzione della gametocitemia e del tasso di circolazione ematica dei gametociti negli adulti e nei bambini [126,144,145]. Il confronto di AL con altri ACT come DHA-piperachina (DP) in termini di potenziale blocco della trasmissione produce risultati contrastanti. Pochi studi hanno dimostrato l'efficacia della DP rispetto ad AL in parametri come la riduzione post-trattamento della durata della circolazione dei gametociti e il rischio di sviluppare gametocitemia,[133,146,147] mentre altri studi hanno mostrato un maggiore potenziale di riduzione dei gametociti di AL rispetto a DP [126]. Tuttavia, tutti questi studi che descrivono una maggiore potenza della DP rispetto alla AL si basavano solo sulla valutazione microscopica della gametocitemia periferica, che è un marker surrogato per l'infettività e il potenziale di trasmissione [148-150]. AL è risultata essere superiore a DP [151], AQ + AS [130,151], AS + SP [130], AS + MQ [152] nella riduzione della durata di circolazione dei gametociti e superiore ai non-ACT nella riduzione della durata di circolazione dei gametociti e nell'infettività delle zanzare [129,153,154]. Sebbene gli studi clinici abbiano dimostrato una sostanziale capacità di riduzione dell'infettività delle zanzare da parte di AL [128,129,155], l'infettività delle zanzare non viene del tutto abolita [128,149,156].

1.8.2 Artesunato + amodiachina

Le combinazioni di farmaci che coinvolgono l'artesanato sono associate a tassi di durata della circolazione dei gametociti significativamente più bassi come osservato da studi clinici in Nigeria [143,157], Costa d'Avorio [145] e Kenya/Senegal/Gabon [158]. In uno studio multicentrico che ha coinvolto bambini del Kenya, Senegal e Gabon, è stata osservata una significativa riduzione del carico di gametociti con artesunato + amodiachina

(AS + AQ) rispetto alla sola AQ dal giorno 0 al giorno 21 del follow-up; non è stata riscontrata una differenza significativa tra i due bracci, al giorno 28 [158].

1.8.3 Artesunato + meflochina

Artesunato + meflochina (AS + MQ) è utile rispetto ad altri ACT e non-ACT in termini di clearance dei gametociti più rapida e diminuzione della durata della circolazione dei gametociti [86,133,144,159–161]. I pazienti arruolati in uno studio clinico in Myanmar, a dose fissa di AS + MQ, hanno avuto tassi di circolazione dei gametociti post-trattamento più bassi rispetto ad altri ACT [133]. Sebbene i tassi di circolazione siano diminuiti nel corso del follow-up, la completa eliminazione della gametocitemia non è stata raggiunta dopo il ciclo di trattamento standard in studi separati condotti in Myanmar [133] e Thailandia (dove sono stati necessari almeno 28 giorni per eliminare completamente i gametociti) [161]. Pertanto si può affermare che la clearance della gametocitemia da parte dell'artesanato e delle sue combinazioni potrebbe essere in parte dovuta alla rapida eliminazione della parassitemia asessuata [77].

1.8.4 Artesunato + sulfadossina/pirimetamina

Studi clinici suggeriscono che artesunato + sulfadossina/pirimetamina (AS + SP) determinano una minore capacità di circolazione ematica e prevalenza di gametociti durante il follow-up rispetto al basale [162]. Anche AS + SP è risultata essere superiore a SP [163,164] e ai non-ACT [78,165] in termini di riduzione della gametocitemia post-trattamento. Sebbene dopo 14 giorni di follow-up sia stato riscontrato che AS + SP riduce la prevalenza e la densità dei gametociti, una percentuale significativa di gametociti persisteva ancora ed era sufficiente per continuare la malattia. Inoltre, l'aggiunta di un farmaco gametocitocida diretto, la primachina, ha ridotto la prevalenza dei gametociti e la loro circolazione a livelli inferiori alla soglia teorica per l'infezione della zanzara [162].

1.8.5 Diidroartemisinina + piperachina

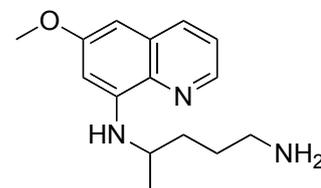
La combinazione diidroartemisinina-piperachina o DP è un'alternativa efficace agli ACT di prima linea universalmente adottati, non solo per la sua capacità di eliminare i parassiti a sessuati ma anche per la chemioprolifassi grazie alla maggiore emivita della piperachina rispetto ad altri farmaci presenti in ACT [166]. Questa combinazione è efficace anche contro i gametociti in termini di diminuzione post-trattamento della loro prevalenza e della durata della loro circolazione [121,146,147,166-169].

Tuttavia, è stato riscontrato che l'aggiunta di un farmaco gametocitocida diretto, come la primachina, riduce ulteriormente la durata di circolazione dei gametociti e, quindi, la combinazione DP-primachina potrebbe avere una migliore probabilità di diminuire la trasmissione della malaria rispetto alla sola DP [134,168,170]. Una dose bassa di DHA, inferiore a 6 mg/kg (limite inferiore di DHA precedentemente raccomandato dalla FDA), è associata a un rischio 1,6 volte maggiore di gametocitemia periferica al giorno 7 rispetto alla dose più alta, ≥ 6 mg/kg [167]. Quindi, l'OMS ha aumentato la dose raccomandata per la DP ad un minimo di 7,5 mg/kg nei bambini di peso inferiore a 25 kg [121].

Studi di confronto tra DP e altri ACT come AL, AS + MQ hanno rivelato risultati contrastanti. Sebbene la DP sia risultata inferiore ad altri ACT in termini di riduzione della gametocitemia, era comunque migliore di molti non-ACT [150,153,171]. Questi risultati sono stati ribaditi in una recente meta-analisi (WWARN), in cui è stato osservato un rischio significativamente più elevato di comparsa di gametociti con DP rispetto ad altri ACT come AL [121]. Inoltre, Sawa et al. hanno mostrato un'infettività delle zanzare due volte superiore nel gruppo DP rispetto al gruppo AL [149].

1.9 Primachina

La primachina, una 8-amminochinolina, è uno dei farmaci antimalarici più antichi ed è l'unico farmaco che blocca la trasmissione raccomandato per l'uso in contesti di trasmissione da bassa a moderata [38]. In particolare, la primachina è raccomandata dall'OMS in dose da 0,25 mg/kg (nelle aree minacciate dalla resistenza all'artemisinina o nelle aree prossime all'eliminazione, aree che non utilizzavano già



Primachina

la primachina indipendentemente dal problema della G6PD) o nella dose di 0,75 mg/kg (paesi che utilizzavano già 0,75 mg/kg di primachina prima che l'OMS modificasse il dosaggio, ad eccezione dei pazienti con deficit di G6PD). E' controindicata nelle donne in gravidanza e nei bambini di età inferiore ad 1 anno di vita. L'esatta modalità di azione della primachina non è ancora chiara [67] ma, proprio come altre 8-amminochinoline, può esercitare il suo effetto citotossico sui gametociti colpendo i mitocondri, attraverso l'inibizione di alcune funzioni della catena di trasporto degli elettroni [172-174]. Poiché la primachina è un profarmaco, non agisce direttamente sui gametociti ma mediante la generazione di metaboliti attivi, come risultato dell'attivazione metabolica CYP2D6-dipendente. Il CYP2D6 è un enzima altamente polimorfico e quindi complica la nostra comprensione della farmacologia di questo farmaco [40]. A causa della necessità di attivazione metabolica, la primachina si è dimostrata meno attiva *in vitro* con IC_{50} nell'intervallo micromolare (IC_{50} : 1,2 μ M [47]; 12,1 μ M [49]; 2,2-6,5 μ M [67]; > 11 μ M [69]; > 25 μ M [175]). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati in saggi di vitalità funzionale, che hanno riportato solo una modesta inibizione della formazione di gameti maschili (14,55% di inibizione a 1 μ M [59]; aumento del 15% di exflagellazione a 10 μ M [72]) e formazione di gameti femminili (~0 % di inibizione a 5 μ M [44]; 21,7% di inibizione a 10 μ M [45]; 17,77% di inibizione a 10 μ M [59]) e anche in SMFA indiretto su *P. falciparum* (40% di inibizione della formazione di oocisti a 5 μ M [46]). La primachina

si è inoltre dimostrata inattiva contro gli stadi sporogonici di *P. falciparum* (inibizione ~0% a 5 μ M [46]) e quella di *P. berghei* (inibizione ~0% a 10 μ M [72]) in SMFA diretti. Un derivato della primachina, la dietilprimachina, inibisce l'exflagellazione di *P. falciparum* del 50-74% a 10 μ M; tuttavia, non è stata osservata alcuna attività in SMFA indiretti su *P. falciparum* e *P. berghei* alla stessa concentrazione [72]. Vos et al. hanno riportato un'inibizione del 62% nella formazione di oocisti in SMFA indiretto su *P. falciparum* da parte della dietilprimachina alla concentrazione 5 μ M mentre non è stata osservata alcuna attività in SMFA diretto alla stessa concentrazione [46].

Pertanto, si può affermare che i test *in vitro* che coinvolgono il trattamento dei gametociti con profarmaci, come la primachina, senza attivazione metabolica non sono affidabili per valutare l'attività gametocitocida o sporontocida [175]. Studi clinici avevano riportato una certa potenza della primachina nella dose raccomandata di 0,75 mg/kg di peso corporeo [122,133,162,176] ma a causa dei problemi di tossicità emolitica nei pazienti con deficit di G6PD, la dose è stata successivamente ridotta a 0,25 mg/kg [177-179]. Tuttavia, il dosaggio di 0,25 mg/kg viene fornito con l'avviso "evidenze di bassa efficacia" nelle linee guida dell'OMS, suggerendo la necessità di ulteriori studi di conferma. Uno studio clinico in Uganda ha mostrato che 0,75 mg/kg e 0,40 mg/kg di primachina assunti insieme ad AL si sono dimostrati ugualmente potenti mentre dosi inferiori a 0,25 mg/kg (come la dose di 0,1 mg/kg) sono relativamente meno potenti e, quindi, hanno portato ad una maggiore prevalenza di gametociti durante il follow-up post-trattamento rispetto al livello basale [180]. Ciò ha suggerito una plausibile relazione dose-risposta poiché la diminuzione della dose di primachina si è tradotta in una corrispondente diminuzione della clearance dei gametociti. Goncalves et al., in uno studio condotto su bambini asintomatici, hanno dimostrato che la primachina a dosi di 0,40 e 0,25 mg/kg, insieme ad AL, è equipotente in termini di clearance dei gametociti e ha ulteriormente confermato questi risultati in studi sull'alimentazione con membrana artificiale (SFMA) [155]. Tuttavia, AL ha ridotto

sostanzialmente l'infettività delle zanzare a livelli trascurabili, rendendo difficile valutare le differenze nella risposta causata dalla dose di primachina aggiunta (0,25 o 0,40 mg/kg). Altri studi clinici hanno riportato anche un significativo potenziale di blocco della trasmissione della primachina a basso dosaggio [180–184]. Molti studi hanno garantito la sicurezza della primachina a basso dosaggio (0,25 mg/kg) non riportando episodi di eventi avversi gravi come anemia emolitica grave ed emolisi acuta [183]. Tuttavia, è stata segnalata anemia emolitica acuta nel 4,4% dei pazienti che vivevano in Tanzania, con conseguente calo dell'emoglobina $\geq 25\%$ nel braccio di trattamento con primachina da 0,25 mg/kg [182]. In uno studio su pazienti del Myanmar, una dose giornaliera di 0,25 mg/kg è risultata associata al 34-48% di emolisi; tuttavia, i pazienti non sono stati testati per il loro stato di attività della G6PD [185]. Inoltre, alcuni studi su pazienti con deficit di G6PD trattati con dosi inferiori di primachina (0,25 mg/kg o tre dosi di 0,25 o 0,50 mg/kg) hanno riportato casi di nefrotossicità [179,186,187]. In tali casi, non è possibile escludere l'esistenza di comorbilità e gli eventi avversi come un danno renale potrebbero essere dovuti all'esacerbazione della condizione di comorbilità da parte della primachina piuttosto che indotti indipendentemente dalla primachina. Gli studi suggeriscono che i problemi emolitici correlati alla primachina non sono limitati solo ai casi con deficit di G6PD [39,155,178], ma indicano decisamente un rischio sostanzialmente maggiore nei pazienti con deficit di G6PD [41]. Sono necessari studi per raccogliere ulteriori prove relative alla sicurezza e all'efficacia della primachina a basso dosaggio, allo scopo di aumentare il suo grado di applicabilità in termini di popolazione bersaglio ed età.

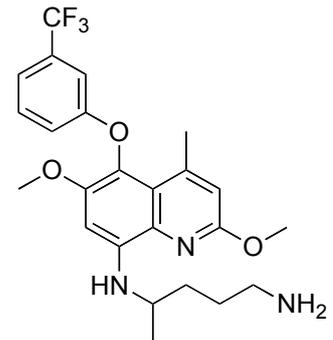
1.10 Tafenochina

La tafenochina è stata recentemente registrata per la prevenzione delle ricadute nei pazienti con malaria da *P. vivax* [188]. Tafenochina e primachina appartengono alla classe delle 8-amminochinoline; tuttavia, differiscono in termini di:

- emivita: la tafenoquina ha una maggiore emivita media plasmatica (14 giorni) rispetto alla primachina (6 ore)

- potenza: la tafenoquina ha una potenza più elevata della primachina contro gli stadi asessuati del Plasmodium [189].

Sebbene abbia mostrato potenza contro più stadi di *P. falciparum*, inclusi stadi esocitocitari [72,190-192] e forme asessuate eritrocitarie [193-196], si limita la discussione agli stadi sessuati negli ospiti, in altre parole, i gametociti e gli stadi sporogonici all'interno del vettore. È stato riscontrato che la tafenoquina (come la primachina) ha come bersaglio lo sviluppo dei gametociti (valori IC_{50} = 8,1-8,8 μ M [197]; 3,6-4,5 μ M [67]; 4,8 μ M [85];



Tafenoquina

3,6 μ M [48]) e gametociti in fase avanzata (valori IC_{50} = 9,8-11,1 μ M [197]; 2,4-3,4 μ M [67]; 2,5 μ M [43]; 4,6 μ M [85]). Questa potenza gametocitocida non ottimale è stata confermata anche nei test di inibizione della gametogenesi (IC_{50} : 7,6 μ M [45]; inibizione del 29,1% nella formazione di gameti femminili a 5 μ M [44]). Sebbene uno studio abbia dimostrato un'inibizione del 75% nello sviluppo di oocisti a 5 μ M in SMFA indiretto su *P. falciparum*, non è stata osservata alcuna attività in SMFA diretto alla stessa concentrazione, suggerendo la mancanza di qualsiasi attività sporontocida [46]. La tafenoquina è inefficace anche contro i gametociti di *P. berghei* alle concentrazioni testate nei topi [198] e ha impedito lo sviluppo degli sporozoit solo a una dose minima efficace di 25 mg/kg, molto più alta della corrispondente dose della primachina (1,25 mg/kg). Quando la tafenoquina è stata testata contro *P. yoelli nigeriensis* nei topi, non è stata osservata né attività gametocitocida né sporontocida [196,198].

C'è ancora un numero insufficiente di studi che dimostrano l'effetto di blocco della trasmissione sul parassita della malaria umano *P. falciparum*; è disponibile, però, uno studio che coinvolge *P. vivax*. In questo studio, in cui le zanzare infettate per la prima volta

da *P. vivax* sono state nuovamente nutrite con topi non infetti (trattati con tafenoquina alla dose di 25 mg/kg) dopo 4 giorni, è stata osservata una significativa riduzione del numero di sporozoitii all'interno delle zanzare [199]. Un recente studio di Kemirembe ha descritto interazioni antagoniste della tafenoquina con i farmaci ACT-associati, quando testati *in vitro* contro i gametociti; tuttavia, quando testata contro le forme asessuate la tafenoquina interagisce sinergicamente con i farmaci ACT-associati, [197]. Sebbene siano necessari più studi *in vivo*, sulla base dei dati esistenti sembra che l'unico modo in cui la tafenoquina può colpire i gametociti (quindi la trasmissione) è mirare alle fasi asessuate con maggiore potenza (interazioni sinergiche con farmaci ACT-associati) riducendo così la generazione de novo dei gametociti. In termini di parametri di sicurezza e farmacocinetica, la somministrazione concomitante di ACT e tafenoquina non ha alcun effetto clinicamente significativo sulla farmacocinetica di nessuno dei due e quindi non richiede alcuna alterazione del dosaggio [200].

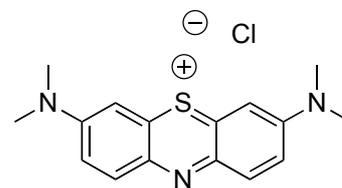
Le caratteristiche comuni e più importanti condivise sia dalla primachina che dalla tafenoquina includono il rischio di sviluppo di emolisi acuta in soggetti con deficit di G6PD e la necessità di attivazione metabolica da parte del CYP2D6 [193,200–202]. Tuttavia, come mostrato in un recente studio sui metabolizzatori intermedi (relativamente a CYP2D6), sebbene l'efficacia della tafenoquina non diminuisca a livelli simili alla primachina, i risultati dovrebbero essere convalidati anche nei metabolizzatori lenti (CYP2D6) [201]. È attualmente operativo uno studio clinico che valuta la sicurezza e la tollerabilità della tafenoquina in volontari con deficit di G6PD [203].

1.11 Blu di metilene

Il blu di metilene, un composto eterociclico aromatico e uno dei più antichi antimalarici sintetici, è stato recentemente oggetto di rinnovato interesse per la malaria a causa della sua convenienza e dell'attività gametocitocida sugli stadi maturi [31,177]. Un altro

vantaggio del blu di metilene è lo status di farmaco registrato in molti paesi, quindi svilupparlo come farmaco gametocitocida è molto più facile rispetto ad un nuovo composto.

Sebbene il meccanismo con cui questo farmaco esercita i suoi effetti inibitori sui gametociti allo stadio V non sia esattamente noto, il meccanismo d'azione potrebbe essere



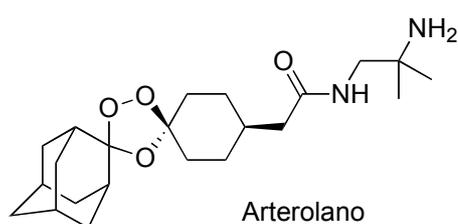
Blu di metilene

l'inibizione della glutazione reduttasi [204] o la prevenzione della formazione di emozoina [54,67]. La potenza del blu di metilene contro i gametociti si evidenzia a concentrazione nanomolare sia contro i gametociti precoci (IC_{50} : 29,64 nM [48]; 195 nM [50]; 13-20 nM [67]; 280 nM [85]; > 75% inibizione a 150 nM [54]) sia contro i gametociti maturi (IC_{50} : 38 nM [43]; 530 nM [44]; 307 nM [47]; 29,5 nM [49]; 143-900 nM [50]; 490-760 nM [51]; 12-258 nM [67]; 287 nM [85]; 12 nM [96]; 770 nM [137]; inibizione > 75% a 150 nM [stadio IV], inibizione del 50-75% a 150 nM [fase V] [54]). Inoltre, nei saggi di inibizione della gametogenesi, il blu di metilene è potente contro i gametociti maschili (inibizione del 99,3% a 1 μ M [58]; inibizione del 98,3% a 1 μ M [59]) e i gametociti femminili (IC_{50} : 300 nM [44] ; 920 nM [45]; inibizione del 95% a 5 μ M [46]; inibizione del 98,9% a 1 μ M [58]; inibizione del 95,8% a 10 μ M [59]). L'inibizione della gametogenesi femminile è dipendente dal tempo di incubazione come dimostrato da studi che hanno riportato una potenza 13 volte inferiore a 24 ore rispetto a 48 ore (IC_{50} : 11,9 μ M (24 ore) vs 0,92 μ M (48 ore) [45]) e (IC_{50} : 1,357 μ M [24 ore] contro 0,242 μ M [48 ore] [42]). Esperimenti SMFA diretti e indiretti hanno ulteriormente fornito prove di conferma dell'attività di blocco della trasmissione operati dal blu di metilene [46,49,54]. Adjalley et al. hanno riportato un blocco completo della trasmissione dei gametociti trattati con blu di metilene in uno studio SMFA indiretto su *P. falciparum* (attività del 99% a 38 nM) [54]. Allo stesso modo, D'Alessandro et al. hanno riportato una riduzione completa della prevalenza e della densità delle oocisti con blu di metilene alla concentrazione 1 μ M in

SMFA indiretto [49]. Vos et al. hanno dimostrato l'equipotenza del blu di metilene in SMFA sia indiretti che diretti (riduzione del 99% nella formazione di oocisti a 5 μM), suggerendo che il blu di metilene possiede sia attività gametocitocida che sporontocida [46]. Il potenziale di blocco della trasmissione del blu di metilene è già stato identificato e quindi se ne può proporre l'uso come agente bloccante la trasmissione insieme ad altri farmaci antimalarici [24,31,205-209]. Ad esempio, il blu di metilene ha mostrato forti proprietà gametocitocide se usato in combinazione con AQ o AS ad una dose di 10 mg/kg/giorno per tre giorni (prevalenza dei gametociti al giorno 7: 18% nel gruppo AS + AQ vs 0% nel gruppo AS + blu di metilene / AQ + blu di metilene) [31]. Il blu di metilene accelera anche l'eliminazione del parassita asessuato da parte dei farmaci schizonticidi quando usati in associazione [208] e possiede sinergia con gli ACT [205]. Il blu di metilene è un farmaco economico, ben tollerato e altamente biodisponibile con elevata potenza contro gli stadi sessuati del parassita della malaria e con potenziale per essere utilizzato come farmaco bloccante la trasmissione [210,211]. Considerando la minaccia della resistenza all'artemisinina e dei problemi di sicurezza associati alla primachina, il blu di metilene è un'alternativa promettente. Inoltre, essendo un farmaco con proprietà sia gametocitocide che sporontocide ha un ulteriore vantaggio su altri agenti antimalarici.

1.12 Arterolano

L'arterolano è già approvato per l'uso in combinazione con la piperachina in India e in diversi paesi africani. La sua attività gametocitocida *in vitro* è nel range micromolare



contro i gametociti allo stadio maturo (IC_{50} : 6,4 μM [96]). Analogamente ad altri endoperossidi testati,

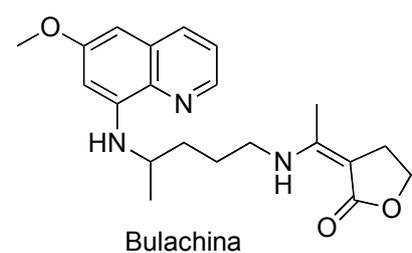
l'arterolano ha dimostrato un'elevata potenza contro i gametociti dallo stadio I allo stadio IV (IC_{50} : 2-8

nM) e si è dimostrato inattivo contro i gametociti allo stadio V ($\text{IC}_{50} > 12,5 \mu\text{M}$) [67].

Tuttavia, ha mostrato un'elevata potenza nei test di vitalità funzionale/inibizione della gametogenesi e negli studi SMFA. Il potenziale di inibizione della gametogenesi femminile dell'arterolano è stato osservato indipendentemente da Bolscher et al. (> 98% di inibizione a 5 μM [44]), Miguel-Blanco et al. (IC_{50} : 3,59 μM [45]) e Vos et al. (98% di inibizione a 5 μM [46]). Invece la completa inibizione dell'exflagellazione dei gametociti maschili è stata osservata a 10 μM da Delves et al. [72]. L'arterolano inibisce anche la formazione di oocisti di *P. falciparum* del 75-99% a 10 μM [72] e del 98% a 5 μM [46] in SMFA indiretti. L'arterolano è relativamente inattivo nei SMFA diretti su *P. falciparum* (27% di inibizione a 5 μM [46]) e *P. berghei* (1-24% di inibizione a 10 μM [72]), suggerendo la mancanza di qualsiasi attività sporontocida proprio come altri endoperossidi. Toure et al. hanno riportato una maggiore prevalenza di gametociti nel gruppo arterolano-piperachina rispetto al gruppo AL al giorno 7 e 14 e completa clearance dei gametociti in entrambi i bracci di trattamento al giorno 28 del follow-up [212]. I dati clinici attuali non sono conclusivi per assegnare la capacità di blocco della trasmissione all'arterolano perché la maggior parte degli studi ha misurato solo la gametocitemia periferica e non l'infezione della zanzara [11]. Sono necessari ulteriori studi che utilizzano un metodo di rilevamento della gametocitemia più sensibile e la valutazione dell'infettività delle zanzare.

1.13 Bulachina

La bulachina o CDRI 80/53, un analogo enamminico della primachina, è stata sviluppata come agente ipnozoitocida contro *P. vivax* [213]. Sono state riportate anche proprietà profilattiche contro il parassita della malaria delle scimmie *P. cynomologi* [214]. La bulachina, essendo un profarmaco della primachina, risulta essere molto più sicura [215,216] anche per i pazienti con deficit di



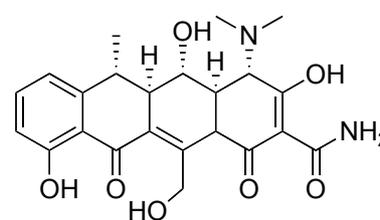
G6PD [213]. E' autorizzata (solo in India) non come agente gametocitocida ma come cura

radicale della malaria da *P. vivax* [217]. Secondo Puri et al., una singola dose di 1,25 mg/kg entro 24 ore dalla sua somministrazione è in grado di bloccare completamente l'infettività delle zanzare nelle scimmie rhesus infettate da *P. cynomologi* [216]. Tuttavia, la bulachina è priva di qualsiasi significativa attività sporontocida [216]. In uno studio clinico una singola dose di bulachina (1,25 mg/kg) ha superato la primachina (0,75 mg/kg) in termini di riduzione della prevalenza dei gametociti periferici (positività dello striscio al giorno 8: 65% per primachina vs 32% per bulachina; gametociti vitali al giorno 8 testati tramite exflagellazione: 52% per primachina vs 12% per bulachina) e di densità dei gametociti (densità gametociti media all'8° giorno/ μL : 543 [\pm 128,75] per primachina e 161,01 [\pm 32,76] per la bulachina), quando questi farmaci sono stati somministrati con una combinazione di chinina (30 mg/kg/giorno) e doxiciclina (100 mg/giorno) [218].

In questo studio, tuttavia, la completa clearance dei gametociti è stata osservata solo a partire dal quindicesimo giorno [218]. La bulachina deve essere ulteriormente valutata negli studi clinici per potere valutare a pieno le sue proprietà terapeutiche.

1.14 Doxiciclina

La doxiciclina è una tetraciclina sintetica ed è un efficace agente chemio-profilattico e schizonticida [219]. È raccomandata dall'OMS in combinazione con chinina o artesunato nei casi di follow-up per la malaria grave o in combinazione con altri antimalarici per la malaria da *P. falciparum* non complicata [118]. La doxiciclina risulta inattiva contro tutti gli stadi dei gametociti ($\text{IC}_{50} > 12,5 \mu\text{M}$ [67]; ~0% di attività a $5 \mu\text{M}$ [44]). Non è stata osservata alcuna inibizione della gametogenesi maschile o femminile o dello sviluppo



Doxiciclina

delle oocisti dopo il trattamento con doxiciclina ($\text{IC}_{50} > 25 \mu\text{M}$ [45]; 2,47% [maschi] e 34,12% [femmine] di inibizione della formazione di gameti a $1 \mu\text{M}$ [58]; ~0% di

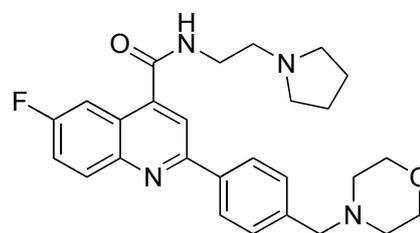
inibizione a 5 μM [44]). La doxiciclina è anche controindicata nelle donne in gravidanza e nei bambini di età inferiore a 8 anni.

2. Potenziale di blocco della trasmissione di candidati farmaci antimalarici in fase di sviluppo clinico

L'emergere e la diffusione periodica di parassiti resistenti ai farmaci sta rendendo l'armamentario antimalarico più ristretto e quindi evidenzia l'urgenza di sviluppare nuovi farmaci antimalarici [11,18,24,220,221]. Le piattaforme di screening ad alto rendimento hanno facilitato l'identificazione di nuovi composti attivi contro le fasi eso-eritrocitarie, le fasi eritrocitarie asessuate e i gametociti. Vari composti e loro combinazioni sono già entrati nello sviluppo clinico per la malaria o sono sul punto di entrare negli studi clinici. Questa sezione illustra quindi potenziali farmaci antimalarici in sviluppo clinico, specialmente in termini di capacità di blocco della trasmissione della malaria.

2.1 DDD107498 o M5717

DDD107498, una diammino-chinolina, è stata ottenuta attraverso l'ottimizzazione chimica di una serie di composti basati su uno scaffold chinolin-4-carbossamidico disostituito identificato dalla libreria di inibitori di proteina chinasi di Dundee. DDD107498 è un inibitore della sintesi proteica a lunga emivita che ha una nuova modalità di azione. Può agire potentemente in più fasi del ciclo vitale del parassita della malaria e possiede anche eccellenti proprietà farmaco-simili [220]. Questo composto è altamente



DDD107498

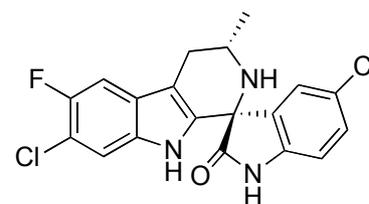
selettivo per i parassiti e non è citotossico. Per quanto riguarda il blocco della trasmissione della malaria, DDD107498 ha dimostrato una potenza eccellente contro i gametociti maschili di *P. falciparum* (IC_{50} : 1,8 nM) e i gametociti femminili (IC_{50} : 1,2 nM) nei test di

inibizione della gametogenesi maschile e femminile. Inoltre l'incubazione di 24 ore di gametociti maturi con DDD107498 (SMFA indiretto) inibisce la formazione di oocisti all'interno delle zanzare anofele (densità di oocisti $IC_{50} = 1,8$ nM, prevalenza di oocisti $IC_{50} = 3,7$ nM). Questo candidato farmaco colpisce anche gli stadi sporogonici di *P. falciparum*, dimostrando un valore di IC_{50} 10 nM in SMFA diretto. Ha anche dimostrato notevoli proprietà sporontocide contro gli oocinetti con IC_{50} 5 nM. Quando alle zanzare anofele è stato permesso di nutrirsi di topi infettati da *P. berghei* dopo 24 ore di trattamento con 3 mg/kg di DDD107498, è stata osservata una riduzione del 90,7% della prevalenza delle oocisti e del 98,8% della loro densità. Questo ha successivamente portato ad una riduzione del 93,8 e dell'88,6% della densità e della prevalenza di sporozoiti, rispettivamente. Inoltre, quando a queste zanzare (precedentemente nutrite con topi infetti e trattati con DDD107498) è stato permesso di rifocillarsi su topi non infetti e non trattati, è stata osservata una riduzione dell'89,5% del numero di topi che sviluppavano l'infezione allo stadio ematico [220]. Altri ricercatori hanno anche riportato una potenza nanomolare di DDD107498 contro i gametociti dello stadio I-V (IC_{50} : 2-9 nM) [67]. Oltre ad avere attività su più stadi dei gametociti e sugli stadi sporogonici, DDD107498 ha dimostrato potenza contro gli stadi asessuati ematici di *P. falciparum* e contro gli stadi eso-eritrocitari. Le sue proprietà fisico-chimiche desiderabili, come lunga emivita e una nuova modalità d'azione, lo rendono un farmaco ideale nelle terapie combinate. Inoltre, l'inibizione della sintesi proteica attraverso il PfcEF2 (*P. falciparum* elongation factor-2) è una modalità d'azione desiderabile perchè PfcEF2 è espresso in più stadi del ciclo vitale rendendo possibile ottenere una terapia a dose singola per la malaria. Attualmente, questo candidato farmaco è in fase di test di sicurezza ed è sul punto di entrare negli studi clinici.

2.2 Cipargamina

La cipargamina o KAE609/NITD609 è stata sviluppata da Novartis ed è uno dei candidati più avanzati nello sviluppo clinico [221]. Questo composto spiroindolonico non è solo attivo contro gli stadi asessuati di *P. falciparum* e *P. vivax* [222], ma ha anche il tempo di eliminazione del parassita più breve (<1 h) di qualsiasi antimalarico noto [223]. Inoltre, la

cipargamina ha dimostrato una potenza submicromolare contro i gametociti di *P. falciparum* sia in fase iniziale che in fase avanzata e ha mostrato attività a concentrazione 5 nM. I gametociti trattati con cipargamina si sono gonfiati e arrotondati, indicando una perturbazione della stabilità



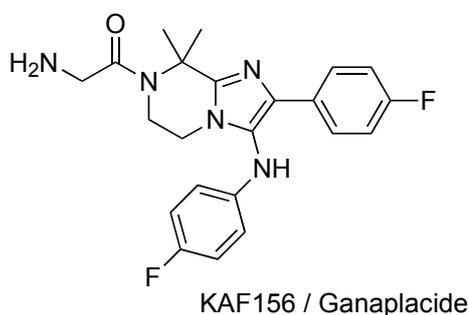
Cipargamina / KAE609

osmotica. Questo candidato farmaco ha anche mostrato attività sporontocida dose-dipendente con completa inibizione della formazione di oocisti a 500 nM in SMFA diretto [224]. Dopo una singola dose di 8,1 mg/kg, ha determinato una riduzione $\geq 85\%$ dell'intensità e della prevalenza di oocisti e sporozoi e ha bloccato completamente la trasmissione dei parassiti a topi non infetti [225]. Nello sviluppo preclinico, ha mostrato un promettente profilo farmacocinetico e si è dimostrato compatibile con la somministrazione orale una volta al giorno nell'uomo [226]. Anche un altro spiroindolone correlato, KAF246, ha dimostrato potenza contro i gametociti di stadio I - V in vitro (IC_{50} : 1–2 nM) [67].

2.3 KAF156 (Ganaplacide)

KAF156, una imidazolopiperazina, è già stato valutato contro *P. falciparum* e *P. vivax* negli studi di Fase IIa [227] e recentemente è entrato in studi di combinazione di Fase IIb con la lumefantrina in una nuova formulazione [228]. KAF156 è attivo contro le forme eritrocitarie asessuate (compresi i ceppi farmaco-resistenti), gli stadi eso-eritrocitari e gli stadi eritrocitari sessuati di *P. falciparum* [227]. KAF156 inibisce completamente la

maturazione dei gametociti (allo stadio V) quando incubato con gametociti allo stadio iniziale a concentrazione 50 nM per 5 giorni ed è stato trovato attivo anche a 5 nM.



Inoltre, i gametociti in fase iniziale trattati con KAF156 alla concentrazione 5 nM hanno completamente bloccato la formazione di oocisti all'interno delle zanzare anofele. Questo composto è efficace anche contro gli stadi sporogonici del

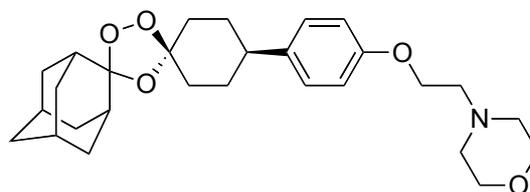
parassita della malaria poiché è stata osservata una riduzione > 90% nella formazione di oocisti nello screening SMFA diretto [229]. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati *in vivo* quando topi infettati da *P. berghei* trattati con 100 mg/kg di KAF156 non sono risultati infettivi per le zanzare anofele [229]. Complessivamente KAF156 è un candidato farmaco antimalarico molto promettente che ha già dimostrato il suo potenziale contro più stadi dei parassiti della malaria. Tuttavia, vengono segnalati anche alcuni problemi di sicurezza come una funzionalità epatica anormale. Per questo motivo necessita di ulteriore convalida in una popolazione più ampia in termini di parametri di sicurezza [223,227]. Una imidazopiperazina strettamente correlata, GNF179, ha dimostrato valori di IC_{50} 3–9 nM contro i gametociti maturi e blocco completo della trasmissione alla concentrazione 15 nM in SMFA indiretti [67]. Anche altre due imidazopirazine, KAI407 e KDU691, hanno dimostrato una potenza submicromolare contro i gametociti di stadio I – V [67] e una riduzione completa dello sviluppo di oocisti a 1 μ M [230].

2.4 Artefenomel

Artefenomel o OZ439 è l'ozonide di nuova generazione della famiglia dei [1,2,4]-triossolani con una emivita più lunga (46–62 ore) rispetto all'arterolano (2–4 ore). Artefenomel è attualmente in fase di sperimentazione in studi di combinazione di Fase IIb con la ferrochina [231]. Come riportato dagli studi di Fase I, questo composto è ritenuto

sicuro a dosi fino a 1600 mg [232]. L'attività antiplasmodiale (*in vitro*) contro gli stadi asessuati dei ceppi resistenti all'artemisinina è un pregio di questo composto [221].

Negli studi preclinici artefenomel ha anche mostrato una buona sicurezza durante lo sviluppo embrio-fetale, rendendolo potenzialmente più sicuro di altre artemisinine



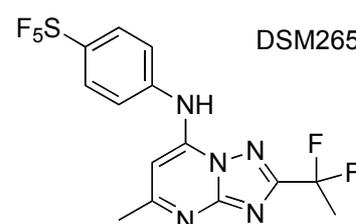
Artefenomel / OZ439

da utilizzare nel primo trimestre di gravidanza [221]. Nonostante abbia un ruolo nella clearance del parassita asessuato, artefenomel può essere sviluppato come potente agente bloccante la trasmissione. Studi *in vitro* hanno evidenziato le proprietà gametocitocide contro i gametociti allo stadio iniziale (attività del 70-85% a 1 μM [analisi della luciferasi] [50] e gametociti allo stadio maturo (attività del 70-85% a 1 μM [analisi della luciferasi] [50] È interessante notare che Reader et al. (saggio basato su ATP, saggi PrestoBlue e pLDH) e Vos et al. (saggio pLDH) hanno riportato una potenza inferiore contro gli stadi maturi (< 30% di attività a 1 μM [50]; 33 % di attività a 5 μM [46]). Inoltre, Plouffe et al. hanno riportato attività solo contro i gametociti dallo stadio I allo stadio IV (IC_{50} : 2-11 nM) e non contro lo stadio V (IC_{50} > 12,5 μM), come altri endoperossidi testati nel loro studio [67]. La ragione di questa discrepanza non è chiara, ma potrebbe essere dovuta a variazioni intra-analisi, che hanno portato a variazioni di potenza per farmaci con una modalità d'azione specifica a seconda del percorso biologico bersaglio del test [67]. Tuttavia, i saggi di vitalità funzionale hanno dimostrato l'inibizione della gametogenesi maschile (attività del 75-99% a 10 μM [72]) e della gametogenesi femminile (IC_{50} : 150 nM [44]; inibizione del 91% a 5 μM [46]) e hanno ulteriormente evidenziato il suo potenziale contro le fasi mature dei gametociti. Successivamente, la riduzione della formazione di oocisti è stata segnalata anche in SMFA indiretti (IC_{50} : 83 nM [44]; inibizione del 99% a 5 μM [46]; inibizione del 75-99% a 10 μM [72]) confermando l'attività gametocitocida. Tuttavia, non era attivo in SMFA diretti su *P. berghei* (inibizione del 25-49% a 10 μM [72]) e su *P.*

falciparum (inibizione dello 0% a 1 μM [44]; inibizione dello 0% a 5 μM [46]). Questi risultati suggeriscono che il composto prende di mira preferenzialmente i gametociti e non i gameti, gli oocinetti o le oocisti. Comunque, Upton et al. hanno mostrato la capacità di artefenomel (a 6,5 mg/kg) di ridurre la trasmissione in ambienti a bassa trasmissione in un modello di popolazione di laboratorio da topo a topo. Tuttavia la potenza nel ridurre l'intensità di oocisti e sporozoitii e la prevalenza nell'intestino medio della zanzara erano modeste (riduzione del 46% nell'intensità di oocisti, riduzione del 29% nella prevalenza di oocisti) rispetto alla primachina (inibizione del 100% nell'intensità e prevalenza di oocisti e sporozoitii a 6 mg/kg), ad AL (inibizione del 94% nell'intensità di oocisti, riduzione del 41% della prevalenza di oocisti, 68% di riduzione dell'intensità e prevalenza degli sporozoitii a 57 mg/kg di artemetere / 11,7 mg/kg di lumefantrina) e a cipargamina (riduzione $\geq 85\%$ dell'intensità e prevalenza di oocisti e sporozoitii a 8,1 mg/kg) [225]. In un trial (CHMI), artefenomel (500 mg, dimensione del campione = 4) ha prodotto solo una modesta riduzione del 21% della densità dei gametociti rispetto alla primachina (15 mg, dimensione del campione = 5; riduzione del 90%) [233]. A causa della piccola dimensione del campione, non è possibile trarre alcuna prova conclusiva. E' ovvio che per ottenere una rappresentazione più realistica dell'attività di blocco della trasmissione di questo derivato ozonidico sono necessari ulteriori studi clinici.

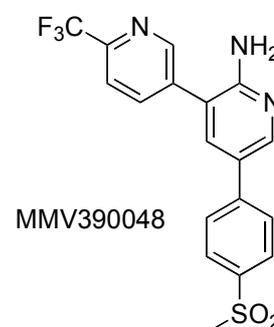
2.5 DSM265

DSM265 è un inibitore triazolopirimidinico della diidroorotato ossidasi (DHODH), un enzima che catalizza la biosintesi delle pirimidine del *P. falciparum*. Non ha una potenza significativa contro i gametociti in fase iniziale o avanzata nelle concentrazioni testate ($\text{IC}_{50} > 16 \mu\text{g/mL}$) e ha dimostrato solo una riduzione del 38% nella formazione di oocisti di *P. falciparum* a 1 $\mu\text{g/mL}$ in SMFA indiretti [234].



2.6 MMV390048

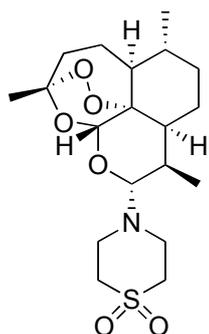
MMV390048 appartiene alla classe delle amminopiridine ed è già testato negli studi di fase I [235,236]. Questo composto è attivo contro più stadi parassitari compresi gli stadi epatici, gli stadi eritrocitari asessuati e sessuati e quindi ha il potenziale per essere utilizzato come cura a dose singola. MMV390048 colpisce sia i gametociti in fase iniziale che in fase avanzata (stadio iniziale IC_{50} : 214 nM, stadio avanzato IC_{50} : 140 nM) [237]. Ha una rapida azione contro i gametociti in fase avanzata, uccidendoli 2,5 volte più velocemente rispetto ai gametociti in fase iniziale. L'attività gametocitocida di MMV390048 è stata ulteriormente confermata in saggi di vitalità funzionale in cui l'inibizione della gametogenesi maschile è ottenuta con valori di $IC_{50} = 90$ nM dopo sole 24 ore di co-incubazione tra gametociti maturi allo stadio V e MMV390048. Questi risultati sono stati ulteriormente convalidati in SMFA indiretti (incubazione di 24 h) in cui è stata ottenuta una notevole riduzione della formazione di oocisti (IC_{50} : 111 nM). Tuttavia, non è stata osservata alcuna attività diretta contro gli stadi sporogonici di *P. falciparum* (riduzione < 25% delle oocisti a 1 μ M, SMFA diretto). Nel modello di trasmissione dall'ospite (topi Batch A) al vettore all'ospite (topi Batch B), è stata ottenuta rispettivamente una riduzione del 69% e del 30% della densità e della prevalenza delle oocisti dopo che zanzare anofele sono state nutrite con topi infettati da *P. berghei* (Batch A) pretrattati con 2 mg/kg di MMV390048. Ciò è stato seguito da una successiva riduzione del 37% e del 47%, rispettivamente, della densità e della prevalenza degli sporozoiti. Inoltre, è stata osservata una riduzione del 10% della conseguente infezione dello stadio ematico anche in topi non infetti (Batch B; zanzare che in precedenza si nutrivano di topi infettati da *P. berghei* trattati con il farmaco [Batch A]). Un effetto del 29% conferma ulteriormente la sua capacità di essere utilizzato come agente di



blocco della trasmissione in ambienti a bassa trasmissione. Tuttavia, sono necessari studi di blocco della trasmissione con il parassita della malaria umana, il *P. falciparum*, per estrapolare ulteriormente il suo utilizzo per l'eliminazione della malaria. Tuttavia, MMV390048, essendo un inibitore competitivo della proteina chinasi PI4K di *P. falciparum*, mostra un'efficacia di legame comparabile (IC_{50} nello stesso intervallo) per la proteina chinasi umana PIP4K2C. Sono necessarie indagini per accertare le implicazioni, se presenti, di una eventuale attività crociata contro la chinasi umana PIP4K2C quando MMV390048 è usato da solo o in combinazione con altri antimalarici [237].

2.7 Artemisone

L'artemisone è un derivato semisintetico dell'artemisinina ed è 4-10 volte più potente dell'artemisinina contro gli stadi asessuati di *P. falciparum* [238,239]. Ha mostrato una notevole efficacia contro gli stadi asessuati negli studi clinici in Thailandia (Fase II) [221]. Vari studi hanno riportato la potenza dell'artemisone contro i gametociti in stadio iniziale (IC_{50} : 0,94 nM [48]; 2-3 nM [67]; 2,4 nM [85]; 1,94 nM [240]) e i gametociti in stadio



Artemisone

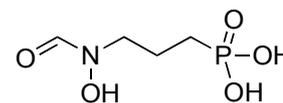
avanzato (IC_{50} : 4,9 nM [43]; 4 nM [solo stadio IV] [67]; 1,7 nM [85]; 42,4 nM [240]; attività del 75% a 5 μ M [46]). Tuttavia, come per altri endoperossidi, è stata riportata l'inattività verso i gametociti allo stadio V ($IC_{50} > 12,5 \mu$ M) [67]. Nei saggi di vitalità funzionale, è risultato notevolmente efficace nell'inibire la formazione di gameti

femminili (IC_{50} : 37 nM [44]; 940 nM [45]; attività del 98% a 5 μ M [46]). Sebbene Vos et al. abbiano riportato un'inibizione del 98% nello sviluppo di oocisti di *P. falciparum* in SMFA indiretto a 10 μ M, il saggio diretto non ha riportato alcuna inibizione alla stessa concentrazione, suggerendo la mancanza di qualsiasi attività sporontocida [46]. Dai dati attualmente disponibili, si può affermare che l'artemisone possiede attività contro i

gametociti ma non ha alcun potenziale sporontocida significativo. Da notare che uno studio in Cambogia per valutare l'efficacia dell'artemisone in pazienti affetti da malaria da *P. falciparum* non complicata è stato interrotto prima dell'arruolamento dei pazienti [241].

2.8 Fosmidomicina

La fosmidomicina è un antibiotico e un substrato competitivo della reduttoisomerasi DOXP, un enzima chiave nella via biosintetica degli isoprenoidi ed essenziale per gli stadi eritrocitari del Plasmodium [242]. È già stata studiata come trattamento per la malaria acuta da *P. falciparum* in monoterapia [243,244] o in combinazione con artesunato [245] o clindamicina [246-248] o piperachina [249] con cui è attualmente in fase II di sperimentazione [249,250]. La fosmidomicina è priva di qualsiasi attività gametocitocida significativa *in vitro* [44,45,67,85] o in studi clinici [243,247].



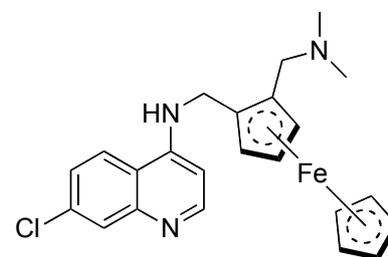
Fosmidomicina

Inoltre migliora la gametogenesi [44], la formazione di oocinetti [72] e la durata della circolazione ematica dei gametociti negli studi clinici [244,247,251-253]. In uno studio [245] la combinazione di fosmidomicina e artesunato ha dimostrato bassi livelli di circolazione dei gametociti, ma ciò potrebbe essere dovuto all'attività dell'artesunato piuttosto che all'attività gametocitocida diretta della fosmidomicina [242]. Dai dati attuali, il ruolo diretto della fosmidomicina come agente gametocitocida non è chiaro e le informazioni sono insufficienti per utilizzarla come agente bloccante la trasmissione.

2.9 Ferrochina

La ferrochina è un derivato della cloroquina con una porzione ferrocenica incorporata nella catena laterale della 4-amminochinolina. Questo composto ha mostrato potenza contro gli stadi eritrocitari asessuati di *P. falciparum* *in vitro* (contro ceppi CQ-sensibili e CQ-resistenti), *P. berghei* *in vivo* e in studi clinici [250]. Sebbene sia sottoposto a studi clinici

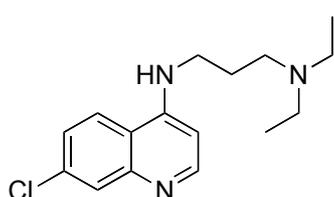
da solo e in combinazione con artesunato [254], è poco studiato per la sua attività di blocco della trasmissione. Un solo studio pubblicato sul parassita della malaria dei roditori *P. yoelii*/*An. stephensi* ha valutato gli effetti della ferrochina sull'infettività dei gametociti [255]. I topi infettati da *P. yoelli* trattati con 5 mg/kg di ferrochina sono associati a una riduzione del 60% e dell'80 ± 1% del numero di oocisti quando le zanzare venivano nutrite con topi rispettivamente a 1,30 e 5 ore dopo il trattamento con ferrochina. Una riduzione simile nel numero di oocisti è stata osservata anche a 10 mg/kg (riduzione del 70 ± 5% e del 90 ± 2% quando le zanzare venivano nutrite con topi rispettivamente a 1,30 e 5 ore dopo il trattamento con ferrochina) [255]. Tuttavia, è difficile accertare se la riduzione osservata sia dovuta all'attività diretta della ferrochina contro i gametociti o alla sua attività contro gli stadi sporogonici all'interno della zanzara. Infine alcuni studi clinici hanno riportato l'assenza di una significativa riduzione dei gametociti [256,257].



Ferrochina

2.10 AQ-13

AQ-13 è una 4-amminochinolina modificata nella catena propilica attaccata al gruppo amminico. Questo candidato farmaco è simile alla cloroquina in termini di sicurezza, efficacia e profilo farmacocinetico ed è attualmente in studio clinico di fase II per il trattamento della malaria da *P. falciparum* complicata [258]. Quando testato *in vitro* contro i gametociti, AQ-13, proprio come altre 4-amminochinoline, ha colpito efficacemente gli stadi iniziali (IC₅₀: 33-484 nM [67]; 453 nM [85]; 221 nM [48]). La potenza contro gli stadi maturi dei gametociti è minore in saggi gametocitocidi (IC₅₀: 6.0-6.4 μM [67]; 61% di attività a 5 μM [46]; 82% di attività a 40 μM [85]), in saggi di inibizione della gametogenesi (IC₅₀: 15.8 μM [45]; 24,9% di



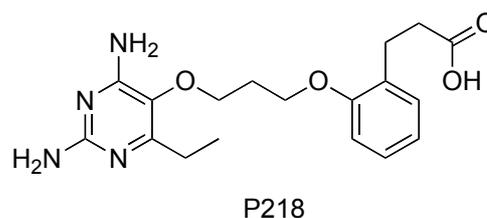
AQ-13

inibizione della formazione di gameti femminili a 5 μM [44]; 50-74% di inibizione dell'exflagellazione a 10 μM [72]) e negli SMFA indiretti su *P. falciparum* (49% di inibizione a 5 μM , [46]; 25-49% di inibizione a 10 μM [72]). AQ-13 è inattivo in saggi SMFA diretti, evidenziando la sua incapacità di interrompere la sporogonia [46]. Si può concludere che negli studi clinici il potenziale di blocco della trasmissione di AQ-13 non è ancora stato dimostrato.

2.11 P218

P218 è un candidato antimalarico progettato contro la diidrofolato reduttasi di *P. Falciparum*, un bersaglio condiviso anche da altri due farmaci antimalarici, la pirimetamina ed il cicloguanile. Gli studi hanno dimostrato che P218 possiede potenza *in vitro* non solo contro i parassiti di *P. falciparum*

sensibili e resistenti alla pirimetamina, ma anche contro *P. chaubaudi* [259]. Non è stata segnalata alcuna significativa attività

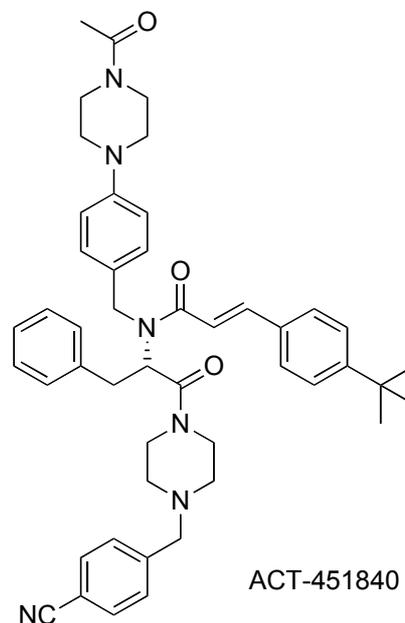


antiplasmodiale contro i vari stadi dei gametociti né nei test gametocitocidi *in vitro* (IC_{50} : 12,5 μM [67]; 0% di attività a 5 μM [46]) né nei test che misurano l'inibizione della gametogenesi femminile (IC_{50} : > 25 μM [45], ~0% di inibizione a 5 μM [44]). Tuttavia, P218 è attivo nell'inibizione della formazione di oocisti in entrambe le varianti di SMFA (inibizione del 99 e 97% a 5 μM in saggio indiretto e diretto, rispettivamente [46]). Ciò suggerisce che, sebbene P218 non abbia alcuna attività gametocitocida diretta, potrebbe possedere un'attività significativa contro gli stadi sporogonici del parassita; quindi può avere un ruolo nel blocco della trasmissione. Ulteriori studi dovrebbero valutare l'effetto di P218 contro le singole fasi di sviluppo sporogonico per confermare ulteriormente l'effetto sporontocida.

2.12 ACT-451840

ACT-451840, sviluppato presso Actelion Pharmaceuticals, è un antimalarico efficace contro più specie di Plasmodium, tra cui *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. berghei* [260,261].

ACT-451840 uccide i gametociti maschili nei saggi di exflagellazione di *P. falciparum* (IC_{50} : 5,89 nM) e successivamente diminuisce la densità delle oocisti (IC_{50} : 30 nM) e la prevalenza delle oocisti (IC_{50} : 104 nM). Tuttavia, non è stata osservata alcuna inibizione della formazione di gameti femminili fino a una concentrazione 20 μ M. Inoltre, non è risultato attivo contro stadi sporogonici del parassita fino a 1 μ M (SMFA diretto). Nell'insieme, questi risultati indicano

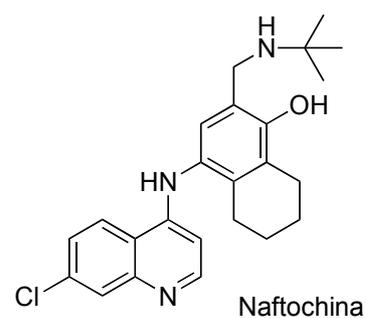


che l'attività di blocco della trasmissione di ACT-451840 è dovuta alla sua attività gametocitocida diretta piuttosto che al suo effetto sugli stadi sporogonici [260]. ACT-451840 risulta ben tollerato fino a dosi di 500 mg e la sua disponibilità aumenta in presenza di cibo [262].

2.13 Artemesinina-naftochina

L'artemesinina-naftochina (ART-NQ) è una nuova terapia antimalarica co-formulata che è stata approvata e commercializzata in vari paesi, tra cui Papua Nuova Guinea [221,263].

Questa combinazione è uno schizonticida molto potente ed è efficace per il trattamento della malaria da *P. vivax* e da *P. falciparum* [264]. La naftochina ha dimostrato una maggiore potenza contro i gametociti allo stadio iniziale (IC_{50} : 14–296 nM) rispetto a quelli maturi (IC_{50} > 4.167 μ M)

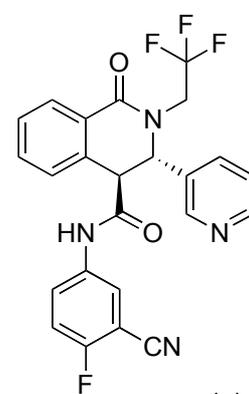


[67]. Questa combinazione è stata associata ad una maggiore circolazione periferica dei

gametociti post-trattamento rispetto ad AL nei pazienti della Papua Nuova Guinea [265]. Il trattamento ART-NQ è collegato ad un aumento della densità dei gametociti post-trattamento, della popolazione di gametociti sequestrati, del tempo di circolazione ematica dei gametociti e del tempo necessario perché la densità dei gametociti scenda al di sotto della soglia di trasmissione. I bambini trattati con ART-NQ diventano gametocitici più velocemente dei bambini del gruppo trattato con AL [266]. Benjamin et al. hanno riferito che i pazienti trattati con ART-NQ (dose singola) sono risultati positivi per i gametociti al 14° giorno dopo il trattamento. Tuttavia, due dosi di ART-NQ sono associate ad una minore circolazione dei gametociti dopo il trattamento rispetto alla dose singola al giorno 14 (20%, circolazione di gametociti a dose singola vs 9%, circolazione di gametociti a doppia dose) suggerendo una relazione dose-risposta e un'ulteriore possibile riduzione della circolazione dei gametociti dopo un regime di trattamento di 3 giorni [267]. Tijitra et al. hanno riportato una riduzione della prevalenza dei gametociti (67,3–28,7% nelle prime 24 ore dopo il trattamento e 18,6% entro il giorno 3, dopo il trattamento con ART-NQ [268]. Non è chiaro se la riduzione riportata sia dovuta all'effetto della sola artemisinina o alla combinazione di artemisinina e naftochina.

2.14 (+)-SJ733

(+)-SJ733 è un candidato clinico a struttura diidroisochinolonica ad azione rapida, molto efficace contro gli stadi asessuati di più ceppi di *P. falciparum* *in vitro*. (+)-SJ733 agisce sulla Na⁺-ATPasi PfATP4, un obiettivo condiviso da altri farmaci in fase di sviluppo, tra cui cipargamina, ed essenziale per la sopravvivenza dei parassiti dello stadio sessuato [269]. Il trattamento di topi infetti con (+)-SJ733, 1 ora prima dell'alimentazione delle zanzare, ha bloccato la formazione di oocisti di *P. berghei* nelle zanzare anofele con una IC₅₀ di 5

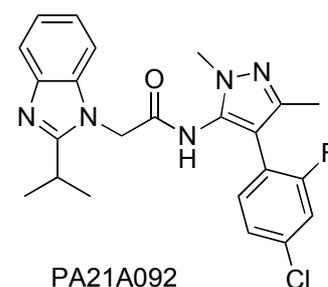


(+) SJ733

mg/kg [270]. A causa della potente attività antimalarica (inclusa l'attività di blocco della trasmissione), un buon profilo farmacocinetico (inclusa una elevata biodisponibilità orale e un buon profilo di sicurezza) ed una minore propensione dei parassiti a diventare resistenti (a causa di scarsa idoneità dei mutanti PfATP-4), questo candidato farmaco ha iniziato gli studi clinici. Uno studio clinico che coinvolge la valutazione dei parametri di blocco della trasmissione (gametocitemia e infettività da zanzara post-trattamento) sta attualmente reclutando pazienti [271].

2.15 PA21A092

PA21A092 appartiene alla classe delle pirazoloammidi e colpisce PfATP4, un bersaglio condiviso anche da due antimalarici in sviluppo clinico - la cipargamina e il composto (+)-SJ733 [269,272]. Questo candidato preclinico è attualmente sottoposto a studi preclinici sulla sicurezza in preparazione dell'inizio degli studi di Fase I [273]. PA21A092 è efficace contro diverse specie di parassiti della malaria, tra cui *P. falciparum* e *P. vivax*. Non solo ha dimostrato una rapida

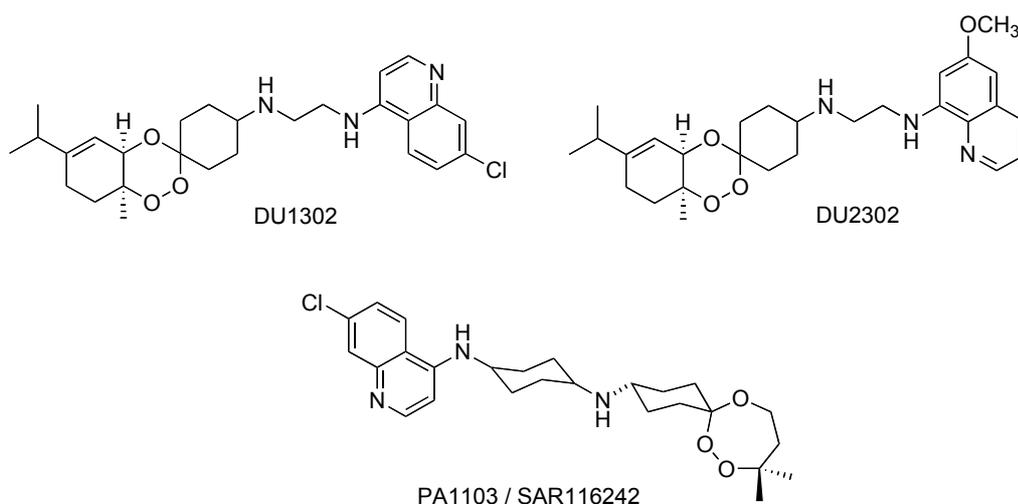


eliminazione dei parassiti asessuati di *P. falciparum*, ma colpisce anche i gametociti maturi, come dimostra la sua capacità di inibire la gametogenesi maschile con una IC_{50} 39 nM e la gametogenesi femminile con una IC_{50} 74 nM [272]. Resta tuttavia da valutare l'attività diretta del composto contro gli stadi sporogonici del parassita all'interno della zanzara.

2.16 Triossachine

Le triossachine sono molecole ibride contenenti due farmacofori - una frazione triossano/triossolano, chiamata anche frazione ozonide (presente nell'artemisinina) e un gruppo 4-amminochinolinico [274]. Un vantaggio intrinseco che le molecole ibride

possiedono è la possibilità di molteplici meccanismi d'azione (a causa della presenza di più farmacofori); quindi, dovrebbero presentare minori possibilità di sviluppo di resistenza ai farmaci [11,15,18,24]. La frazione 4-amminochinolinica è responsabile dell'impilamento dell'eme e dell'inibizione della formazione di emozoina [274], mentre la frazione ozonide provoca l'effetto citocida dovuto all'alchilazione dell'eme [274] e/o all'azione contro le proteine e il proteasoma [275].

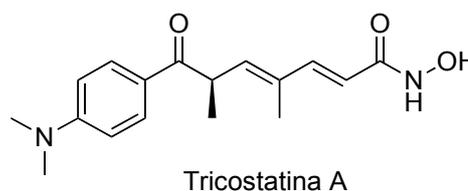


Le triossachine sono agenti antimalarici efficaci *in vitro* e *in vivo* contro gli stadi eritrocitari asessuati dei parassiti sensibili e resistenti alla cloroquina [68]. Due delle prime triossachine, DU1302 e DU2302, sono risultate altamente attive sia contro i gametociti allo stadio iniziale (IC_{50} [DU1302] = 69 nM, IC_{50} [DU2302] = 57 nM) che contro i gametociti allo stadio finale (IC_{50} [DU1302] = 67 nM, IC_{50} [DU2302] = 46 nM). Tuttavia, DU1302 non è stato sviluppato ulteriormente perché era strutturalmente inadatto allo sviluppo clinico a causa della presenza di molti centri chirali [274]. Un composto più recente, PA1103/SAR116242, si è dimostrato molto efficace non solo contro gli stadi eritrocitari asessuati di *P. falciparum* *in vitro* a concentrazioni nanomolari, ma anche contro *P. v. vinckei*/*P. v. petteri* *in vivo*; tuttavia, questo composto non è stato ancora valutato contro i gametociti.

2.17 Tricostatina A

La tricostatina A (TSA) è un antibiotico antimicotico appartenente ad una classe di farmaci chiamati inibitori HDAC che vengono utilizzati per il trattamento del cancro. Il trattamento con gli inibitori dell'HDAC, come la TSA, provoca un'iper-acetilazione degli istoni che porta all'attivazione trascrizionale, responsabile dell'attività degli inibitori dell'HDAC [276].

Sebbene non sia stata riportata alcuna significativa attività gametocitocida diretta contro i gametociti

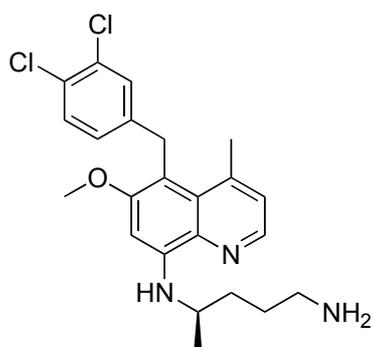


in stadio avanzato utilizzando un test basato sull'ATP a 5 μM [277], è stata osservata una riduzione significativa della vitalità dei gametociti alla stessa concentrazione utilizzando i test basati sull'imaging digitale (IC_{50} stadio precoce = 90 nM, IC_{50} stadio avanzato = 70 nM) e i test basati sulla microscopia (inibizione > 70% della maturazione fino a gametociti in stadio V). Le ragioni esatte di questa variazione del potenziale gametocitocida sono sconosciute, ma la variazione potrebbe essere dovuta ai cambiamenti nel livello di maturità dei gametociti testati (stadio V, nel saggio basato sull'imaging digitale; stadi IV-V, nel saggio basato sull'ATP; stadi III-IV, nel saggio basato sulla microscopia) [277]. La TSA è relativamente meno potente ($\text{IC}_{50} = 0,22 \mu\text{M}$) nei saggi di inibizione dell'exflagellazione in modalità diretta (nessuna precedente incubazione di gametociti maturi con TSA), un'osservazione che suggerisce la mancanza di qualsiasi attività diretta contro i gameti maschili. Un'ulteriore conferma della mancanza di qualsiasi significativa attività gametocitocida è stata ottenuta dall'osservazione della completa assenza di inibizione nella formazione di oocineti nel *Plasmodium berghei* fino a concentrazione 5 μM [277]. Inoltre, dopo aver trattato separatamente i gametociti maturi con TSA a concentrazioni 29 e 260 nM per 1 ora, è stata osservata una riduzione rispettivamente del 21% e del 24% nel numero di zigoti [276]. Analogamente, il trattamento di gametociti di stadio II con TSA a concentrazioni 29 e 260 nM per 48 ore ha portato ad una riduzione rispettivamente del

43% e del 67% nel numero di gametociti che passano allo stadio IV-V. Tuttavia, la TSA non ha causato alcun ritardo nella maturazione dei gametociti. I gametociti delle fasi II-III sono più vulnerabili rispetto a quelli in fase IV/V. In generale, la TSA sembra attiva contro i gametociti (soprattutto nelle fasi iniziali), ma relativamente inattiva contro le forme del parassita presenti all'interno della zanzara. Questo indica anche che l'espressione genica mediata dall'acetilazione dell'istone è presente durante la gametocitogenesi ma assente nelle prime fasi sporogoniche all'interno dell'intestino medio della zanzara [276]. Purtroppo la TSA, attiva anche contro gli stadi eritrocitari asessuati ($IC_{50} = 8-11 \text{ nM}$ [278]), è metabolicamente instabile e citotossica e non è adatta allo sviluppo nella sua forma attuale [279].

2.18 NPC-1161B

NPC-1161B, un analogo della 8-amminochinolina, è l'enantiomero levogiro del (\pm)-8-[(4-ammino-1-metilbutilammino)]-6-metossi-4-metil-5-[3,4-diclorofenossi]chinolin succinato



NPC-1161B

(NPC1161C)). E' un promettente antimalarico sottoposto ad uno degli ultimi stadi dello sviluppo preclinico grazie alla sua attività antimalarica multistadio e alla ridotta tossicità emolitica [280]. NPC1161B, attivo contro gli stadi eritrocitari asessuati con una IC_{50} circa 500 nM, è anche in possesso di attività *in vitro* contro gametociti in

stadio avanzato; tuttavia, l'attività è presente solo in concentrazione micromolare ($IC_{50} = 3,8 \mu\text{M}$ [96]; $4,8 \mu\text{M}$ [85]; $2,03 \mu\text{M}$ [251]; $2,8 \mu\text{M}$ [67]). Nei test funzionali di vitalità, l'exflagellazione di *P. falciparum* è stata completamente inibita alla concentrazione $10 \mu\text{M}$ [72] e nei test SMFA indiretti, lo sviluppo di oocisti è stato inibito del 83% alla concentrazione $5 \mu\text{M}$ [282]. NPC-1161B ha dimostrato minor potenza contro i gametociti femminili ($IC_{50} = 6,07 \mu\text{M}$ [283]; 41,9% di inibizione a concentrazione $5 \mu\text{M}$ [284]; 42%

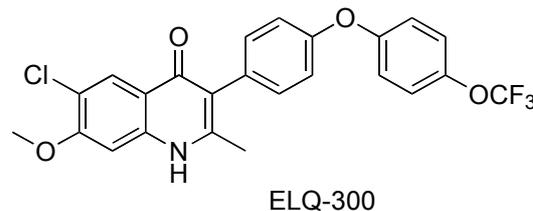
di inibizione sempre a 5 μM [282]). Inoltre, la formazione di oocisti in *P. berghei* è stata inibita di oltre il 90% alla concentrazione 10 μM nel test SMFA diretto, un'osservazione che suggerisce una possibile attività sporontocida in *P. berghei* [72]. Uno studio condotto da Vos *et al.* ha dato risultati contrastanti. In questo studio, nessuna considerevole inibizione della formazione di oocisti è stata osservata in *P. falciparum* usando lo stesso test (27% di inibizione a 5 μM [282]), un'osservazione che indica la mancanza di potenza contro le fasi sporogoniche di *P. falciparum*. Nello stesso studio, è stata osservata una inibizione della formazione di oocisti dell'83% suggerendo che l'inibizione osservata è in gran parte dovuta all'attività diretta contro i gametociti. In contrasto con questa osservazione, un'attività del 16-42% nel saggio pLDH e nell'immunodosaggio di Pfs25 suggerisce invece la mancanza di attività diretta verso i gametociti di *P. falciparum*. I dati attuali sulla potenza necessitano di ulteriori indagini *in vivo* e di studi clinici che valutino la capacità di bloccare la trasmissione.

E' da ricordare che è necessaria una preventiva attivazione metabolica delle 8-amminochinoline (come per la primachina) da parte del CYP2D6 prima che i farmaci di questa classe possano esercitare i loro effetti citocidi [28,202]. La potente attività di blocco della trasmissione di NPC-1161B osservata senza alcuna previa attivazione metabolica in alcuni dei saggi suggerisce una modalità d'azione indipendente [72]; tuttavia, l'esatto meccanismo d'azione rimane ancora da chiarire [285].

2.19 ELQ-300

ELQ-300 appartiene alla classe dei chinolon-3-diarileteri ed è attualmente in fase di studio preclinico [286]. Questa molecola prende di mira il complesso bc1 del citocromo nei mitocondri del parassita e inibisce la sintesi de novo delle pirimidine [287,288]. Non è efficace solo contro gli stadi epatici, gli stadi eritrocitari asessuati e i gametociti, ma anche contro gli stadi sporogonici - zigoti, oocinetti e oocisti [288]. Colpisce anche i gametociti

nei primi stadi (stadi I e II) a concentrazioni 100 nM e impedisce la loro maturazione oltre lo stadio III. Anche i gametociti dell'ultimo stadio sono risultati suscettibili a ELQ-300, come risulta evidente dal basso valore di IC_{50} (71,9 nM). ELQ-300 inibisce la formazione di

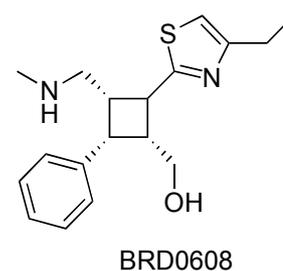


oocineti *in vitro* con una IC_{50} 56 nM. Un blocco completo nella maturazione delle oocisti alla concentrazione 1 μ M e una riduzione > 99% nel numero di oocisti a 100 nM nel saggio SMFA diretto in *P. berghei* hanno evidenziato una potente attività bloccante la trasmissione. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati in saggi di blocco della trasmissione *in vivo*, nei quali a zanzare anofele femmine è stato permesso di nutrirsi di topi infettati da *P. berghei*, pretrattati con ELQ-300 (per 1 ora). Lo studio è proseguito monitorando lo sviluppo delle oocisti all'interno delle zanzare. Al giorno 10 post-infezione, la trasmissione è stata completamente bloccata utilizzando una dose di 0,1 mg/kg. ELQ-300 è anche notevolmente efficace contro le fasi sporogoniche di *P. falciparum* come evidente da una riduzione del 95,9% nella formazione di oocisti a 10 nM in saggio SMFA diretto [288]. Considerando la potente attività gametocitocida e sporontocida, oltre alla sua promettente attività contro gli stadi epatici e quelli asessuati ematici, è stato ipotizzato che ELQ-300 possa essere un farmaco efficace per una terapia a dose singola [288]. In aggiunta ha dimostrato un'interazione sinergica con l'atovaquone, un farmaco dotato di potenziale attività di blocco della trasmissione: questi farmaci agiscono su siti diversi all'interno dello stesso bersaglio farmacologico (citocromo bc1) [287]. Atovaquone e ELQ-300 possono fare parte di una co-formulazione molto efficace che potrebbe essere ulteriormente studiata come terapia di blocco della trasmissione. L'unico limite significativo, tuttavia, è la bassa idrosolubilità di ELQ-300. Questa limitazione è molto probabilmente dovuta alle sue proprietà altamente cristalline. Questa caratteristica sta quindi ostacolando il passaggio dalle fasi precliniche a quelle cliniche. Questa scarsa

solubilità in acqua non ha avuto alcun effetto sulla biodisponibilità orale a dosi più basse, ma si traduce in una diminuzione della biodisponibilità orale a dosi terapeuticamente rilevanti, più elevate, necessarie per stabilire la sicurezza e la tollerabilità [289]. Tenendo conto della sua scarsa idrosolubilità, sono stati sviluppati profarmaci di ELQ-300 con proprietà fisico-chimiche migliorate [286] mantenendo la stessa potenza contro il parassita della malaria. Attualmente si stanno studiando strategie di formulazione come la riduzione delle dimensioni delle particelle e le dispersioni solide per uno dei profarmaci di ELQ-300, ELQ-337, per aumentarne la solubilità e la dissoluzione nel tratto gastrointestinale al fine di migliorarne la biodisponibilità orale [286]. Oltre a ELQ-337, un altro profarmaco, ELQ-331, ad una dose singola di 3 mg/kg è stato recentemente trovato efficace contro *P. yoelli* in un modello murino di infezione da malaria e attivo come farmaco profilattico [290,291]. Tuttavia, il potenziale di blocco della trasmissione dei profarmaci di ELQ-300 rimane ancora da valutare.

2.20 BRD0608

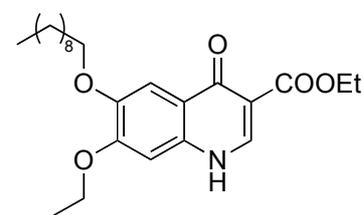
BRD0608 è un composto sperimentale selettivo per i gametociti (stadio V, $IC_{50} = 410-570$ nM) rispetto agli stadi asessuati ($IC_{50} = 7,3$ μ M) [67]. Tali composti selettivi (l'altro esempio è la primachina) se sviluppati come farmaci, potrebbero avere un grande successo nella pratica clinica perché sono meno soggetti alla resistenza farmacologica rispetto ai composti attivi anche contro gli stadi asessuati [11,28,67]. Occorre ricordare che esiste sempre la possibilità di aumentare ulteriormente la potenza dei composti attraverso approcci di chimica farmaceutica.



2.21 Decochinato

Il decochinato o estere etilico dell'acido 6-deossi-7-etossi-4-osso-1*H*-chinolin-3-carbossilico è un noto prodotto veterinario, utilizzato come coccidiostatico nei ruminanti.

Questo composto agisce in modo selettivo e specifico sul citocromo bc1 [292,293], un bersaglio condiviso anche dall'atovaquone. Ad oggi, non sono stati segnalati segni significativi di resistenza crociata con l'atovaquone [294,295]. Il decochinato è indicato come efficace contro

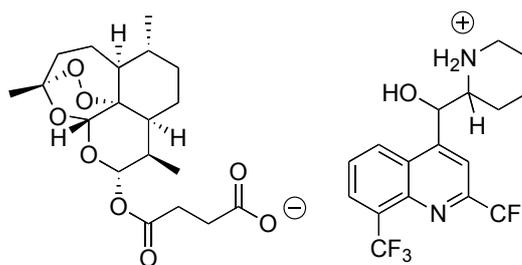


Decochinato

più stadi di *P. falciparum*, compresi gli stadi asessuati e i gametociti. La sua notevole attività contro lo stadio eso-eritrocitario ($IC_{50} = 2,6 \text{ nM}$), e lo stadio asessuato ematico ($IC_{50} = 10 \text{ nM}$), l'attività gametocitocida nelle forme iniziali ($IC_{50} = 36 \text{ nM}$) e la promettente selettività per *P. falciparum* rispetto alle cellule di mammifero lo rendono un potenziale candidato farmaco antimalarico [294]. Non è stata riportata alcuna attività contro gametociti, gameti maturi, oocineti o oocisti. Sebbene il decochinato sia piuttosto selettivo per i parassiti della malaria, la sua scarsa solubilità/permeabilità/stabilità metabolica rappresenta un problema che deve essere affrontato prima di poterlo sviluppare per l'uso umano.

2.22 MEFAS

Il MEFAS, un sale ibrido derivato da due farmaci - meflochina e artesunato - è stato formulato per migliorare ulteriormente l'attività farmacologica dei due farmaci genitori. Il MEFAS sembra ancora più potente contro *P. falciparum* e *P. berghei* e meno citotossico della meflochina o dell'artesunato o di una combinazione di artesunato e meflochina [296,297]. L'attività antimalarica del MEFAS è attribuita alla sua capacità di colpire a livello intracellulare il reticolo endoplasmatico e il vacuolo digestivo, possedendo quindi due distinti meccanismi d'azione nei parassiti del *Plasmodium* [296].



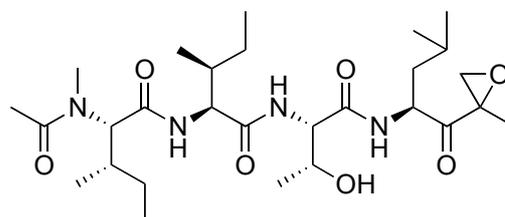
MEFAS

I gametociti maturi si sono dimostrati più suscettibili al MEFAS ($IC_{50} = 4,6 \mu M$) che all'artesunato ($IC_{50} = 12,7 \mu M$) o alla meflochina ($IC_{50} = 16,5 \mu M$) [90]. Ciò è stato ulteriormente confermato nei test di vitalità funzionale, nei quali il MEFAS si è dimostrato più efficace rispetto alla meflochina o all'artesunato, nell'inibire l'exflagellazione dei gametociti maschili ($IC_{50} = 17 \text{ nM}$ per il MEFAS, 120 nM per l'artesunato e 570 nM per la meflochina) e nell'attivazione dei gametociti femminili ($IC_{50} = 20 \text{ nM}$ per il MEFAS, 300 nM per l'artesunato, 5600 nM per la meflochina) [90]. Il MEFAS ha mostrato un immenso potenziale di blocco della trasmissione negli esperimenti preliminari *in vitro*, ma deve ancora essere studiato nei saggi SMFA.

2.23 Epoxomicina e altri inibitori del proteasoma

L'epoxomicina, un inibitore del proteasoma, è un antibiotico derivato dai batteri Actinomiceti. Ha una potente attività antimalarica a concentrazioni nanomolari contro gli stadi eritrocitari asessuati di *P. falciparum*

[137,298,299]. Czesny et al. hanno riportato una riduzione del 77% della gametocitemia microscopica *in vitro* dopo un trattamento di 24



Epoxomicina

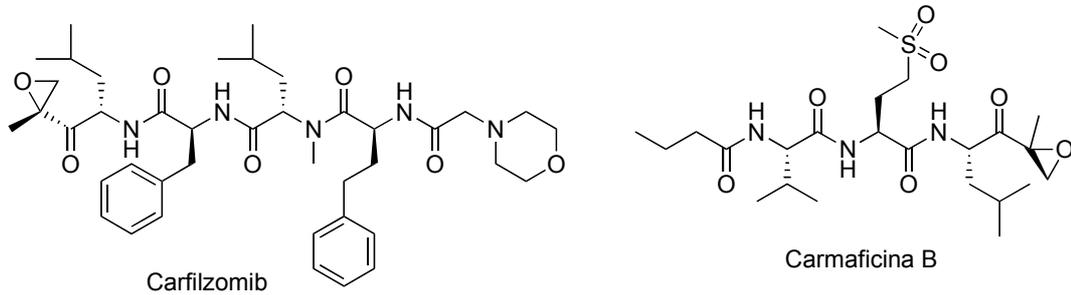
ore con una soluzione 100 nM e una riduzione

completa a 72 ore in concentrazione 10 nM [300]. Si sono verificate deformazioni morfologiche nei gametociti trattati con epoxomicina, con conseguente comparsa di parassiti aghiformi con larghezza di estremità ridotta [298]. Altri studi hanno confermato il

potenziale gametocitocida tardivo dell'epoxomicina attraverso la microscopia ottica ($IC_{50} = 2,87$ nM [301]), in saggi basati su pLDH ($IC_{50} = 7$ nM [301]; $3,9$ nM [302]), in saggi basati su ATP ($IC_{50} = 0,42$ nM [303]; $1,6$ nM [137]), in saggi con AlamarBlue ($IC_{50} = 1,44$ nM [301]) e in saggi basati su immagini digitali ($IC_{50} = 0,66$ nM [85]). Anche se non sembra inibire la gametogenesi maschile, l'epoxomicina alla concentrazione 100 nM ha portato alla completa inibizione dello sviluppo di oocisti (prevalenza e densità) in entrambi i saggi SMFA, indiretto [302] e diretto. Queste osservazioni suggeriscono che l'epoxomicina non è in grado di colpire direttamente i gameti, ma ha un'attività sporontocida, forse contro i zigoti, gli oocineti e le oocisti; tuttavia, il preciso bersaglio nella zanzara resta da chiarire. Nonostante il suo significativo potenziale di blocco della trasmissione, l'epoxomicina non è mai diventata un vero candidato farmaco clinico a causa delle sue scarse proprietà farmaceutiche, dovute alla presenza di uno scheletro peptidico e di una funzione epossichetonica labile, ma fondamentale, che rappresenta il farmacoforo [304]. Inoltre, la mancanza di selettività per i parassiti di *P. falciparum* rispetto alle cellule epatiche G2 [303] o murine 3T3 [298] o A549 [298] non solo evidenzia la sua reattività crociata per il proteasoma dei mammiferi, ma ne ostacola anche lo sviluppo come farmaco per l'utilizzo umano. Tuttavia, queste difficoltà non devono scoraggiare l'uso del proteasoma di *P. falciparum* come bersaglio antimalarico. A riprova di ciò recentemente è stato chiarito che anche l'artemisinina agisce sul proteasoma danneggiando le proteine [275].

È possibile sviluppare sia inibitori più selettivi del proteasoma del parassita che potenti derivati dell'epoxomicina che possiedano migliorate proprietà farmacologiche e potenza simile o aumentata: questi derivati potranno entrare nello sviluppo clinico come candidati farmaci capaci di bloccare la trasmissione del parassita [305]. Il carfilzomib, un inibitore del proteasoma di nuova generazione, è molto attivo contro i gametociti in stadio avanzato ($IC_{50} = 4$ nM [306]) e mostra azione sinergica con l'artemisinina [307]. Anche un altro

inibitore del proteasoma, la carmaficina B ha mostrato una significativa attività gametocitocida contro i gametociti allo stadio V ($IC_{50} = 160 \text{ nM}$ [305]).

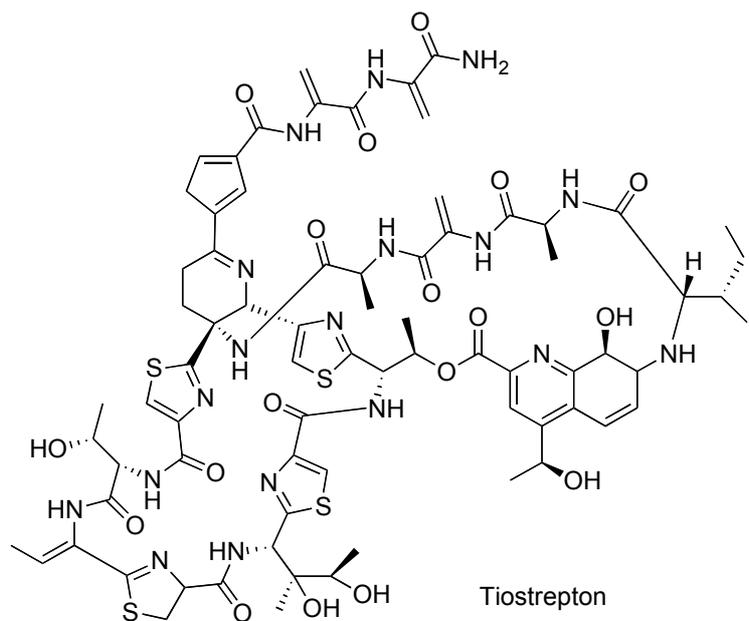


Purtroppo, come già riscontrato per l'epoxomicina, anche la carmaficina B è tossica per le cellule ospiti. Tuttavia è già stata descritta una nuova classe di antimalarici, basata sulla struttura della carmaficina B, caratterizzata da ridotta tossicità verso le cellule di mammifero e paragonabile attività gametocitocida [305].

2.24 Tioestrepton

Il tioestrepton è un antibiotico tiopeptidico con attività antimalarica attribuita alla sua azione sul ribosoma del parassita (sia ribosomi apicoplastici [308] che ribosomi mitocondriali [309]) e sul proteasoma 20S [308]. Il tioestrepton possiede una debole attività (a livello micromolare) contro i parassiti eritrocitari asessuati di *P. falciparum* quando è incubato per 48 ore o meno [308].

Tuttavia, l' IC_{50} variava di tre volte tra i gruppi di



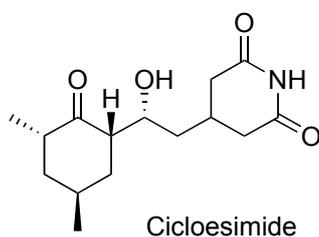
incubazione di 48 e 96 ore e di quattro volte tra i gruppi di incubazione di 48 e 120 ore a causa di un fenotipo di morte ritardata mostrato dal tioestrepton per la sua attività sugli

apicoplasti [308]. Il trattamento dei gametociti in fase iniziale con tiostrepton ad una concentrazione $< 10 \mu\text{M}$ per 48 h ha portato alla completa inibizione della maturazione dei gametociti in fase iniziale fino agli stadi tardivi [308]. Duffy e Avery ($\text{IC}_{50} = 959 \text{ nM}$ [85]) e Plouffe et al. ($\text{IC}_{50} = 2,8\text{-}3,4 \mu\text{M}$ [67]) hanno a loro volta trovato che il tiostrepton ha come bersaglio i gametociti in fase iniziale. I ricercatori che hanno valutato la potenza del tiostrepton contro i gametociti maturi hanno riportato una potenza variabile ($\text{IC}_{50} = 556 \text{ nM}$ [85]; $1 \mu\text{M}$ [281]; $1,8\text{-}3,2 \mu\text{M}$ [67]; $10,8\%$ di attività a $5 \mu\text{M}$ [284]). Il potenziale gametocitocida nelle forme mature è stato ulteriormente confermato nei test di inibizione della gametogenesi ($\text{IC}_{50} = 96 \text{ nM}$ (inibizione della formazione dei gameti maschili) e $1,4 \mu\text{M}$ (inibizione della formazione dei gameti femminili) [310]; 270 nM (24 h) e 120 nM (48 h) (sia per i gametociti maschili che per quelli femminili) [283]; $< 10\%$ di inibizione della formazione dei gameti femminili a $5 \mu\text{M}$ [284]; $74,2\%$ di inibizione della formazione dei gameti maschili e $26,2\%$ di quella dei gameti femminili a $1 \mu\text{M}$ [311]; 100% di inibizione della formazione dei gameti maschili a $10 \mu\text{M}$ [72]). Inoltre, il tiostrepton ha inibito la formazione degli oocineti di *P. berghei* del $75\text{-}99\%$ a $10 \mu\text{M}$ *in vitro* [72] e ha dimostrato un blocco $> 50\%$ nella formazione degli oocineti dopo il trattamento di gameti/zigoti con tiostrepton alla concentrazione $10 \mu\text{M}$, dimostrando così un'attività contro i gameti/zigoti di *P. berghei* [71]. L'incubazione del tiostrepton con oocineti maturi inibisce significativamente il loro sviluppo in oocisti (inibizione $> 50\%$ a $10 \mu\text{M}$), un'osservazione che conferma la sua attività sui gameti/zigoti [71]. Tiostrepton è anche attivo contro le oocisti giovani: l'incubazione di giovani oocisti con tiostrepton alla concentrazione $10 \mu\text{M}$ ha bloccato completamente la loro maturazione ($\text{IC}_{50} = 1,16 \mu\text{M}$) [71]. Per convalidare ulteriormente queste osservazioni, le zanzare infette (zanzare sane prealimentate su topi infettati da *P. berghei*) sono state successivamente alimentate con soluzione acquosa $50 \mu\text{M}$ di tiostrepton. Questa azione non solo ha portato ad una diminuzione superiore al 75% nel numero di oocisti/intestino medio, ma ha anche ostacolato lo sviluppo degli sporozoit

(> 4×10^4 sporozoi/zanzara rispetto a $< 10^4$ nel gruppo trattato con tiostrepton) [71]. Questi risultati, nel loro complesso, confermano che il tiostrepton sembra avere attività contro gli stadi sporogonici del parassita tra cui gameti/zigoti, oocineti e oocisti. Il potenziale del tiostrepton nel colpire più stadi vitali del parassita, compresi gli stadi epatici, eritrocitari asessuati, sessuati e sporogonici, lo rende un candidato attraente per la somministrazione come farmaco antimalarico [72]. Inoltre, la capacità del tiostrepton di agire su più siti bersaglio e la sua modalità d'azione distinta da quella degli attuali antimalarici lo rende meno suscettibile alla resistenza farmacologica.

2.25 Cicloesimide

La cicloesimide è un inibitore della sintesi proteica che, in particolare, agisce sulla fase di traduzione delle proteine in *P. falciparum* [312]. Colpisce le fasi asessuate di *P. falciparum*



con potenza nanomolare [72,303,313] dimostrandosi più attiva contro i gametociti in fase iniziale ($IC_{50} = 119$ nM [313]; 640 nM-1,9 μ M [67]; 26% di attività a 5 μ M [284]) rispetto agli stadi tardivi ($IC_{50} = 477$ nM-2,6 μ M [67]; 2,3 μ M

[281]; 6,23 μ M [303]) in saggi per valutare l'attività gametocitocida in modo diretto [11].

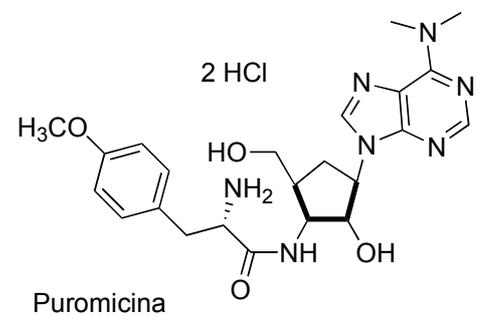
Tuttavia, la cicloesimide si è dimostrata estremamente potente anche contro i gametociti maturi di *P. falciparum* nei test di inibizione della gametogenesi (100% di blocco dell'exflagellazione a 10 μ M [72]; 100% di inibizione della formazione di gameti femminili a 5 μ M ($IC_{50} = 480$ nM) [284]; 86,9% di inibizione della formazione di gameti femminili a 10 μ M ($IC_{50} = 1$ μ M) [283]). La mancanza di potenza osservata contro i gametociti maturi valutati mediante pLDH e altre misure di vitalità non funzionale e l'alta potenza osservata nei saggi di vitalità funzionale può essere spiegata dal fatto che la cicloesimide è un inibitore della sintesi proteica e i gametociti in fase avanzata svolgono una sintesi proteica *de novo* minima. Inoltre, il processo di gametogenesi comporta la

sintesi di proteine da mRNA pre-sintetizzati immagazzinati all'interno del gametocita. Per esempio, la gametogenesi femminile richiede la traduzione dell'mRNA di una proteina che reprime l'inibizione dello sviluppo dello zigote (DOZI) così come richiede il fattore Pfs25 [284,310].

La cicloesimide inibisce fortemente la formazione di oocinetti *in vitro* in *P. berghei* ($IC_{50} = 25$ nM) quando viene co-incubata con gametociti maturi [72]. Allo stesso modo, Azevedo et al. hanno scoperto che in gameti/zigoti di *P. berghei*, incubati con cicloesimide alla concentrazione 10 μ M, veniva inibita la formazione di oocinetti oltre il 50%. Lo stesso studio ha anche riportato l'inibizione dello sviluppo precoce delle oocisti (> 40%, farmaco aggiunto agli oocinetti) e la maturazione delle oocisti ($IC_{50} = 280$ nM, farmaco aggiunto sulle oocisti precoci) [71]. Il basso grado di selettività della cicloesimide per i parassiti rispetto alle cellule dei mammiferi e gli effetti collaterali associati - danni al DNA, teratogenesi e altri effetti riproduttivi – rappresentano seri ostacoli per il suo sviluppo come farmaco gametocitocida [72].

2.26 Puromicina

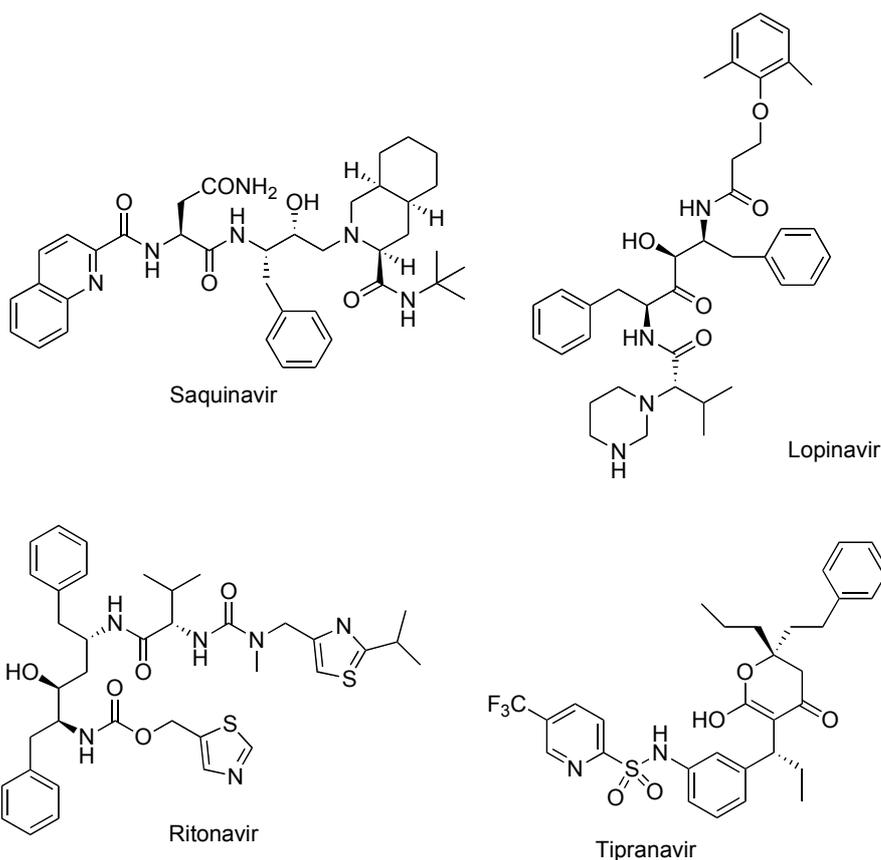
La puromicina è un antibiotico amminonucleosidico, in particolare un inibitore della traduzione delle proteine che colpisce la subunità maggiore del ribosoma [273,314]. Gli studi hanno dimostrato una forte potenza della puromicina contro i gametociti di stadio iniziale ($IC_{50} = 103-123$ nM [67]; 144,5 nM [313]) e contro i gametociti di stadio avanzato ($IC_{50} = 48$ nM [95]; 201,5 nM [302]; 1,049 μ M [306]; 110-122 nM [67]; 610 nM [315]). Il trattamento dei gametociti maturi con puromicina 5 μ M per 1 ora ha portato ad una completa inibizione della formazione dei gameti femminili [284]. Non esiste alcuno studio che valuti l'attività di blocco della trasmissione della



puromicina contro gli stadi sporogonici dei parassiti della malaria umana. Tuttavia occorre notare che gli antibiotici dovrebbero essere usati con cautela come agenti antimalarici bloccanti la trasmissione della malattia.

2.27 Inibitori della proteasi dell'HIV

La malaria e l'infezione da HIV sono co-endemiche in molte parti del mondo, incluso il subcontinente africano, e aumentano la reciproca patogenicità [316]. Molti degli inibitori delle proteasi dell'HIV (PI), utilizzati nel trattamento delle infezioni da HIV, possiedono anche un'attività anti-plasmodiale contro i molteplici stadi del ciclo vitale dei parassiti della malaria *in vitro* e *in vivo* [316-320] e in studi clinici [321,322].



La letteratura suggerisce che i bersagli degli inibitori della proteasi dell'HIV nei parassiti del *Plasmodium* sono le aspartil-proteasi [323,324], in particolare le plasmepsine VI, VII, VIII e IX [317,321]; tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini di conferma [325]. Hobbs et al. hanno riferito che la combinazione saquinavir (10 e 20 μM), lopinavir (10 e 20 μM),

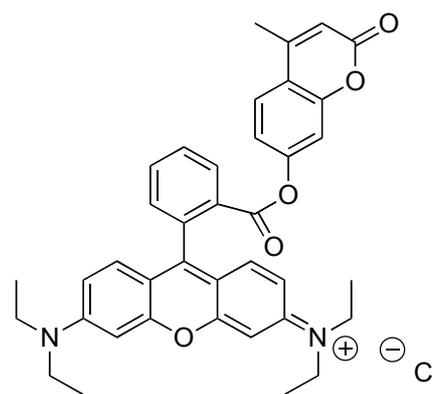
lopinavir/ritonavir (5 μM /1 μM , 10 μM /2 μM e 20 μM /4 μM) ha ridotto significativamente la vitalità dei gametociti nelle fasi iniziali (fasi II e III) [317]. Il saquinavir ha ridotto significativamente la vitalità dei gametociti negli ultimi stadi (IV e V) alla concentrazione 20 μM ma non a quella 10 μM . Il lopinavir è stato efficace sia a 10 che a 20 μM . Una significativa riduzione della vitalità dei gametociti negli ultimi stadi è stata osservata con una combinazione di lopinavir/ritonavir (10 μM /2 μM e 20 μM /4 μM). Inoltre, il saquinavir, il lopinavir e il ritonavir hanno anche influito sulla morfologia dei gametociti precoci e tardivi. Una significativa riduzione del numero di oocisti è stata osservata quando i gametociti maturi trattati con lopinavir o saquinavir 5 μM per 72 ore sono stati ingeriti da zanzare *Anopheles stephensi* (saggio SMFA indiretto); tuttavia, la completa riduzione delle oocisti è stata ottenuta solo a concentrazione 20 μM [317]. I dati attuali suggeriscono che i farmaci antiretrovirali come saquinavir, lopinavir e ritonavir riducono la vitalità dei gametociti a concentrazioni clinicamente rilevanti e possono avere un impatto sulla trasmissione della malaria.

In uno studio clinico condotto in Uganda su bambini, la combinazione lopinavir/ritonavir è risultata associata a un rischio significativamente più basso di gametocitemia rispetto all'uso di un inibitore non-nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI) - nevirapina o efavirenz, sia al momento della diagnosi di malaria (rischio: 6.6% per il lopinavir/ritonavir contro il 14,5% per NNRTI) che dopo 28 giorni dalla diagnosi di malaria (rischio: 3,4% per il lopinavir/ritonavir contro il 6,5% per NNRTI) [326]. Il ritonavir in monoterapia, sebbene attivo contro gli stadi asessuati di *P. falciparum*, non è affatto efficace contro i gametociti [317]. Il tipranavir, un inibitore non peptidico delle proteasi, inibisce significativamente la gametocitogenesi *in vitro* (IC_{50} = 12-21 μM) e possiede un'attività gametocitocida diretta [327]. Va notato che questo studio non è stato condotto per valutare l'attività dei farmaci contro una specifica popolazione di gametociti in termini di maturità, ma ha incluso invece tutti i gametociti che esprimono Pfs16, cioè le fasi I-V [327,328].

Considerando la sovrapposizione geografica tra le incidenze di HIV e malaria e la possibilità di somministrazione di farmaci anti-HIV in pazienti affetti da malaria, diventano necessari ulteriori studi *in vitro* e clinici per approfondire la comprensione sull'uso dei trattamenti anti-HIV nella riduzione della trasmissione della malaria.

2.28 Coloranti sintetici

Molti coloranti sintetici sono noti per le loro proprietà antimicrobiche. Coloranti come il blu di metilene [29], l'eosina B [329] e la rodamina 123 [330] hanno dimostrato un potenziale antimalarico. Il blu di metilene, come già riportato, è uno dei più antichi antimalarici sintetici con un significativo potenziale di blocco della trasmissione. Tra gli altri coloranti sintetici, il Mito-Red, il diesilossacarbocianina ioduro (DiOC6), la rodamina B, l'hoechst 33342 e il SYTO 9 hanno dimostrato una potenza nanomolare contro i gametociti maturi, con il Mito-Red che si è dimostrato il più potente ($IC_{50} = 70$ nM) [137]. Questi coloranti fluorescenti, specialmente il MitoRed, dimostrano un'elevata



Mito-Red

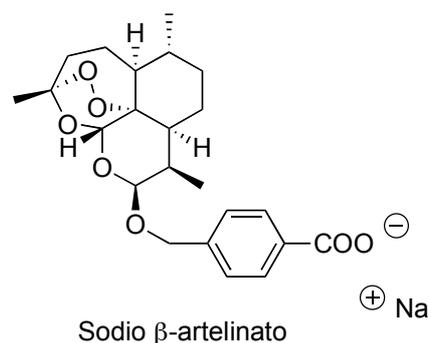
attività gametocitocida *in vitro* e dovrebbero essere studiati ulteriormente per le loro proprietà di blocco della trasmissione. Tuttavia, il potenziale sporogonico dei coloranti diversi dal blu di metilene rimane da valutare. Ulteriori indagini sull'attività di blocco della trasmissione di tali coloranti sintetici sono giustificate perché questi possono rappresentare punti di partenza per la progettazione di nuovi farmaci capaci di bloccare la trasmissione della malattia [137].

2.29 β -Artelinato di sodio

Il β -artelinato di sodio, un analogo idrosolubile dell'artemisinina, non è solo un efficace schizonticida ematico, ma anche un comprovato agente gametocitocida monodose nel modello di scimmia di *P.*

cynomogi B [331,332]. Tuttavia non ci sono studi

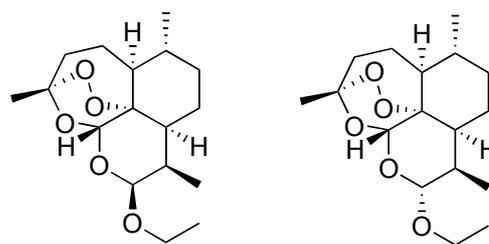
recenti che valutano l'attività di blocco della trasmissione del β -artelinato di sodio contro il *P. falciparum*.



2.30 $\alpha\beta$ -Arteetere

L' $\alpha\beta$ -arteetere è una miscela racemica di un etere etilico dell'artemisinina ed è uno schizonticida ematico ad azione rapida già approvato in India come trattamento alternativo per il *P. falciparum* multifarmaco resistente [333].

L' $\alpha\beta$ -arteetere si è dimostrato un efficace gametocitocida contro il *P. cynomolgi* alla dose di



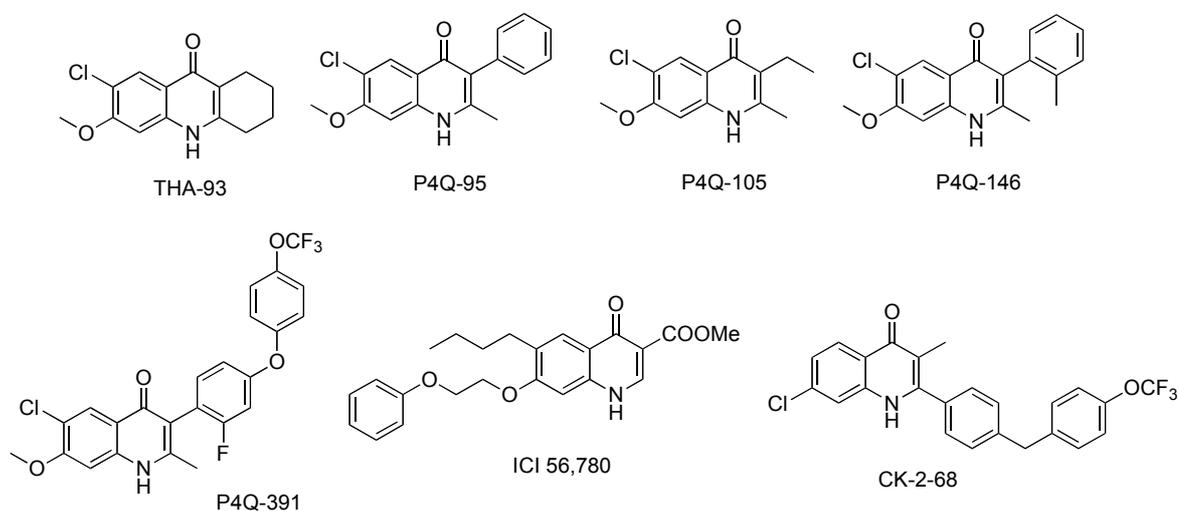
α / β Arteetere

10 mg/kg per via orale [334] e alla dose intramuscolare di 2,5-5 mg/kg [335]. Non è stato riportato alcun effetto sporontocida fino a quando non è stato utilizzato alla dose intramuscolare di 50 mg/kg. La scarsità di dati sull'attività gametocitocida di questo farmaco contro i parassiti della malaria umana ne ostacola l'ulteriore esplorazione come agente bloccante della trasmissione.

2.31 4-(1H)-Chinoloni e tetraidroacridoni

I 4-(1H)-chinoloni sono eterocicli che presentano essenzialmente attività antibiotica, ma gli studi hanno evidenziato anche altre loro proprietà: antivirali [336], anticitotossici [337], antiossidanti [338] e antimalarici (soprattutto i chinoloni endochino-simili [ELQ])

[289,295]. Una di queste classi di chinoloni, le endochine o ELQ è risultata molto efficace contro gli stadi asessuati e ha attività gametocitocida verso i parassiti della malaria *in vitro* [288,295]. Uno dei principali esempi di questa classe, è il composto ELQ-300, precedentemente trattato. Altri composti di questa classe, tra cui i 3-alkil- e 3-aril-4(1*H*)-chinoloni, hanno dimostrato la loro efficacia contro gli stadi asessuati, epatici e contro le forme responsabili della trasmissione di *P. falciparum* [339,340,341-344]. Molti studi hanno riportato la potente attività nella fase asessuata di molti 4-(1*H*)-chinoloni, tra cui THA-93, P4Q-95, P4Q-105, P4Q-146 e ICI 56.780 [339,345,346].



P4Q-146 e ICI 56.780 sono attivi anche contro gli stadi epatici di *P. berghei* [344]. Gli acridoni sono strutturalmente correlati ai chinoloni e contengono lo stesso scheletro 4-osso-1,4-diidrochinolonico. Sáenz et al. hanno valutato il potenziale di blocco della trasmissione di P4Q (3-fenil-4-(1*H*)-chinoloni), PEQ (7-(2-fenossietossi)-4-(1*H*)-chinoloni) e THA (1,2,3,4-tetraidroacridoni) [343]. E' stato evidenziato un chiaro effetto dose-risposta sulla gametogenesi maschile dal momento che l'incubazione di gametociti in fase iniziale con soluzioni 100 nM di questi composti ha ridotto significativamente l'exflagellazione (93% per THA-93, 69% per P4Q-105, 100% per P4Q-146 e ICI-56,780). Aumentando ulteriormente le concentrazioni a 1 e 10 μ M è stata completamente inibita l'exflagellazione. L'incubazione di gametociti maturi con soluzioni 100 nM di P4Q-105,

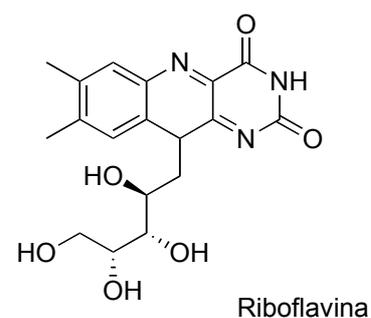
P4Q-146 e ICI 56.780 (derivato carbossilico chinolonico) ha inibito significativamente l'exflagellazione rispettivamente del 93%, 99% e 99%: per tutti i composti l'exflagellazione è stata completamente bloccata alla concentrazione 10 μ M.

Questi risultati sono stati ulteriormente convalidati sul *P. falciparum* in saggi SMFA indiretti, in cui, il trattamento dei gametociti allo stadio iniziale con soluzione 1 μ M di THA-93, ICI 56.780, P4Q-146, P4Q-95 e P4Q-105 ha ridotto la prevalenza di oocisti di oltre il 90% e il trattamento dei gametociti allo stadio finale con la stessa concentrazione ha ridotto la prevalenza di oocisti di oltre l'80%. Inoltre, l'incubazione di gametociti allo stadio iniziale con soluzioni 1 μ M di questi composti ha portato ad una riduzione > 99% nel numero di oocisti per zanzara e l'incubazione di gametociti allo stadio finale con la stessa concentrazione ha portato ad una riduzione > 96%. Quando i gametociti maturi di *P. falciparum* miscelati con soluzione 1 μ M di ICI 56.780 sono stati somministrati (saggio diretto) alle zanzare *Anophele*, la prevalenza di infezioni delle ghiandole salivari è diminuita dell'80%. Questa osservazione ha evidenziato l'attività sporontocida di ICI 56.780. Anche altri composti hanno diminuito la prevalenza dell'infezione delle ghiandole salivari, ma i risultati non sono stati statisticamente significativi. Questi studi sono stati valutati *in vivo* sul modello murino di *P. berghei* per valutare l'effetto di blocco della trasmissione di questi composti sulla trasmissione di *P. berghei* dal topo alla zanzara. I topi trattati con 1 mg/kg e oltre di ICI 56.780 e P4Q-146 non hanno trasmesso l'infezione alle zanzare, ma concentrazioni minori di ICI 56.780 sono risultate inefficaci nel prevenire la trasmissione. THA-93 e P4Q-95 non sono stati in grado di prevenire l'infezione alle zanzare anche alla dose di 10 mg/kg. I topi infettati da *P. berghei* trattati con 1 mg/kg di ICI 56.780 sono risultati non infettivi per le zanzare *Anophele* fino a 12 ore dopo il trattamento [343]. Questi chinoloni potrebbero interferire con le funzioni del citocromo bc1, ma la modalità esatta di azione non è ancora del tutto chiarita [295,339,345]. Un altro composto correlato a questa classe, CK-2-68, ha bloccato l'exflagellazione dei gametociti di *P. falciparum* con una IC₅₀

10 μM e ha inibito la produzione di oocineti di *P. berghei* con una IC_{50} 73 nM [340]. Anche il già ricordato decochinato, a struttura carbossichinolonica non solo ha colpito i gametociti in fase iniziale con potenza nell'intervallo nanomolare ($\text{IC}_{50} = 36$ nM), ma ha anche dimostrato una notevole potenza contro le forme asessuate ($\text{IC}_{50} = 10$ nM) e gli stadi eso-eritrocitari ($\text{IC}_{50} = 2,6$ nM) di *P. falciparum*. Tuttavia, il potenziale anti-plasmodiale contro i gametociti in stadio avanzato direttamente responsabili della trasmissione della malaria rimane da valutare. Nel loro insieme, questi risultati indicano che i chinoloni possono essere efficaci antimalarici multistadio con la possibilità di bloccare la trasmissione della malaria da *P. falciparum*.

2.32 Riboflavina

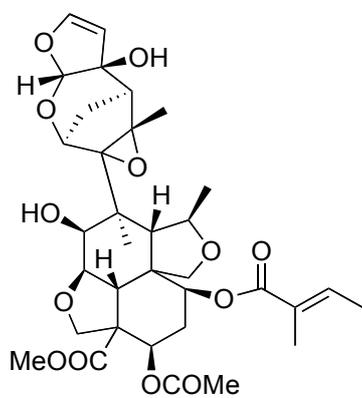
La vitamina B2 o riboflavina, una vitamina idrosolubile, è stata identificata per la prima volta come antimalarico per lo stadio asessuato più di due decenni fa [347]. Sebbene non sia stata riscontrata alcuna significativa attività gametocitocida verso le forme allo stadio iniziale ($\text{IC}_{50} > 12,5$ μM [67]) o attività gametocitocida delle forme in fase avanzata ($\text{IC}_{50} > 12,5$ μM [67]; > 25 μM [283]; 16,6% di attività a 5 μM [284]), alla concentrazione 100 μM riduce del 100% la gametocitemia al 15° giorno (riboflavina aggiunta ai gametociti di fase I). Quando i gametociti di stadio II e III sono stati trattati con la stessa concentrazione di riboflavina, la riduzione della gametocitemia al 15° giorno scende al 57%; tuttavia, l'eliminazione completa è stata raggiunta solo al 18° giorno. A seguito di trattamento dei gametociti maturi con riboflavina, non è stata osservata alcuna riduzione significativa nella gametogenesi maschile ($< 25\%$ di inibizione a 10 μM [72]) o femminile (13,3% di inibizione a 5 μM [284]; $\sim 0\%$ di inibizione a 10 μM [310]). Pertanto, l'uso della riboflavina come agente di blocco indipendente dalla trasmissione è limitato. Tuttavia, il



potenziale gametocitocida dovrebbe essere esplorato a dosi più elevate (intervallo micromolare): la riboflavina a queste alte dosi può essere tollerata nella popolazione umana a causa dell'assenza di effetti collaterali. La riboflavina non solo ha dimostrato promettenti interazioni sinergiche con meflochina, pirimetamina e chinina, ma ha anche migliorato l'attività di questi antimalarici verso le forme asessuate. Inoltre sembra che attenui l'effetto ossidante di molti farmaci. Pertanto, ha un certo potenziale per essere utilizzata in combinazione con gli attuali farmaci antimalarici [348].

2.33 Neem

Il Neem o *Azadirachta indica* possiede una miriade di proprietà tra cui antimalarica [349-351], antibatterica [352,353], insetticida (anche contro i vettori della malaria) [354,355], anticancro [356], contraccettiva [357] e sedativa [358]. Oltre alle proprietà antimalariche dirette [349-351], sono riportati anche effetti profilattici in India [359] e in Burkina Faso [360]. L'azadiractina, un limonoide, è il componente attivo primario del neem e possiede potenziale antimalarico a causa della sua azione sul sistema citoscheletrico del parassita [361]. Oltre all'azadiractina, il potenziale anti-plasmodiale del neem è attribuito alla presenza di altri costituenti attivi - gedunina, nimbolide, quercetina e rutina [351,362-365]. L'azadiractina previene la formazione di gameti maschili mobili in *P. berghei* con una IC_{50}



Azadiractina

3,5 μM e ha completamente inibito l'exflagellazione in *P. falciparum* alla concentrazione 100 μM [351]. Inoltre, due frazioni di neem, PNE ed ENM sono risultate più attive della terza frazione ENS a 0,125% v/v e 0,25% v/v contro gametociti precoci e tardivi [350]. Due frazioni (IRDN-A e IRDN-B) ottenute da un estratto di foglie di neem hanno portato alla lisi completa dei gametociti di stadio precoce e

tardivo a 1 e 100 $\mu\text{g/mL}$ rispettivamente (IC_{50} per IRDN-A e IRDN-B contro i gametociti

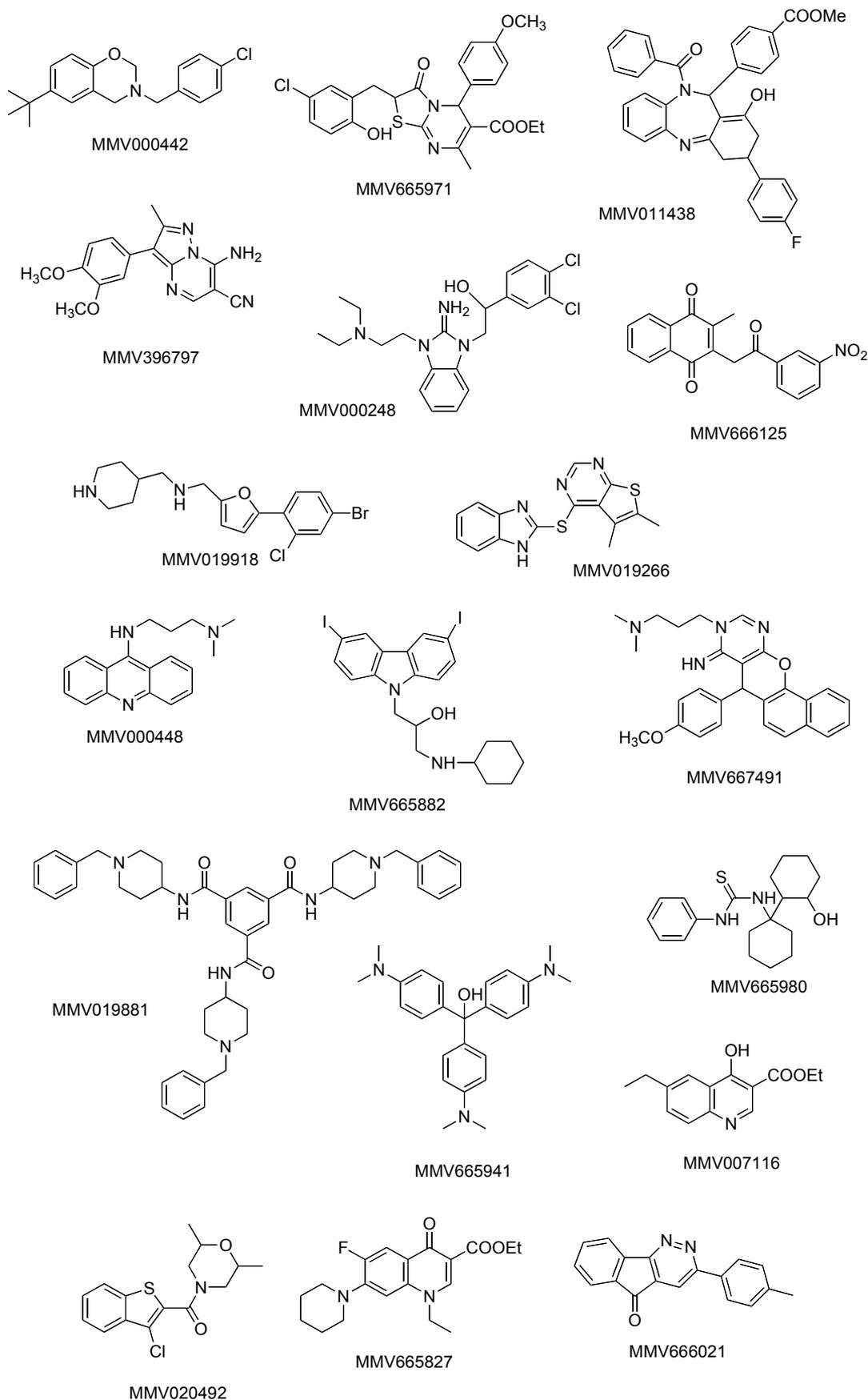
di stadio precoce e tardivo = 10^{-3} $\mu\text{g/mL}$) [366]. Un estratto standardizzato di semi di neem disponibile in commercio, 'NeemAzal' (ricco di azadiractina: azadiractina A [34%], azadiractina B e azadiractina K [16%]) è stato esaminato per l'attività sporontocida nel modello di trasmissione 'da topo a zanzara a topo' [349]. In questo studio, la formazione di oocineti e lo sviluppo di oocisti sono stati completamente bloccati all'interno delle zanzare *Anopheles stephensi*, quando le zanzare sono state alimentate con il sangue di topi gametocitemici trattati con 50 mg/kg di 'NeemAzal'. Questo blocco completo della trasmissione è stato ulteriormente confermato quando i topi sani non infetti, punti da queste zanzare, non hanno mostrato alcuna oocisti. Tuttavia, durante la dissezione dell'intestino medio sono stati osservati zigoti e forme post-zigotiche (forme precedenti agli oocineti), ma questi erano di numero inferiore e di morfologia anomala. Poichè non sono stati osservati oocineti maturi dopo trattamento con 50 mg/kg di 'NeemAzal', questo estratto probabilmente interferisce con la gametogenesi e lo sviluppo dell'oocinete. 'NeemAzal' alla dose di 50 mg/kg non dimostra di interrompere la maturazione delle oocisti durante la sua incubazione con oocisti precoci, suggerendo la mancanza di qualsiasi attività contro queste forme. L'inibizione osservata della gametogenesi e della formazione di oocisti è stata attribuita alla modalità di azione mirata ai microtubuli dell'azadiractina [349,361]. Questi risultati concordano bene con altri risultati ottenuti da studi *ex vivo* su isolati di *P. falciparum*. Sangue gametocitemico raccolto da pazienti quando miscelato con 70 ppm di 'NeemAzal' e somministrato alle zanzare *Anopheles coluzzii*, bloccava completamente la trasmissione del parassita, mentre anche 60 ppm di 'NeemAzal' erano efficaci, dal momento che le zanzare di quattro gruppi su cinque rimanevano non infette. Un estratto, ottenuto con acetato di etile, delle foglie di neem ha dimostrato una riduzione del 59% della prevalenza delle oocisti e una riduzione del 90,5% della densità delle oocisti [367]. NeemAzal ha dimostrato di essere superiore alla azadiractina A come agente bloccante la trasmissione nel modello di *P. berghei* (IC_{50} = 6,8 $\mu\text{g/mL}$ per 'NeemAzal' contro 12,4

$\mu\text{g/mL}$ per azadiractina A) [368]. Una possibile ragione per la superiorità del 'NeemAzal' potrebbe essere la presenza di altri composti bioattivi che contribuiscono alla sua elevata potenza. Altri principi attivi dell'estratto di semi di neem, limonoide e deacetilnimbina, inibiscono lo sviluppo di oocinetti di *P. berghei* ($\text{IC}_{50} = 6\text{-}25 \mu\text{M}$ [369]). Considerando la migliore stabilità della deacetilnimbina al calore e alla luce rispetto all'azadiractina A (la maggior parte dei paesi endemici della malaria hanno condizioni tropicali) e la potenza contro gli stadi sporogonici di *P. berghei*, sono auspicabili ulteriori indagini sulla deacetilnimbina contro gli stadi sporogonici di *P. falciparum*. Collettivamente questi risultati indicano che il neem e i suoi costituenti dovrebbero essere ulteriormente esplorati per il loro potenziale di blocco della trasmissione della malaria. Formulazioni standardizzate di neem possono essere sviluppate per diminuire la variabilità e possono essere studiate come strumenti aggiuntivi per integrare i farmaci antimalarici esistenti. Tuttavia, dovrebbero essere considerati e studiati a fondo i rischi di tossicità e i possibili effetti immunomodulatori [370,371].

2.34 MMV malaria box

MMV malaria box è una libreria aperta di 400 composti che rappresentano diversi chemiotipi ed è offerta gratuitamente ai ricercatori di tutto il mondo con una sola condizione: rendere pubblici i dati di screening [372]. Gli investigatori hanno sottoposto a screening questo insieme di composti in saggi variabili e contro vari stadi parassitari e con soglie diverse per la classificazione dei composti in attivi/non attivi. Anche le procedure di lettura degli screening, il ceppo di parassita, il tempo di incubazione, i mezzi di analisi e l'integrazione del siero sono diversi in questi studi, con conseguente variazione della potenza. Pertanto, il confronto diretto dei dati di potenza tra questi studi è difficile [373]. La maggior parte dei saggi si è concentrata sulla classificazione dei composti in hits (attivi)

o non hits (inattivi) in base alla loro attività/risposta ad una singola concentrazione, invece di valutare le relazioni dose-risposta.



Van Vorhis et al. hanno compilato dati sull'attività dei farmaci ottenuti da 55 gruppi con l'utilizzo di oltre 290 saggi, che includono anche saggi di blocco della trasmissione [374]. Lucantoni et al. hanno compilato i dati pubblicati sull'attività gametocitocida e hanno identificato un set di 39 composti chiamato Gametocytocidal Comparison Set, che consisteva di composti che mostravano attività in almeno uno dei saggi e li hanno testati utilizzando tre diversi saggi (saggio della luciferasi, saggio basato sull'attività mitocondriale dei gametociti maturi [GFP; mitocondri (MTR)] e l'altro sulla formazione di gameti femminili [AO; gamete (GMT)]), tre diversi tempi di incubazione (24, 48 e 72 h) e due diverse concentrazioni (5 e 10 μM) [373].

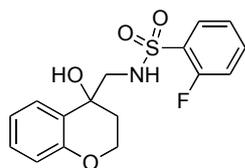
Questo studio si è basato sull'ipotesi che i composti classificati come attivi in più saggi abbiano più possibilità di essere di successo rispetto a quelli classificati come attivi in un solo saggio. Di tutti i 39 composti testati da Lucantoni et al. [373], MMV019918, MMV667491, MMV006172, MMV000448, MMV665941, MMV007591, MMV019555 e MMV665980 sono risultati attivi in tutti i tempi di incubazione - 24, 48 e 72 ore. MMV000448, MMV019918, MMV665941, MMV665980, MMV667491, MMV000787, MMV000788, MMV006172, MMV007591 e MMV019555 sono risultati attivi a 10 μM in tutti i saggi e MMV665941 e MMV665980 hanno dimostrato una potenza submicromolare in uno dei saggi [373]. Gli studi che utilizzano solo gametociti e gameti come obiettivi finali del saggio spesso ignorano i composti che mirano a stadi sporogonici - zigoti, oocineti e oocisti [282]. L'attività di blocco della trasmissione di 18 composti selezionati (segnalati come potenziali bloccanti della trasmissione dagli sforzi congiunti della Bill & Melinda Gates Foundation and Medicines for Malaria Venture nell'ambito del programma 'Gametocyte Assays for Plasmodium falciparum') sono stati valutati in saggi SMFA diretti e indiretti [11,282]). Di questi 18 composti, 16 (MMV000248, MMV000442, MMV000448, MMV007116, MMV011438, MMV019266, MMV019881, MMV019918, MMV396797, MMV665827, MMV665941, MMV665971, MMV665980, MMV666021,

MMV666125 e MMV667491) hanno inibito lo sviluppo di oocisti nelle zanzare con potenze che vanno da 0,04 a 8,6 μM . In questi saggi, MMV665941, MMV667491, MMV019918 e MMV665827 sono risultati i più potenti con $\text{IC}_{50} = 40, 60, 70$ e 100 nM , rispettivamente, suggerendo un danno irreversibile causato ai gametociti, che non sono riusciti a svilupparsi in oocisti. Inoltre, 10 composti (MMV000248, MMV000448, MMV007116, MMV019881, MMV019918, MMV665827, MMV665941, MMV665980, MMV666021 e MMV667491) su 18, colpiscono gli stadi del parassita all'interno della zanzara in saggi SMFA diretti (48.76-99.84% di inibizione nella formazione di oocisti a $10 \mu\text{M}$) [282,374].

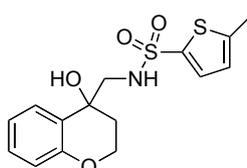
2.35 Molecole varie

I ricercatori di tutto il mondo stanno concentrando i loro sforzi sulla scoperta di nuovi antimalarici che bloccano la trasmissione per colpire non solo i gametociti, ma anche gli stadi sporogonici del parassita della malaria, ovvero gameti, zigoti, oocinetti e oocisti.

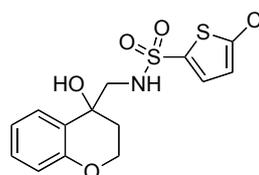
Delves e colleghi hanno recentemente vagliato, attraverso una serie di passaggi, 13.353 piccole molecole con nota attività sugli stadi asessuati di *P. falciparum* e hanno riportato sei composti contenenti sei diversi "scaffold" molecolari (piridone, chinolone, diamminopirimidina ciclica, tetraidroisochinolina, piridile e benzodiazolo). Questi composti si sono dimostrati attivi non solo contro i gametociti maschili e femminili di *P. falciparum* ma anche contro gli stadi sporogonici di *P. berghei* [21]. Delves et al. hanno anche riportato uno screening ad alto rendimento di una libreria di 70.000 composti e hanno identificato sei composti (DDD01028073, DDD01028074, DDDD01028075, DDDD01028076, DDDD01035879 e DDDD01035881) recanti il nucleo N-((4-idrossicroman-4-il)metil)-sulfonammide (4-HCS) che inibisce la ex flagellazione di *P. falciparum* e la formazione di oocinetti di *P. berghei*.



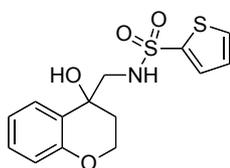
DDD01028073



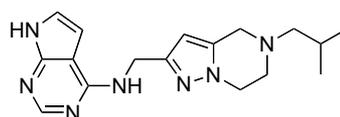
DDD01028074



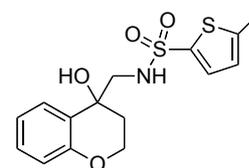
DDD01028075



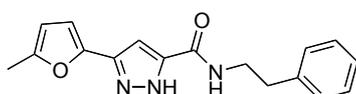
DDD01035879



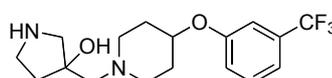
DDD01249504



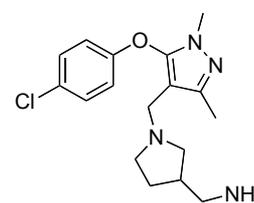
DDD01035881



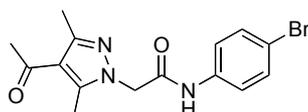
DDD01255968



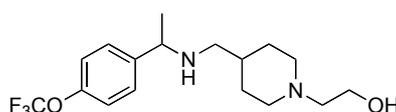
DDD01245291



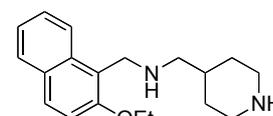
DDD01254274



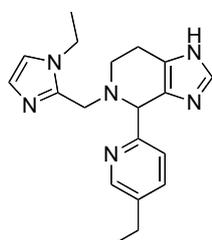
DDD01027599



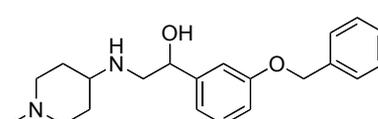
DDD01073716



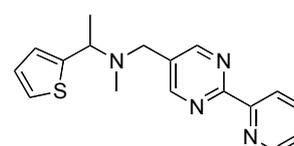
DDD01255740



DDD01254473



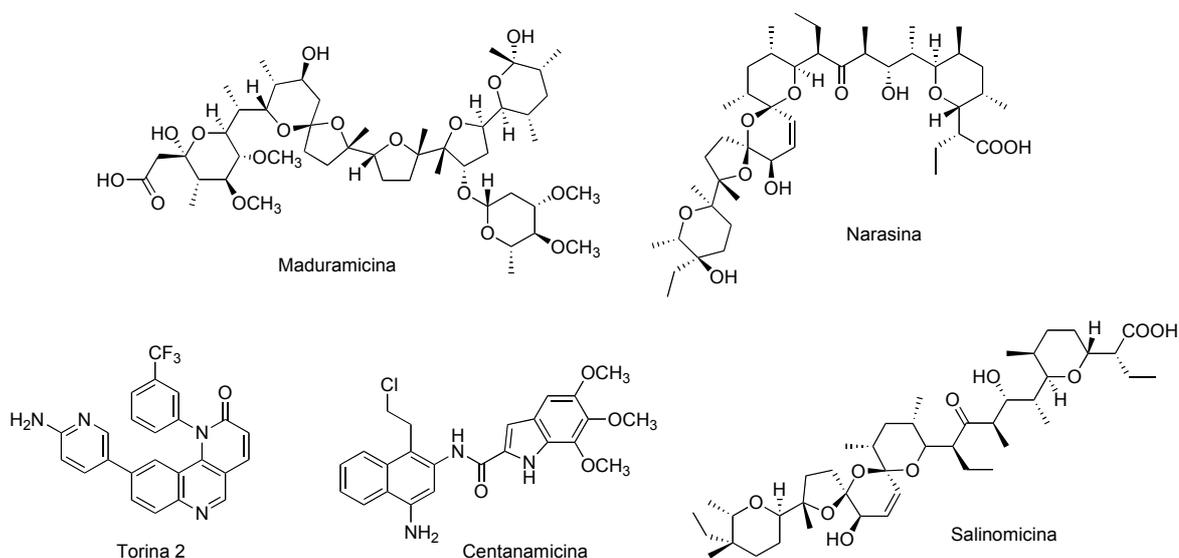
DDD01079164



DDD01246628

Quattro composti (DDDD01249504, DDDD01254274, DDDD01254473 e DDDD01255968) si sono dimostrati attivi solo contro i gametociti di *P. falciparum* e sei composti (DDDD01073716, DDDD01079164, DDDD01245291, DDDD01246628, DDDD01255740 e DDDD01027599) sono attivi contro gli stadi asessuati e i gametociti [22]. Altri ricercatori hanno scoperto altre piccole molecole che bloccano la trasmissione della malaria, tra cui inibitori dell'HDAC [277,375] imidazo[4,5-c]chinolin-2-oni [376], dipeptidilammino-peptidasi [377], derivati dell'acido (+)-usnico [378], diammino-

naftochinoni [379] e analoghi della carmaficina B [305]. Infine, vari esperimenti di screening hanno portato alla scoperta di molecole che, sebbene destinate ad altre indicazioni, hanno mostrato una promettente attività di blocco della trasmissione. Questi agenti includono maduramicina [306,380], narasina [306], torina 2 [306], centanamicina [381] e salinomicina [382]. Tutte queste molecole attive, comprese quelle basate sul gruppo idrossilettilamminico [25], presentano nuove strutture per la progettazione di nuove molecole in grado di bloccare la trasmissione della malattia.

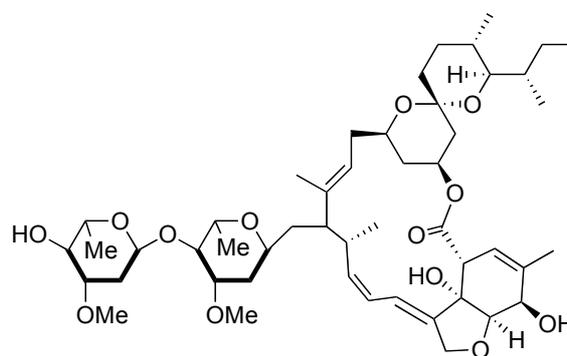


3. Endectocidi: una classe completamente nuova di agenti antiparassitari

Anche dopo aver fatto grandi passi avanti nel controllo della malaria, soprattutto grazie alle pratiche di gestione integrata dei vettori, la trasmissione della malaria rimane ancora una sfida formidabile. Gli adattamenti comportamentali nelle zanzare hanno portato a cambiamenti nel loro comportamento alimentare e quindi le zanzare sono in grado di eludere le misure di controllo dei vettori attuate nelle abitazioni, come le reti trattate con insetticidi a lunga durata e la spruzzatura dei residui al chiuso. Gli endectocidi sono una classe di farmaci letali per endoparassiti, ectoparassiti e zanzare e forniscono un approccio completamente diverso al controllo dei vettori. Uno dei più antichi endectocidi e farmaci antiparassitari, l'ivermectina, è l'unico farmaco di questa classe adatto all'utilizzo umano. È

già registrato per il trattamento dell'oncocerciasi (quasi eliminata dall'ivermectina), della filariosi linfatica, della strongiloidiasi, della scabbia e delle infezioni da pidocchi della testa [383].

L'ivermectina è attiva non solo contro le zanzare-vettori, ma anche contro gli stadi eritrocitari asessuati di *P. falciparum* [384]. Un recente studio ha anche messo in evidenza il potenziale gametocitocida



Ivermectina

dell'ivermectina nello stadio avanzato ($IC_{50} = 558,7$ nM [384]). Oltre ad uccidere gli stadi eritrocitari asessuati e i gametociti, l'ivermectina uccide le zanzare se è presente all'interno del loro pasto sanguigno e quindi aiuta ad interrompere la trasmissione della malaria riducendo la capacità vettoriale [385,386]. L'ivermectina (alla concentrazione LC_{25} , che uccide il 25% delle zanzare *Anopheles gambiae*) riduce significativamente la prevalenza di oocisti e la prevalenza di sporozoitii quando viene somministrata insieme ai parassiti del *Plasmodium* alle zanzare. Nello stesso studio, una significativa riduzione della prevalenza di sporozoitii è stata osservata anche quando l'ivermectina è stata somministrata alle zanzare 6 giorni dopo l'infezione e 9 giorni dopo l'infezione, ma non quando è stata somministrata 3 giorni dopo l'infezione [387]. Questi esperimenti preliminari suggeriscono che l'attività dell'ivermectina non è solo contro le prime fasi ma anche contro le fasi successive dello sviluppo sporogonico. Foy et al. hanno dimostrato, in un recente studio randomizzato (studio RIMDAMAL) in Burkina Faso, che sei dosi di 150-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di ivermectina (somministrate come farmaco di massa – MDA) hanno ridotto significativamente l'incidenza della malaria nei bambini di 5 anni o più piccoli rispetto alla somministrazione in singola dose. Sebbene il regime a sei dosi non sia ideale in termini di attuazione, questo studio fornisce comunque una promettente evidenza che l'ivermectina non solo uccide le zanzare-vettori ma causa anche una significativa riduzione

dell'incidenza della malaria senza avere effetti collaterali negativi [388]. Nei luoghi in cui la maggior parte delle punture avviene in ambiente aperto o sono presenti vettori con abitudini alimentari all'aperto, la spruzzatura dei residui all'interno e le reti trattate con insetticidi a lunga durata non sono opzioni adatte per prevenire la trasmissione. In tali condizioni e in tali aree, gli endectocidi come l'ivermectina possono giocare un ruolo cruciale non solo nella riduzione della trasmissione della malaria, ma anche nella riduzione della capacità vettoriale dell'anofele. Tutte le specie di anofele sono sensibili all'ivermectina [385]. In uno studio condotto tramite la somministrazione dell'ivermectina come farmaco di massa (MDA), la sopravvivenza delle zanzare anofele adulte, nutrite con i pazienti trattati con ivermectina, è stata costantemente ridotta per 6 giorni dopo la data della MDA [389]. In un altro studio, la proporzione di zanzare infettive post-MDA con ivermectina è stata ridotta per almeno 2 settimane [390]. Pertanto, l'MDA con ivermectina potrebbe essere utile anche per ridurre le epidemie e interrompere la trasmissione stagionale della malaria. La somministrazione ripetuta di ivermectina nei programmi MDA in una particolare area potrebbe fornire una diminuzione sostenuta della trasmissione per un periodo più lungo [385]. Un altro vantaggio che l'ivermectina possiede è la sua diversa modalità d'azione rispetto ad altri comuni insetticidi. L'ivermectina agisce perturbando l'attività dei canali del cloruro glutammato-dipendenti negli invertebrati, causando paralisi flaccida e morte [385]. Da un punto di vista evolutivo, l'uso regolare di ivermectina può modificare il comportamento delle zanzare anofele – punture da esseri umani a non umani - nel lungo periodo. La sicurezza dell'ivermectina durante la gravidanza e l'allattamento e la sua comprovata efficacia durante le campagne MDA di oncocerchiosi e filariosi linfatica la rendono un candidato adatto all'uso nelle MDA per la malaria. Sebbene la resistenza all'ivermectina nelle zanzare non sia stata ancora segnalata, l'esistenza di un'isoforma del canale del cloruro glutammato-dipendente (bersaglio dell'ivermectina) insensibile all'ivermectina può rendere plausibile la resistenza, almeno teoricamente [391]. Questo

approccio di controllo dei vettori basato su farmaci aiuterà a integrare le strategie di controllo dei vettori esistenti per ridurre la trasmissione residua. Ma l'implementazione dell'ivermectina per il controllo della malaria non solo richiederà un'ampia ricerca sotto forma di studi osservazionali ben progettati e studi clinici randomizzati in vari contesti di popolazione e che coinvolgano un'ampia gamma di vettori, ma richiederà anche valutazioni di sicurezza e di formulazione al fine di raccogliere prove definitive per il suo uso nel controllo della malaria [383,385,392]. Un potenziale svantaggio dell'ivermectina è la sua azione letale indiretta sulla zanzara. L'ivermectina deve essere somministrata a una persona e deve rimanere nel sangue di quella persona al di sopra della concentrazione letale per la zanzara durante tutto il periodo in cui la zanzara può assumere un pasto a base di sangue.

4. Prospettive

A causa della rapida emergenza e della continua diffusione della resistenza ai farmaci antimalarici e agli insetticidi di prima linea, i ricercatori hanno iniziato a comprendere l'importanza di nuove opzioni di trattamento e di approcci di controllo della malaria. L'uso di antimalarici che bloccano la trasmissione è una strategia comprovata non solo per interrompere il ciclo di vita del parassita malarico, ma anche per prevenire la diffusione della resistenza ai farmaci. In assenza di un vaccino antimalarico efficace, aumenta l'importanza dei farmaci che bloccano la trasmissione.

I gametociti rappresentano uno dei bersagli farmacologici più attraenti perché costituiscono una delle fasi del collo di bottiglia del ciclo di vita del parassita e anche perché sono presenti nel flusso sanguigno dell'ospite vertebrato, rendendoli facilmente accessibili ai farmaci antimalarici. Colpire i gametociti è una strategia comprovata per ridurre la trasmissione in contesti di trasmissione da bassa a moderata.

Sebbene la primachina sia un farmaco anti-gametocita che l'OMS raccomanda di utilizzare con terapie di combinazione assieme all'artemisinina (ACT), i problemi di tossicità emolitica nella popolazione con deficit di G6PD ne hanno limitato l'uso.

Inoltre, non esistono prove conclusive che stabiliscano che la primachina nelle dosi inferiori raccomandate dall'OMS (0,25 mg/kg, ritenute sicure per i pazienti con deficit di G6PD) sia sufficientemente efficace per ridurre la trasmissione della malaria. Oltre alla primachina, il blu di metilene è uno dei farmaci con comprovata attività contro i gametociti in fase avanzata. Il fatto che il blu di metilene sia attivo anche contro gli stadi sporogonici dei parassiti e possieda interazioni sinergiche con l'artemisinina, è un ulteriore vantaggio. Secondo le prove attuali, il blu di metilene ha un rischio minimo di emolisi nei pazienti con deficit di G6PD, ma sono necessari ulteriori studi per chiarire completamente la relazione tra blu di metilene e deficit di G6PD, specialmente nelle aree esterne all'Africa.

Pertanto, lo sviluppo di nuovi farmaci per colpire queste fasi sessuate di *P. falciparum* rimane una priorità assoluta. Oltre ai gametociti, colpire anche gli stadi del parassita esistenti all'interno delle zanzare come i gameti, gli zigoti, gli oocineti e le oocisti può ridurre significativamente la trasmissione della malattia. La comunità scientifica di tutto il mondo non si limita a proporre nuove molecole di piccole dimensioni in grado di bloccare la trasmissione, ma studia anche altri farmaci, non usati in clinica per la malaria per il loro potenziale di blocco della trasmissione (riposizionamento/riproposizione). Sono disponibili inibitori sperimentali che possono colpire più stadi parassitari (stadi asessuati del sangue, gametociti, stadi sporogonici e stadi epatici). I composti che sono attivi anche contro gli stadi sporogonici sono promettenti come farmaci di nuova generazione che bloccano la trasmissione a causa della presenza di un possibile effetto combinato (gametocitocida + sporontocida) che potrebbe portare ad una maggiore attività di blocco della trasmissione rispetto all'attività dei soli composti gametocitocidi.

Inoltre, la modalità di somministrazione dei farmaci attivi sulle fasi sporogoniche è indiretta e quindi la concentrazione e il tempo di somministrazione sono difficili da controllare con precisione. Questo può anche portare alla selezione precoce di mutanti a causa dell'esposizione dei parassiti a concentrazioni subletali del farmaco. Nel caso di farmaci multistadio, i tempi di somministrazione del farmaco devono essere controllati in modo che un farmaco che colpisce uno stadio rimanga nel sangue in concentrazioni superiori a quelle letali fino alla comparsa di un altro stadio o di altri stadi colpiti da quello stesso farmaco. Al contrario, ci sono inibitori che sono selettivi per gli stadi gametociti/sporogonici e sono inattivi contro gli stadi eritrocitari asessuati. Questi inibitori possono essere usati insieme ai farmaci schizonticidi esistenti come parte di nuove terapie di combinazione. Rispetto ai farmaci multistadio (quelli attivi contro gli stadi asessuati e i gametociti/sporogonici), i farmaci attivi "solo sulla fase di trasmissione" avrebbero minori possibilità di selezionare il fenotipo di resistenza ai farmaci a causa di una significativa diminuzione della popolazione affetta da gametociti/forme sporogoniche e dell'assenza di pressione da selezione sugli stadi eritrocitari asessuati.

Ci sono molti candidati promettenti in sviluppo clinico tra cui artemisone, MMV390048 e artefenomel con notevole attività contro i gametociti maturi di *P. falciparum* e KAF156, cipargamina e DDD107498 con attività non solo contro i gametociti maturi ma anche contro gli stadi sporogonici. L'aggiunta di questi farmaci al nostro armamentario terapeutico dovrebbe aiutare non solo a ridurre il numero di malati affetti da malaria, ma anche a causare una significativa riduzione della trasmissione della malaria.

Infine, l'ivermectina che prende di mira i gametociti/sporogoni e uccide le zanzare quando è presente nel loro pasto ematico, non solo fornisce un'alternativa basata sulla chemioterapia che blocca la trasmissione, ma aiuta anche a ridurre la loro capacità come vettori.

Bibliografia

- [1] Leoni S, Buonfrate D, Angheben A, Gobbi F, Bisoffi Z. The hyper-reactive malarial splenomegaly: a systematic review of the literature. *Malaria J.* 14(1), 185 (2015).
- [2] Viriyavejakul P, Khachonsaksumet V, Punsawad C. Liver changes in severe *Plasmodium falciparum* malaria: histopathology, apoptosis and nuclear factor κ B expression. *Malaria J.* 13(1), 106 (2014).
- [3] Thanachartwet V, Desakorn V, Sahassananda D, Kyaw Win KKY, Supaporn T. Acute renal failure in patients with severe *falciparum* malaria using the WHO 2006 and RIFLE criteria. *Int. J. Nephrol.* 2013, 841–518 (2013).
- [4] Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neuro-cognitive outcome. *Pediatr. Res.* 68(4), 267–274 (2010).
- [5] WHO. World Malaria Report: 2019. WHO, Geneva, Switzerland (2019).
- [6] WHO. World Malaria Report: 2018, WHO. Geneva, Switzerland (2018).
- [7] Sinha A, Hughes KR, Modrzynska KK et al. A cascade of DNA-binding proteins for sexual commitment and development in *Plasmodium*. *Nature* 507(7491), 253–257 (2014).
- [8] Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. *Malaria*. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3, 17050 (2017).
- [9] Doerig C, Rayner JC, Scherf A, Tobin AB. Post-translational protein modifications in malaria parasites. *Nat. Rev. Microbiol.* 13(3), 160–172 (2015).
- [10] Sinden RE, Canning EU, Bray RS, Smalley ME. Gametocyte and gamete development in *Plasmodium falciparum*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 201(1145), 375–399 (1978).
- [11] Wadi I, Anvikar AR, Nath M, Pillai CR, Sinha A, Valecha N. Critical examination of approaches exploited to assess the effectiveness of transmission-blocking drugs for malaria. *Future Med. Chem.* 10(22), 2619–2639 (2018).
- [12] Beier JC, Keating J, Githure JI, Macdonald MB, Impoinvil DE, Novak RJ. Integrated vector management for malaria control. *Malaria J.* 7(1), S4 (2008).
- [13] Antonova-Koch Y, Meister S, Abraham M et al. Open-source discovery of chemical leads for next-generation chemoprotective antimalarials. *Science* 362(6419), eaat9446 (2018).
- [14] Swann J, Corey V, Scherer CA, Kato N, Comer E, Maetani M et al. High-throughput luciferase-based assay for the discovery of therapeutics that prevent malaria. *ACS Infect. Dis.* 2(4), 281–293 (2016).
- [15] Batra N, Rajendran V, Wadi I et al. Synthesis, characterization, and antiplasmodial efficacy of sulfonamide-appended [1,2,3]-triazoles. *J. Heterocycl. Chem.* 57, 1625–1636 (2020).
- [16] Sharma B, Kaur S, Legac J, Rosenthal PJ, Kumar V. Synthesis, anti-plasmodial and cytotoxic evaluation of 1H-1,2,3-triazole/acyl hydrazide integrated tetrahydro- β -carboline-4-aminoquinoline conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 30(2), 126810 (2020).
- [17] Zogota R, Kinena L, Withers-Martinez C et al. Peptidomimetic plasmepsin inhibitors with potent anti-malarial activity and selectivity against cathepsin D. *Eur. J. Med. Chem.* 163, 344–352 (2019).
- [18] Batra N, Rajendran V, Agarwal D et al. Synthesis and antimalarial evaluation of [1,2,3]-triazole-tethered sulfonamide–berberine hybrids. *Chem. Select.* 3(34), 9790–9793 (2018).
- [19] P´erez-Moreno G, Cantizani J, S´anchez-Carrasco P et al. Discovery of new compounds active against *plasmodium falciparum* by high-throughput screening of microbial natural products. *PLoS ONE* 11(1), e0145812 (2016).
- [20] Moyo P, Kunyane P, Selepe MA et al. Bioassay-guided isolation and identification of gametocytocidal compounds from *Artemisia afra* (Asteraceae). *Malaria J.* 18(1), 65 (2019).
- [21] Delves M, Lafuente-Monasterio MJ, Upton L et al. Fueling open innovation for malaria transmission-blocking drugs: hundreds of molecules targeting early parasite mosquito stages. *Front. Microbiol.* 10, 2134 (2019).
- [22] Delves MJ, Miguel-Blanco C, Matthews H et al. A high-throughput screen for next-generation leads targeting malaria parasite transmission. *Nat. Commun.* 9(1), 3805 (2018).
- [23] Penzo M, de las Heras-Dueña L, Mata-Cantero L et al. High-throughput screening of the *Plasmodium falciparum* cGMP-dependent protein kinase identified a thiazole scaffold which kills erythrocytic and sexual stage parasites. *Sci. Rep.* 9(1), 7005 (2019).

- [24] Wadi I, Prasad D, Batra N et al. Targeting asexual and sexual blood stages of the human malaria parasite *P. falciparum* with 7-chloroquinoline-based 1,2,3-triazoles. *ChemMedChem* 14(4), 484–493 (2019).
- [25] Pino P, Caldelari R, Mukherjee B et al. A multistage antimalarial targets the plasmepsins IX and X essential for invasion and egress. *Science* 358(6362), 522–528 (2017).
- [26] Raphemot R, Lafuente-Monasterio MJ, Gamo-Benito FJ, Clardy J, Derbyshire ER. Discovery of dual-stage malaria inhibitors with new targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(3), 1430–1437 (2015).
- [27] Sicuri E, Yaya Bocoum F, Nonvignon J et al. The costs of implementing vaccination with the RTS,S malaria vaccine in five sub-Saharan African countries. *MDM Policy Pract.* 4(2), 2381468319896280 (2019).
- [28] Wadi I, Nath M, Anvikar AR, Singh P, Sinha A. Recent advances in transmission-blocking drugs for malaria elimination. *Future Med. Chem.* 11(23), 3047–3089 (2019).
- [29] Wadi I, Pillai CR, Anvikar AR, Sinha A, Nath M, Valecha N. Methylene blue induced morphological deformations in *Plasmodium falciparum* gametocytes: implications for transmission-blocking. *Malaria J.* 17(1), 11 (2018).
- [30] Coulibaly B, Pritsch M, Bountogo M et al. Efficacy and safety of triple combination therapy with artesunate-amodiaquine–methylene blue for falciparum malaria in children: a randomized controlled trial in Burkina Faso. *J. Infect. Dis.* 211(5), 689–697 (2014).
- [31] Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt FP et al. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. *PLoS ONE* 4(5), e5318 (2009).
- [32] Buchholz K, Schirmer RH, Eubel JK et al. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(1), 183 (2008).
- [33] Ngotho P, Soares AB, Hentzschel F, Achcar F, Bertuccini L, Marti M. Revisiting gametocyte biology in malaria parasites. *FEMS Microbiol. Rev.* 43(4), 401–414 (2019).
- [34] Baker DA. Malaria gametocytogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 172(2), 57–65 (2010).
- [35] Smalley ME, Sinden RE. *Plasmodium falciparum* gametocytes: their longevity and infectivity. *Parasitology* 74(1), 1–8 (1977).
- [36] Siciliano G, Santha Kumar TR, Bona R et al. A high susceptibility to redox imbalance of the transmissible stages of *Plasmodium falciparum* revealed with a luciferase-based mature gametocyte assay. *Mol. Microbiol.* 104(2), 306–318 (2017).
- [37] WHO. Policy Brief on Single-dose Primaquine as a Gametocytocide in *Plasmodium falciparum* Malaria. World Health Organization, Geneva (2015). <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-singledose-primaquine-pf/en/>.
- [38] WHO. Policy brief on single-dose primaquine as a gametocytocide in *Plasmodium falciparum* malaria (2015). www.who.int/malaria/publications/atoz/policy-brief-single-dose-primaquine-pf/en/.
- [39] Tine RC, Sylla K, Faye BT et al. Safety and efficacy of adding a single low dose of primaquine to the treatment of adult patients with *Plasmodium falciparum* malaria in Senegal, to reduce gametocyte carriage: a randomized controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 65(4), 535–543 (2017).
- [40] Marcsisin SR, Reichard G, Pybus BS. Primaquine pharmacology in the context of CYP 2D6 pharmacogenomics: current state of the art. *Pharmacol. Ther.* 161, 1–10 (2016).
- [41] John CC. Primaquine plus artemisinin combination therapy for reduction of malaria transmission: promise and risk. *BMC Med.* 14(1), 65 (2016).
- [42] Lucantoni L, Loganathan S, Avery VM. The need to compare: assessing the level of agreement of three high-throughput assays against *Plasmodium falciparum* mature gametocytes. *Sci. Rep.* 7, 45992 (2017).
- [43] Lucantoni L, Fidock DA, Avery VM. Luciferase-based, high-throughput assay for screening and profiling transmission-blocking compounds against *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(4), 2097–2107 (2016).
- [44] Bolscher JM, Koolen KMJ, van Gemert GJ et al. A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(5), 1357–1366 (2015).

- [45] Miguel-Blanco C, Lelièvre J, Delves MJ et al. Imaging-based high throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *P. falciparum* female gamete formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(6), 3298–3305 (2015).
- [46] Vos MW, Stone WJR, Koolen KM et al. A semi-automated luminescence based standard membrane feeding assay identifies novel small molecules that inhibit transmission of malaria parasites by mosquitoes. *Sci. Rep.* 5, 18704 (2015).
- [47] Sun W, Tanaka TQ, Magle CT et al. Chemical signatures and new drug targets for gametocytocidal drug development. *Sci. Rep.* 4, 3743 (2014).
- [48] Lucantoni L, Duffy S, Adjalley SH, Fidock DA, Avery VM. Identification of MMV malaria box inhibitors of *Plasmodium falciparum* early-stage gametocytes, using a luciferase-based high-throughput assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(12), 6050–6062 (2013).
- [49] D'Alessandro S, Silvestrini F, Dechering K et al. A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(9), 2048–2058 (2013).
- [50] Reader J, Botha M, Theron A et al. Nowhere to hide: interrogating different metabolic parameters of *Plasmodium falciparum* gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malaria J.* 14(1), 213 (2015).
- [51] Lelièvre J, Almela MJ, Lozano S et al. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence “Transmission Blocking” assay. *PLoS ONE* 7(4), e35019 (2012).
- [52] Peatey CL, Spicer TP, Hodder PS, Trenholme KR, Gardiner DL. A high-throughput assay for the identification of drugs against late-stage *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 180(2), 127–131 (2011).
- [53] Buchholz K, Burke TA, Williamson KC, Wiegand RC, Wirth DF, Marti M. A high-throughput screen targeting malaria transmission stages opens new avenues for drug development. *J. Infect. Dis.* 203(10), 1445–1453 (2011).
- [54] Adjalley SH, Johnston GL, Li T et al. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *PNAS.* 108(47), E1214 (2011).
- [55] Tanaka TQ, Deu E, Molina-Cruz A et al. *Plasmodium* dipeptidyl aminopeptidases as malaria transmission-blocking drug targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(10), 4645–4652 (2013).
- [56] Tanaka TQ, Williamson KC. A malaria gametocytocidal assay using oxidoreduction indicator, alamarBlue. *Mol. Biochem. Parasitol.* 177(2), 160–163 (2011).
- [57] Leba L-J, Musset L, Pelleau S et al. Use of *Plasmodium falciparum* culture-adapted field isolates for in vitro exflagellation-blocking assay. *Malaria J.* 14(1), 234 (2015).
- [58] Ruecker A, Mathias DK, Straschil U et al. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(12), 7292–7302 (2014).
- [59] Delves MJ, Ruecker A, Straschil U et al. Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(7), 3268–3274 (2013).
- [60] Kumar S, Bhardwaj TR, Prasad DN, Singh RK. Drug targets for resistant malaria: historic to future perspectives. *Biomed. Pharmacother.* 104, 8–27 (2018).
- [61] Smith RC, Vega-Rodríguez J, Jacobs-Lorena M. The *Plasmodium* bottleneck: malaria parasite losses in the mosquito vector. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109(5), 644–661 (2014).
- [62] Kiszewski AE. Blocking *Plasmodium falciparum* malaria transmission with drugs: the gametocytocidal and sporontocidal properties of current and prospective antimalarials. *Pharmaceuticals* 4(1), 44–68 (2011).
- [63] Butcher GA. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Intl J. Parasitol.* 27(9), 975–987 (1997).
- [64] Birkett AJ. Status of vaccine research and development of vaccines for malaria. *Vaccine.* 34(26), 2915–2920 (2016).
- [65] Sauerwein RW, Bousema T. Transmission blocking malaria vaccines: assays and candidates in clinical development. *Vaccine* 33(52), 7476–7482 (2015).
- [66] White NJ. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest.* 113(8), 1084–92 (2004).

- [67] Plouffe DM, Wree M, Du Alan Y et al. High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. *Cell Host Microbe*. 19(1), 114–126 (2016).
- [68] Benoit-Vical F, Lelièvre J, Berry A et al. Trioxaquines are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including gametocytes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51(4), 1463–1472 (2007).
- [69] Chevalley S, Coste A, Lopez A, Pipy B, Valentin A. Flow cytometry for the evaluation of antiplasmodial activity of drugs on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Malaria J*. 9, 49 (2010).
- [70] Coronado LM, Nadovich CT, Spadafora C. Malarial hemozoin: from target to tool. *BBA - General Subjects* 1840(6), 2032–2041 (2014).
- [71] Azevedo R, Markovic M, Machado M, Franke-Fayard B, Mendes AM, Prudêncio M. A bioluminescence method for in vitro screening of *Plasmodium* transmission-blocking compounds. *Antimicrob. Agents Chemother*. 61(6), e02699–e02716 (2017).
- [72] Delves M, Plouffe D, Scheurer C et al. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLOS Med*. 9(2), e1001169 (2012).
- [73] Peatey CL, Skinner-Adams TS, Dixon MWA, McCarthy JS, Gardiner DL, Trenholme KR. Effect of antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* gametocytes. *J. Infect. Dis*. 200(10), 1518–1521 (2009).
- [74] Buckling A, Ranford-Cartwright LC, Miles A, Read AF. Chloroquine increases *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis in vitro. *Parasitology*. 118(4), 339–346 (1999).
- [75] Hogh B, Thompson R, Hetzel C et al. Specific and nonspecific responses to *Plasmodium falciparum* blood-stage parasites and observations on the gametocytemia in school children living in a malaria-endemic area of Mozambique. *Am J. Trop. Med. Hyg*. 52(1), 50–59 (1995).
- [76] Drakeley CJ, Jawara M, Targett GAT et al. Addition of artesunate to chloroquine for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in Gambian children causes a significant but short-lived reduction in infectiousness for mosquitoes. *Trop. Med. Intl. Health*. 9(1), 53–61 (2004).
- [77] Targett G, Drakeley C, Jawara M et al. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J. Infect. Dis*. 183(8), 1254–1259 (2001).
- [78] von Seidlein L, Jawara M, Coleman R, Doherty T, Walraven G, Targett G. Parasitaemia and gametocytaemia after treatment with chloroquine, pyrimethamine/sulfadoxine, and pyrimethamine/sulfadoxine combined with artesunate in young Gambians with uncomplicated malaria. *Trop. Med. Intl. Health*. 6(2), 92–98 (2001).
- [79] Ringwald P, Meche FS, Basco LK. Short report: effects of pyronaridine on gametocytes in patients with acute uncomplicated falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 61(3), 446–448 (1999).
- [80] Lines JD, Wilkes TJ, Lyimo EO. Human malaria infectiousness measured by age-specific sporozoite rates in *Anopheles gambiae* in Tanzania. *Parasitology* 102(Pt 2), 167–177 (1991).
- [81] Sowunmi A, Fateye BA. *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Nigerian children: before, during and after treatment with antimalarial drugs. *Trop. Med. Intl. Health*. 8(9), 783–792 (2003).
- [82] Robert V, Awono-Ambene HP, Le Hesran JY, Trape JF. Gametocytemia and infectivity to mosquitoes of patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria attacks treated with chloroquine or sulfadoxine plus pyrimethamine. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 62(2), 210–216 (2000).
- [83] Hallett RL, Sutherland CJ, Alexander N et al. Combination therapy counteracts the enhanced transmission of drug-resistant malaria parasites to mosquitoes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 48(10), 3940–3943 (2004).
- [84] Ecker A, Lakshmanan V, Sinnis P, Coppens I, Fidock DA. Evidence that mutant PfCRT facilitates the transmission to mosquitoes of chloroquine-treated *Plasmodium* gametocytes. *J. Infect. Dis*. 203(2), 228–236 (2011).
- [85] Duffy S, Avery VM. Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malaria J*. 12(1), 408 (2013).
- [86] Sowunmi A, Nkogho OO, Okuboyejo TM, Gbotosho GO, Happi CT, Adewoye EO. Effects of mefloquine and artesunate mefloquine on the emergence, clearance and sex ratio of *Plasmodium falciparum* gametocytes in malarious children. *Malaria J*. 8(1), 297 (2009).
- [87] Harinasuta T, Lasserre R, Bunnag D, Leimer R, Vinijanont S. Trials of mefloquine in vivax and of mefloquine plus 'Fansidar' in falciparum malaria. *Lancet*. 325(8434), 885–888 (1985).

- [88] Price RN, Nosten F, Luxemburger C et al. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet*. 347(9016), 1654–1658 (1996).
- [89] Stepniewska K, Price RN, Sutherland CJ et al. *Plasmodium falciparum* gametocyte dynamics in areas of different malaria endemicity. *Malaria J.* 7(1), 249 (2008).
- [90] Penna-Coutinho J, Almela MJ, Miguel-Blanco C et al. Transmission-blocking potential of MEFAS, a hybrid compound derived from artesunate and mefloquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(5), 3145–3147 (2016).
- [91] Vugt MV, Wilairatana P, Gemperli B et al. Efficacy of six doses of artemether-lumefantrine (benflumetol) in multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60(6), 936–942 (1999).
- [92] Delves MJ, Sinden RE. A semi-automated method for counting fluorescent malaria oocysts increases the throughput of transmission blocking studies. *Malaria J.* 9, 35 (2010).
- [93] Price RN, Marfurt J, Chalfein F et al. In vitro activity of pyronaridine against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(12), 5146 (2010).
- [94] Chavalitschewinkoon-Petmitr P, Pongvilairat G, Auparakkitanon S, Wilairat P. Gametocytocidal activity of pyronaridine and DNA topoisomerase II inhibitors against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* in vitro. *Parasitol. Intl.* 48(4), 275–280 (2000).
- [95] Duffy S, Loganathan S, Holleran JP, Avery VM. Large-scale production of *Plasmodium falciparum* gametocytes for malaria drug discovery. *Nat. Protoc.* 11(5), 976–992 (2016).
- [96] Peatey CL, Leroy D, Gardiner DL, Trenholme KR. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malaria J.* 11(1), 34 (2012).
- [97] Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Craft CJ et al. Safety and efficacy of pyronaridine-artesunate in uncomplicated acute malaria: an integrated analysis of individual patient data from six randomized clinical trials. *Malaria J.* 12(1), 70 (2013).
- [98] Srivastava IK, Vaidya AB. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43(6), 1334–1339 (1999).
- [99] Butcher GA, Sinden RE. Persistence of atovaquone in human sera following treatment: inhibition of *Plasmodium falciparum* development in vivo and in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(1), 111–114 (2003).
- [100] Butcher GA, Mendoza J, Sinden RE. Inhibition of the mosquito transmission of *Plasmodium berghei* by Malarone™ (atovaquone-proguanil). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94(5), 429–436 (2000).
- [101] Enosse S, Butcher GA, Margos G, Mendoza J, Sinden RE, Hogg B. The mosquito transmission of malaria: the effects of atovaquone-proguanil (Malarone™) and chloroquine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94(1), 77–82 (2000).
- [102] Blagborough AM, Churcher TS, Upton LM, Ghani AC, Gething PW, Sinden RE. Transmission-blocking interventions eliminate malaria from laboratory populations. *Nat. Comm.* 4, 1812 (2013).
- [103] van Vugt M, Leonardi E, Phaipun L et al. Treatment of uncomplicated multidrug-resistant *falciparum* malaria with artesunate-atovaquone-proguanil. *Clin. Infect. Dis.* 35(12), 1498–1504 (2002).
- [104] Premji Z, Umeh RE, Owusu-Agyei S et al. Chlorproguanil–dapsone–artesunate versus artemether–lumefantrine: a randomized, double-blind Phase III trial in African children and adolescents with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS ONE.* 4(8), e6682 (2009).
- [105] Tiono AB, Dicko A, Ndububa DA et al. Chlorproguanil-dapsone-artesunate versus chlorproguanil-dapsone: a randomized, double-blind, Phase III Trial in African children, adolescents and adults with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81(6), 969–978 (2009).
- [106] Beavogui AH, Djimde AA, Gregson A et al. Low infectivity of *Plasmodium falciparum* gametocytes to *Anopheles gambiae* following treatment with sulfadoxine-pyrimethamine in Mali. *Intl. J. Parasitol.* 40(10), 1213–1220 (2010).
- [107] Barnes KI, Little F, Mabuza A et al. Increased gametocytemia after treatment: an early parasitological indicator of emerging sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 197(11), 1605–1613 (2008).
- [108] Ndounga M, Mayengue PI, Tahar R et al. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine, amodiaquine, and sulfadoxine-pyrimethamine-amodiaquine combination for the treatment of uncomplicated

- falciparum malaria in the urban and suburban areas of Brazzaville (Congo). *Acta Trop.* 103(3), 163–171 (2007).
- [109] Sowunmi A, Adedeji AA, Gbotosho GO, Fateye BA, Happi TC. Effects of pyrimethamine-sulphadoxine, chloroquine plus chlorpheniramine, and amodiaquine plus pyrimethamine-sulphadoxine on gametocytes during and after treatment of acute, uncomplicated malaria in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101(8), 887–893 (2006).
- [110] Schneider, P, Bousema T, Omar S et al. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Intl. J. Parasitol.* 36(4), 403–408 (2006).
- [111] Bousema JT, Gouagna LC, Meutstege AM et al. Treatment failure of pyrimethamine-sulphadoxine and induction of *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in children in western Kenya. *Trop. Med. Intl. Health.* 8(5), 427–430 (2003).
- [112] M´endez F, Muˆnoz ´ A, Carrasquilla G et al. Determinants of treatment response to sulfadoxine-pyrimethamine and subsequent transmission potential in falciparum malaria. *Am. J. Epidemiol.* 156(3), 230–238 (2002).
- [113] von Seidlein L, Milligan P, Pinder M et al. Efficacy of artesunate plus pyrimethamine-sulphadoxine for uncomplicated malaria in Gambian children: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet* 355(9201), 352–357 (2000).
- [114] Kone A, van de Vegte-Bolmer M, Siebelink-Stoter R et al. Sulfadoxine-pyrimethamine impairs *Plasmodium falciparum* gametocyte infectivity and *Anopheles* mosquito survival. *Intl. J. Parasitol.* 40(10), 1221–1228 (2010).
- [115] Hallett RL, Dunyo S, Ord R et al. Chloroquine/sulphadoxine-pyrimethamine for Gambian children with malaria: transmission to mosquitoes of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum*. *PLoS Clin Trials.* 1(3), e15 (2006).
- [116] Chutmongkonkul M, Maier WA, Seitz HM. *Plasmodium falciparum*: effect of chloroquine, halofantrine and pyrimethamine on the infectivity of gametocytes for *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86(2), 103–110 (1992).
- [117] Hogh B, Gamage-Mendis A, Butcher GA et al. The differing impact of chloroquine and pyrimethamine/sulfadoxine upon the infectivity of malaria species to the mosquito vector. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58(2), 176–182 (1998).
- [118] WHO. Guidelines for the Treatment of Malaria. World Health Organization, Geneva, Third edition. www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/ (2015).
- [119] Abay SM. Blocking malaria transmission to *Anopheles* mosquitoes using artemisinin derivatives and primaquine: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors.* 6(1), 278 (2013).
- [120] Carmona-Fonseca J, Arango E, Blair S. Gametocytemia in falciparum malaria treated with amodiaquine or artesunate. *Biomedica* 28(2), 195–212 (2008).
- [121] WWARN Gametocyte Study Group. Gametocyte carriage in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria following treatment with artemisinin combination therapy: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMC Med.* 14(1), 79 (2016).
- [122] Bousema T, Okell L, Shekalaghe S et al. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. *Malaria J.* 9(1), 136 (2010).
- [123] Okell LC, Drakeley CJ, Ghani AC, Bousema T, Sutherland CJ. Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: a pooled analysis of six randomized trials. *Malaria J.* 7(1), 125 (2008).
- [124] Barnes KI, Durrheim DN, Little F et al. Effect of artemether-lumefantrine policy and improved vector control on malaria burden in KwaZulu–Natal, South Africa. *PLoS Med.* 2(11), e330 (2005).
- [125] Chen PQ, Li GQ, Guo XB et al. The infectivity of gametocytes of *Plasmodium falciparum* from patients treated with artemisinin. *Chin. Med. J.* 107(9), 709–711 (1994).
- [126] Makanga M. A review of the effects of artemether-lumefantrine on gametocyte carriage and disease transmission. *Malaria J.* 13(1), 291 (2014).
- [127] Price RN. Potential of artemisinin-based combination therapies to block malaria transmission. *J. Infect. Dis.* 207(11), 1627–1629 (2013).
- [128] Bousema JT, Schneider P, Gouagna LC et al. .. Moderate effect of artemisinin-based combination therapy on transmission of *Plasmodium falciparum*. *J. Infect. Dis.* 193(8), 1151–1159 (2006).

- [129] Sutherland CJ, Ord R, Dunyo S et al. Reduction of malaria transmission to Anopheles mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. *PLoS Med.* 2(4), e92 (2005).
- [130] van den Broek I, Kitz C, Al Attas S, Libama F, Balasegaram M, Guthmann JP. Efficacy of three artemisinin combination therapies for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Republic of Congo. *Malaria J.* 5, 113 (2006).
- [131] Kern SE, Tiono AB, Makanga M et al. Community screening and treatment of asymptomatic carriers of *Plasmodium falciparum* with artemether-lumefantrine to reduce malaria disease burden: a modelling and simulation analysis. *Malaria J.* 10, 210 (2011).
- [132] Kumar N, Zheng H. Stage-specific gametocytocidal effect in vitro of the antimalaria drug qinghaosu on *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 76(3), 214–218 (1990).
- [133] Smithuis F, Kyaw MK, Phe O et al. Effectiveness of five artemisinin combination regimens with or without primaquine in uncomplicated *falciparum* malaria: an open-label randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* 10(10), 673–681 (2010).
- [134] Okebe J, Bousema T, Affara M et al. The gametocytocidal efficacy of different single doses of primaquine with dihydroartemisinin-piperaquine in asymptomatic parasite carriers in the Gambia: a randomized controlled trial. *EBioMedicine* 13, 348–355 (2016).
- [135] WHO. Overview of malaria treatment (2019). www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/
- [136] Shah NK, Tyagi P, Sharma SK. The impact of artemisinin combination therapy and long-lasting insecticidal nets on forest malaria incidence in tribal villages of India, 2006–2011. *PLoS ONE* 8(2), e56740 (2013).
- [137] Gebru T, Mordmüller B, Held J. Effect of fluorescent dyes on in vitro-differentiated, late-stage *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(12), 7398–7404 (2014).
- [138] Esu E, Effa EE, Opie ON, Uwaoma A, Meremikwu MM. Artemether for severe malaria. *Cochrane database Syst. Rev.* 6, CD010678 (2014).
- [139] Makanga M, Krudsood S. The clinical efficacy of artemether/lumefantrine (Coartem R_o). *Malaria J.* 8(Suppl. 1), S5 (2009).
- [140] Navaratnam V, Mansor SM, Sit NW, Grace J, Li Q, Olliaro P. Pharmacokinetics of artemisinin-type compounds. *Clin. Pharmacokinet.* 39(4), 255–270 (2000).
- [141] Chotivanich K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R et al. Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(6), 1927–1930 (2006).
- [142] Djimde AA, Maiga AW, Ouologuem D et al. Gametocyte clearance dynamics following oral artesunate treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in Malian children. *Parasite* 23, 3 (2016).
- [143] Sowunmi A, Balogun T, Gbotosho GO, Happi CT, Adedeji AA, Fehintola FA. Activities of amodiaquine, artesunate, and artesunate-amodiaquine against asexual- and sexual-stage parasites in *falciparum* malaria in children. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(5), 1694 (2007).
- [144] Sirima SB, Ogutu B, Lusingu JPA et al. Comparison of artesunate-mefloquine and artemether-lumefantrine fixed-dose combinations for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in children younger than 5 years in sub-Saharan Africa: a randomised, multicentre, Phase 4 trial. *Lancet Infect. Dis.* 16(10), 1123–1133 (2016).
- [145] Yavo W, Konate A, Kassi FK et al. Efficacy and safety of artesunate-amodiaquine versus artemether-lumefantrine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in sentinel sites across Cote d'Ivoire. *Malaria Res. Treat.* 2015, 878132 (2015).
- [146] Yeka A, Dorsey G, Kanya MR et al. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treating uncomplicated malaria: a randomized trial to guide policy in Uganda. *PLoS ONE* 3(6), e2390 (2008).
- [147] Kanya MR, Yeka A, Bukirwa H et al. Artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of malaria: a randomized trial. *PLoS Clin. Trials.* 2(5), e20 (2007).
- [148] Mweresa CK, Sawa P, Yussuf RU et al. Malaria transmission after artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine: a randomized trial. *J. Infect. Dis.* 207(11), 1637–1645 (2013).
- [149] Sawa P, Shekalaghe SA, Drakeley CJ et al. Malaria transmission after artemether-lumefantrine and dihydroartemisinin-piperaquine: a randomized trial. *J. Infect. Dis.* 207(11), 1637–1645 (2013).
- [150] Mens PF, Sawa P, van Amsterdam SM et al. A randomized trial to monitor the efficacy and effectiveness by QT-NASBA of artemether-lumefantrine versus dihydroartemisinin-piperaquine for treatment and transmission control of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in western Kenya. *Malaria J.* 7, 237 (2008).

- [151] 4ABC- The Four Artemisinin-Based Combinations (4ABC) Study Group. A head-to-head comparison of four artemisinin-based combinations for treating uncomplicated malaria in African children: a randomized trial. *PLoS Med.* 8, e1001119 (2011).
- [152] Lefevre G, Looareesuwan S, Treeprasertsuk S et al. A clinical and pharmacokinetic trial of six doses of artemether-lumefantrine for multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64(5–6), 247–256 (2001).
- [153] Zwang J, Ashley EA, Karema C et al. Safety and efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine in falciparum malaria: a prospective multi-centre individual patient data analysis. *PLoS ONE* 4(7), e6358 (2009).
- [154] Sowunmi A, Balogun ST, Gbotosho GO, Happi CT. *Plasmodium falciparum* gametocyte sex ratios in children with acute, symptomatic, uncomplicated infections treated with amodiaquine. *Malaria J.* 7(1), 169 (2008).
- [155] Gonçalves D, Hunziker P. Transmission-blocking strategies: the roadmap from laboratory bench to the community. *Malaria J.* 15(1), 95 (2016).
- [156] Ouedraogo AL, Gonçalves BP, Gneme A et al. Dynamics of the human infectious reservoir for malaria determined by mosquito feeding assays and ultrasensitive malaria diagnosis in Burkina Faso. *J. Infect. Dis.* 213(1), 90–99 (2015).
- [157] Sowunmi A, Fehintola FA, Adediji AA et al. Open randomized study of artesunate-amodiaquine vs. chloroquine-pyrimethamine-sulfadoxine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Nigerian children. *Trop. Med. Int. Health.* 10(11), 1161–1670 (2005).
- [158] Adjuik M, Agnamey P, Babiker A et al. Amodiaquine-artesunate versus amodiaquine for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in African children: a randomised, multicentre trial. *Lancet* 359(9315), 1365–1672 (2002).
- [159] Agomo PU, Meremikwu MM, Watila IM et al. Efficacy, safety and tolerability of artesunate-mefloquine in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in four geographic zones of Nigeria. *Malaria J.* 7(1), 172 (2008).
- [160] Sagara I, Diallo A, Kone M et al. A randomized trial of artesunate-mefloquine versus artemether-lumefantrine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mali. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79(5), 655–661 (2008).
- [161] Tangpukdee N, Krudsood S, Srivilairit S et al. Gametocyte clearance in uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria after artesunate-mefloquine treatment in Thailand. *Korean J. Parasitol.* 46(2), 65–70 (2008).
- [162] Shekalaghe S, Drakeley C, Gosling R et al. Primaquine clears submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate. *PLoS ONE* 2(10), e1023 (2007).
- [163] Schneider P, Bousema T, Omar S et al. (Sub)microscopic *Plasmodium falciparum* gametocytaemia in Kenyan children after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine monotherapy or in combination with artesunate. *Int. J. Parasitol.* 36(4), 403–408 (2006).
- [164] Priotto G, Kabakyenga JK, Pinoges L et al. Artesunate and sulfadoxine-pyrimethamine combinations for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Uganda: a randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97(3), 325–330 (2003).
- [165] Oesterholt MJAM, Alifrangis M, Sutherland CJ et al. Submicroscopic gametocytes and the transmission of antifolate-resistant *Plasmodium falciparum* in Western Kenya. *PLoS ONE* 4(2), e4364 (2009).
- [166] Mohamed AO, Abdel Hamid MM, Mohamed OS et al. Efficacies of DHA–PPQ and AS/SP in patients with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in an area of an unstable seasonal transmission in Sudan. *Malaria J.* 16(1), 163 (2017).
- [167] The Worldwide Antimalarial Resistance Network DSPG. The effect of dosing regimens on the antimalarial efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine: a pooled analysis of individual patient data. *PLoS Medicine* 10(12), e1001564 (2013).
- [168] Sutanto I, Suprijanto S, Kosasih A et al. The effect of primaquine on gametocyte development and clearance in the treatment of uncomplicated falciparum malaria with dihydroartemisinin-piperaquine in south Sumatra, western Indonesia: an open-label, randomized, controlled trial. *Clin. Infect. Dis.* 56(5), 685–693 (2013).

- [169] Denis MB, Davis TM, Hewitt S et al. Efficacy and safety of dihydroartemisinin-piperaquine (Artekin) in Cambodian children and adults with uncomplicated falciparum malaria. *Clin. Infect Dis.* 35(12), 1469–1476 (2002).
- [170] Dabira E. Gametocyte carriage after a treatment with primaquine combined with dihydroartemisinin-piperaquine in malaria infected asymptomatic individuals. *BMJ Global Health* 2(Suppl. 2), A20 (2017).
- [171] Grande T, Bernasconi A, Erhart A et al. A randomised controlled trial to assess the efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Peru. *PLoS ONE* 2(10), e1101 (2007).
- [172] Lanners HN. Effect of the 8-aminoquinoline primaquine on culture derived. *Parasitol. Res.* 77(6), 478–481 (1991).
- [173] Schlesinger PH, Krogstad DJ, Herwaldt BL. Antimalarial agents: mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32(6), 793–798 (1988).
- [174] Aikawa M, Beaudoin RL. Morphological effects of 8-aminoquinolines on the exoerythrocytic stages of *Plasmodium fallax*. *Mil. Med.* 134(10), 986–999 (1969).
- [175] Wadi I, Pillai CR, Anvikar AR, Sinha A, Nath M, Valecha N. Methylene blue induced morphological deformations in *Plasmodium falciparum* gametocytes: implications for transmission-blocking. *Malaria J.* 17(1), 11 (2018).
- [176] Lin JT, Lon C, Spring MD et al. Single dose primaquine to reduce gametocyte carriage and *Plasmodium falciparum* transmission in Cambodia: an open-label randomized trial. *PLoS ONE* 12(6), e0168702 (2017).
- [177] White NJ. Primaquine to prevent transmission of falciparum malaria. *Lancet Infect. Dis.* 13(2), 175–181 (2013).
- [178] Shekalaghe SA, ter Braak R, Daou M et al. In Tanzania, hemolysis after a single dose of primaquine coadministered with an artemisinin is not restricted to glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient (G6PD A-) individuals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(5), 1762 (2010).
- [179] Karwacki JJ, Shanks GD, Kummalue T, Watanasook C. Primaquine induced hemolysis in a Thai soldier. *Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health.* 20(4), 555–556 (1989).
- [180] Eziefula AC, Bousema T, Yeung S et al. Single dose primaquine for clearance of *Plasmodium falciparum* gametocytes in children with uncomplicated malaria in Uganda: a randomised, controlled, double-blind, dose-ranging trial. *Lancet Infect. Dis.* 14(2), 130–139 (2014).
- [181] Dicko A, Brown JM, Diawara H et al. Primaquine to reduce transmission of *Plasmodium falciparum* malaria in Mali: a single-blind, dose-ranging, adaptive randomised Phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 16(6), 674–684 (2016).
- [182] Mwaiswelo R, Ngasala BE, Jovel I et al. Safety of a single low-dose of primaquine in addition to standard artemether-lumefantrine regimen for treatment of acute uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Tanzania. *Malaria J.* 15(1), 316 (2016).
- [183] Bancone G, Chowwiwat N, Somsakchaicharoen R et al. Single low dose primaquine (0.25 mg/kg) does not cause clinically significant haemolysis in G6PD deficient subjects. *PLoS ONE* 11(3), e0151898 (2016).
- [184] White NJ, Ashley EA, Recht J et al. Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malaria J.* 13(1), 483 (2014).
- [185] Batu AT. Primaquine induced haemolysis in G6PD deficient Burmese. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 64, 785–786 (1970).
- [186] Khandelia V, Pyarsabadi P, Nama U, Chittora S, Swami Y, Richariya H. The potential nephrotoxic effect of single tablet of 15mg primaquine in G6PD deficient Hadoti region population of India. *Intl. J. Adv. Med.* 4(2), 605 (2017).
- [187] Salvadio E, Pannacciulli I, Tizianello A, Ajmar F. Nature of hemolytic crisis and the fate of G6PD deficient, drug-damaged erythrocytes in Sardinians. *N. Engl. J. Med.* 276(24), 1339–1344 (1967).
- [188] Lacerda MVG, Llanos-Cuentas A, Krudsood S et al. Single-dose tafenoquine to prevent relapse of *Plasmodium vivax* malaria. *New Eng. J. Med.* 380(3), 215–228 (2019).
- [189] Ramharter M, Noedl H, Thimasarn K, Wiedermann G, Wernsdorfer G, Wernsdorfer WH. In vitro activity of tafenoquine alone and in combination with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67(1), 39–43 (2002).

- [190] Edstein MD, Kocisko DA, Brewer TG, Walsh DS, Eamsila C, Charles BG. Population pharmacokinetics of the new antimalarial agent tafenoquine in Thai soldiers. *British J. Clin. Pharmacol.* 52(6), 663–670 (2001).
- [191] Lell B, Faucher JF, Missinou MA et al. Malaria chemoprophylaxis with tafenoquine: a randomised study. *Lancet* 355(9220), 2041–2045 (2000).
- [192] Brueckner RP, Coster T, Wesche DL, Shmuklarsky M, Schuster BG. Prophylaxis of *Plasmodium falciparum* infection in a human challenge model with WR 238605, a new 8-aminoquinoline antimalarial. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(5), 1293–1294 (1998).
- [193] Crockett M, Kain KC. Tafenoquine: a promising new antimalarial agent. *Expert. Opin. Investig. Drugs* 16(5), 705–715 (2007).
- [194] Obaldia N, Rossan RN, Cooper RD et al. WR 238605, chloroquine, and their combinations as blood schizonticides against a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium vivax* in Aotus monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(5), 508–510 (1997).
- [195] Cooper RD, Milhous WK, Rieckmann KH. The efficacy of WR 238605 against the blood stages of a chloroquine resistant strain of *Plasmodium vivax*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88(6), 691–692 (1994).
- [196] Peters W, Robinson BL, Milhous WK. The chemotherapy of rodent malaria. LI. Studies on a new 8-aminoquinoline, WR 238,605. *Annals Tropical Med. Parasitol.* 87(6), 547–552 (1993).
- [197] Kemirembe K, Cabrera M, Cui L. Interactions between tafenoquine and artemisinin-combination therapy partner drug in asexual and sexual stage *Plasmodium falciparum*. *Intl. J. Parasitol. Drugs Drug Res.* 7(2), 131–137 (2017).
- [198] Coleman RE, Clavin AM, Milhous WK. Gametocytocidal and sporontocidal activity of antimalarials against *Plasmodium berghei* ANKA in ICR mice and *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(2), 169–182 (1992).
- [199] Ponsa N, Sattabongkot J, Kittayapong P, Eikarat N, Coleman RE. Transmission-blocking activity of tafenoquine (WR-238605) and arteminic acid against naturally circulating strains of *Plasmodium vivax* in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 69(5), 542–547 (2003).
- [200] Green, JA, Mohamed K, Goyal N et al. Pharmacokinetic interactions between tafenoquine and dihydroartemisinin-piperaquine or artemether-lumefantrine in healthy adult subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(12), 7321–7332 (2016).
- [201] St Jean PL, Xue Z, Carter N et al. Tafenoquine treatment of *Plasmodium vivax* malaria: suggestive evidence that CYP2D6 reduced metabolism is not associated with relapse in the Phase 2b DETECTIVE trial. *Malaria J.* 15, 97 (2016).
- [202] Marcsisin SR, Sousa JC, Reichard GA et al. Tafenoquine and NPC-1161B require CYP 2D metabolism for anti-malarial activity: implications for the 8-aminoquinoline class of anti-malarial compounds. *Malaria J.* 13(1), 2 (2014).
- [203] GlaxoSmithKline. G6PD (Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase) Study to Evaluate Hemolysis Potential of TFQ (Tafenoquine). *ClinicalTrials.gov*. Bethesda, MD <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01205178>. (2018).
- [204] Prieto JH. The Binding of methylene blue to *Plasmodium falciparum* glutathione reductase. *Biophys. J.* 112(3), 351a (2017).
- [205] Lu G, Nagbanshi M, Goldau N et al. Efficacy and safety of methylene blue in the treatment of malaria: a systematic review. *BMC Med.* 16(1), 59 (2018).
- [206] Kumar H, Wadi I, Devaraji V, Pillai CR, Ghosh SK. A novel quinoline-appended chalcone derivative as potential *Plasmodium falciparum* gametocytocide. *J. Vector Borne Dis.* [IN PRESS]
- [207] Bountogo M, Zoungrana A, Coulibaly B et al. Efficacy of methylene blue monotherapy in semi-immune adults with uncomplicated falciparum malaria: a controlled trial in Burkina Faso. *Trop. Med. Intl. Health.* 15(6), 713–717 (2010).
- [208] Zoungrana A, Coulibaly B, Si'e A et al. Safety and efficacy of methylene blue combined with artesunate or amodiaquine for uncomplicated falciparum malaria: a randomized controlled trial from Burkina Faso. *PLoS ONE* 3(2), e1630 (2008).
- [209] Meissner PE, Mandi G, Witte S et al. Safety of the methylene blue plus chloroquine combination in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young children of Burkina Faso [ISRCTN27290841]. *Malaria J.* 4(1), 45 (2005).

- [210] Kiszewski AE. Blocking *Plasmodium falciparum* malaria transmission with drugs: the gametocytocidal and sporontocidal properties of current and prospective antimalarials. *Pharmaceuticals* 4(1), 44–68 (2010).
- [211] Walter-Sack I, Rengelshausen J, Oberwittler H et al. High absolute bioavailability of methylene blue given as an aqueous oral formulation. *Eur. J. Clin. Pharm.* 65(2), 179–189 (2009).
- [212] Toure OA, Valecha N, Tshefu AK et al. A Phase 3, double-blind, randomized study of arterolane maleate-piperaquine phosphate vs artemether-lumefantrine for falciparum malaria in adolescent and adult patients in Asia and Africa. *Clin. Infect. Dis.* 62(8), 964–971 (2016).
- [213] Krudsood S, Wilairatana P, Tangpukdee N et al. Safety and tolerability of elubiquine (bulaquine, CDRI 80/53) for treatment of *Plasmodium vivax* malaria in Thailand. *Korean J. Parasitol.* 44(3), 221–228 (2006).
- [214] Noel S, Sharma S, Shankar R, Rath SK. Identification of differentially expressed genes after acute exposure to bulaquine (CDRI 80/53) in mice liver. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103(6), 522–529 (2008).
- [215] Dutta GP. New antimalarial drug discovery in India and future strategy for malaria control. *Proc. Ind. Natl Sci. Acad.* 82(1), 31–52 (2016).
- [216] Puri SK, Dutta GP. *Plasmodium cynomolgi*: gametocytocidal activity of the anti-malarial compound CDRI 80/53 (elubiquine) in rhesus monkeys. *Exp. Parasitol.* 111(1), 8–13 (2005).
- [217] von Seidlein L, Auburn S, Espino F et al. Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-aminoquinoline treatment regimens: a workshop report. *Malaria J.* 12(1), 112 (2013).
- [218] Gogtay NJ, Kamtekar KD, Dalvi SS et al. A randomized, parallel study of the safety and efficacy of 45mg primaquine versus 75mg bulaquine as gametocytocidal agents in adults with blood schizonticide-responsive uncomplicated falciparum malaria. *BMC Infect. Dis.* 6(1), 16 (2006).
- [219] Tan KR, Magill AJ, Parise ME, Arguin PM. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84(4), 517–531 (2011).
- [220] Baragana B, Hallyburton I, Lee MCS et al. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* 522(7556), 315 (2015).
- [221] Wells TN, Hooft van Huijsduijnen R, Van Voorhis WC. Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Disc.* 14(6), 424–442 (2015).
- [222] White NJ, Pukrittayakamee S, Phyo AP et al. Spiroindolone KAE609 for falciparum and vivax malaria. *New Eng. J. Med.* 371(5), 403–410 (2014).
- [223] Phyo AP, Seidlein Lv. Challenges to replace ACT as first-line drug. *Malaria J.* 16, 296 (2017).
- [224] van Pelt-Koops JC, Pett HE et al. The spiroindolone drug candidate NITD609 potently inhibits gametocytogenesis and blocks *Plasmodium falciparum* transmission to *Anopheles* mosquito vector. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(7), 3544–3548 (2012).
- [225] Upton LM, Brock PM, Churcher TS et al. Lead clinical and preclinical antimalarial drugs can significantly reduce sporozoite transmission to vertebrate populations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(1), 490–497 (2015).
- [226] Diagana TT. Supporting malaria elimination with 21st century antimalarial agent drug discovery. *Drug Disc. Today.* 20(10), 1265–1270 (2015).
- [227] White NJ, Duong TT, Uthaisin C et al. Antimalarial activity of KAF156 in falciparum and vivax malaria. *New Eng. J. Med.* 375(12), 1152–1160 (2016).
- [228] Ashley EA, Phyo AP. Drugs in development for malaria. *Drugs* 78(9), 861–879 (2018).
- [229] Kuhlen KL, Chatterjee AK, Rottmann M et al. KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(9), 5060–5067 (2014).
- [230] McNamara CW, Lee MC, Lim CS et al. Targeting *Plasmodium* PI(4)K to eliminate malaria. *Nature* 504(7479), 248–253 (2013).
- [230] Sanofi. To evaluate the efficacy of a single dose regimen of ferroquine and artefenomel in adults and children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria (FALCI). In: *ClinicalTrials.gov*. Bethesda, MD. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02Sanofi497612>
- [232] Phyo AP, Jittamala P, Nosten FH et al. Antimalarial activity of artefenomel (OZ439), a novel synthetic antimalarial endoperoxide, in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria: an open-label Phase 2 trial. *Lancet Infect. Dis.* 16(1), 61–69 (2016).

- [233] Collins KA, Wang CYT, Adams M et al. A controlled human malaria infection model enabling evaluation of transmission-blocking interventions. *J. Clin. Invest.* 128(4), 1551–1562 (2018).
- [234] Phillips MA, Lotharius J, Marsh K et al. A long-duration dihydroorotate dehydrogenase inhibitor (DSM265) for prevention and treatment of malaria. *Sci. Transl. Med.* 7(296), 296ra111 (2015).
- [235] Medicines for Malaria Venture. MMV390048 and its antimalarial activity against *Plasmodium falciparum* in healthy adult subjects, part B. In: *ClinicalTrials.gov*. Bethesda, MD <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02783833>
- [236] Medicines for Malaria Venture. MMV390048 against early *Plasmodium falciparum* blood stage infection in healthy participants. In: *ClinicalTrials.gov*. Bethesda, MD <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02281344>
- [237] Paquet T, Le Manach C, Cabrera DG et al. Antimalarial efficacy of MMV390048, an inhibitor of *Plasmodium* phosphatidylinositol 4-kinase. *Sci. Transl. Med.* 9(387), ead9735 (2017).
- [238] Vivas L, Rattray L, Stewart LB et al. Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semi-synthetic endoperoxide artemisone in vitro and in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 59(4), 658–65 (2007).
- [239] Ramharter M, Burkhardt D, Nemeth J, Adegnika AA, Kreamsner PG. In vitro activity of artemisone compared with artesunate against *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(4), 637–9 (2006).
- [240] Coertzen D, Reader J, van der Watt M et al. Artemisone and artemiside are potent panreactive antimalarial agents that also synergize redox imbalance in *Plasmodium falciparum* transmissible gametocyte stages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62(8), e02214–e02217 (2018).
- [241] University of Oxford. Artemisone for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria in western Cambodia (AMOS). In: *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00936767>
- [242] Fernandes JF, Lell B, Agnandji ST et al. Fosmidomycin as an antimalarial drug: a meta-analysis of clinical trials. *Future Microbiol.* 10(8), 1375–1390 (2015).
- [243] Lell B, Ruangweera R, Wiesner J et al. Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(2), 735–738 (2003).
- [244] Missinou MA, Borrmann S, Schindler A et al. Fosmidomycin for malaria. *Lancet* 360(9349), 1941–1942 (2002).
- [245] Borrmann S, Adegnika AA, Moussavou F et al. Short-course regimens of artesunate fosmidomycin in treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(9), 3749–3754 (2005).
- [246] Albert Schweitzer Hospital. Efficacy of fosmidomycin-clindamycin for treating malaria in Gabonese children. In: *ClinicalTrials.gov*. Bethesda, MD <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00214643>
- [247] Borrmann S, Adegnika AA, Matsiegui PB et al. Fosmidomycin-clindamycin for *Plasmodium falciparum* infections in African children. *J. Infect. Dis.* 189(5), 901–908 (2004).
- [248] Borrmann S, Issifou S, Esser G et al. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* 190(9), 1534–1540 (2004).
- [249] Mombo-Ngoma G, Remppis J, Sievers M et al. Efficacy and safety of fosmidomycin-piperaquine as nonartemisinin-based combination therapy for uncomplicated *falciparum* malaria: a single-arm, age de-escalation proof-of-concept study in Gabon. *Clin. Infect. Dis.* 66(12), 1823–1830 (2018).
- [250] Held J, Jeyaraj S, Kreidenweiss A. Antimalarial compounds in Phase II clinical development. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 24(3), 363–382 (2015).
- [251] Lanaspa M, Moraleda C, Machevo S et al. Inadequate efficacy of a new formulation of fosmidomycin-clindamycin combination in Mozambican children less than three years old with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(6), 2923–2928 (2012).
- [252] Borrmann S, Lundgren I, Oyakhrome S et al. Fosmidomycin plus clindamycin for treatment of pediatric patients aged 1 to 14 years with *Plasmodium falciparum* malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(8), 2713 (2006).
- [253] Puta C, Manyando C. Enhanced gametocyte production in fansidar-treated *Plasmodium falciparum* malaria patients: implications for malaria transmission control programmes. *Trop. Med. Intl. Health.* 2(3), 227–227 (1997).

- [254] Sanofi. Dose ranging study of ferroquine with artesunate in African adults and children with uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria (FARM). In: ClinicalTrials.gov. Bethesda, MD <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00988507>
- [255] Mustafa K, Landau I, Chabaud AG et al. Effects of the antimalarial drugs ferroquine and artesunate on *Plasmodium yoelii* gametocytogenesis and vectorial transmission. *Sante* 21(3), 133–142 (2011).
- [256] McCarthy JS, Ruckle T, Djeriou E et al. A Phase II pilot trial to evaluate safety and efficacy of ferroquine against early *Plasmodium falciparum* in an induced blood-stage malaria infection study. *Malaria J.* 15(1), 469 (2016).
- [257] Held J, Supan C, Salazar CL et al. Ferroquine and artesunate in African adults and children with *Plasmodium falciparum* malaria: a Phase 2, multicentre, randomised, double-blind, dose-ranging, non-inferiority study. *Lancet Infect. Dis.* 15(12), 1409–1419 (2015).
- [258] Krogstad D. Studies of a candidate aminoquinoline antimalarial (AQ-13). In: ClinicalTrials.gov. Bethesda, MD. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01614964>
- [259] Yuthavong Y, Tarnchompoo B, Vilaivan T et al. Malarial dihydrofolate reductase as a paradigm for drug development against a resistance-compromised target. *PNAS* 109(42), 16823–16828 (2012).
- [260] Le Bihan A, de Kanter R, Angulo-Barturen I et al. Characterization of novel antimalarial compound ACT-451840: Preclinical assessment of activity and dose–efficacy modeling. *PLoS Med.* 13(10), e1002138 (2016).
- [261] Boss C, Aissaoui H, Amaral N et al. Discovery and characterization of ACT-451840: an antimalarial drug with a novel mechanism of action. *Chem. Med. Chem.* 11(18), 1995–2014 (2016).
- [262] Bruderer S, Hurst N, de Kanter R et al. First-in-humans study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of ACT-451840, a new chemical entity with antimalarial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(2), 935–942 (2015).
- [263] Batty KT, Salman S, Moore BR et al. Artemisinin-naphthoquine combination therapy for uncomplicated pediatric malaria: a pharmacokinetic study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(5), 2472–2784 (2012).
- [264] Moore BR, Laman M, Salman S et al. Naphthoquine: an emerging candidate for artemisinin combination therapy. *Drugs* 76(7), 789–804 (2016).
- [265] Laman M, Moore BR, Benjamin JM et al. Artemisinin-naphthoquine versus artemether-lumefantrine for uncomplicated malaria in Papua New Guinean children: an open-label randomized trial. *PLoS Med.* 11(12), e1001773 (2014).
- [266] Karl S, Laman M, Moore BR et al. Gametocyte clearance kinetics determined by quantitative magnetic fractionation in Melanesian children with uncomplicated malaria treated with artemisinin combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(8), 4489 (2015).
- [267] Benjamin J, Moore B, Lee ST et al. Artemisinin-naphthoquine combination therapy for uncomplicated pediatric malaria: a tolerability, safety, and preliminary efficacy study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(5), 2465 (2012).
- [268] Tjitra E, Hasugian AR, Siswantoro H et al. Efficacy and safety of artemisinin-naphthoquine versus dihydroartemisinin-piperaquine in adult patients with uncomplicated malaria: a multi-centre study in Indonesia. *Malaria J.* 11, 153 (2012).
- [269] Spillman NJ, Kirk K. The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Intl. J. Parasitol. Drugs Drug Res.* 5(3), 149–162 (2015).
- [270] Jimenez-Diaz MB, Ebert D, Salinas Y et al. (+)-SJ733, a clinical candidate for malaria that acts through ATP4 to induce rapid host-mediated clearance of *Plasmodium*. *PNAS* 111(50), E5455–E5462 (2014).
- [271] Medicines for Malaria Venture. SJ733 induced blood stage malaria challenge study (SJ733IBSMCS). In: ClinicalTrials.gov. Bethesda, MD <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02867059>
- [272] Vaidya AB, Morrissey JM, Zhang Z et al. Pyrazoleamide compounds are potent antimalarials that target Na⁺ homeostasis in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* 5(1), 5521 (2014).
- [273] Gaur D, Chitnis CE, Chauhan VS. *Advances in Malaria Research*. John Wiley & Sons, NJ, USA (2016).
- [274] Coslédan F, Fraisse L, Pellet A et al. Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105(45), 17579 (2008).

- [275] Bridgford JL, Xie SC, Cobbold SA et al. Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat. Commun.* 9(1), 3801 (2018).
- [276] Ngwa CJ, Kiesow MJ, Papst O et al. Transcriptional profiling defines histone acetylation as a regulator of gene expression during human-to-mosquito transmission of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 320 (2017).
- [277] Trenholme K, Marek L, Duffy S et al. Lysine acetylation in sexual stage malaria parasites is a target for antimalarial small molecules. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(7), 3666 (2014).
- [278] Andrews KT, Tran TN, Lucke AJ et al. Potent antimalarial activity of histone deacetylase inhibitor analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(4), 1454 (2008).
- [279] Andrews KT, Gupta AP, Tran TN, Fairlie DP, Gobert GN, Bozdech Z. Comparative gene expression profiling of *P. falciparum* malaria parasites exposed to three different histone deacetylase inhibitors. *PLoS ONE* 7(2), e31847–e (2012).
- [280] Wells TN, Hooft van Huijsduijnen R, Van Voorhis WC. Malaria medicines: a glass half full? *Nat. Rev. Drug Discov.* 14(6), 424–442 (2015).
- [281] Lucantoni L, Fidock DA, Avery VM. Luciferase-based, high-throughput assay for screening and profiling transmission-blocking compounds against *Plasmodium falciparum* gametocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(4), 2097–2107 (2016).
- [282] Vos MW, Stone WJR, Koolen KM et al. A semi-automated luminescence based standard membrane feeding assay identifies novel small molecules that inhibit transmission of malaria parasites by mosquitoes. *Sci. Rep.* 5, 18704 (2015).
- [283] Miguel-Blanco C, Lelièvre J, Delves MJ et al. Imaging-based HTS assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *P. falciparum* female gamete formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(6), 3298–305 (2015).
- [284] Bolscher JM, Koolen KMJ, van Gemert GJ et al. A combination of new screening assays for prioritization of transmission-blocking antimalarials reveals distinct dynamics of marketed and experimental drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(5), 1357–1366 (2015).
- [285] Hamerly T, Tweedell RE, Hritzo B et al. NPC1161B, an 8-aminoquinoline analog, is metabolized in the mosquito and inhibits *Plasmodium falciparum* oocyst maturation. *Front. Pharmacol.* 10, 1265 (2019).
- [286] Miley GP, Pou S, Winter R et al. ELQ-300 prodrugs for enhanced delivery and single-dose cure of malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(9), 5555 (2015).
- [287] Stickles AM, Smilkstein MJ, Morrissey JM et al. Atovaquone and ELQ-300 combination therapy as a novel dual-site cytochrome bc1 inhibition strategy for malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(8), 4853 (2016).
- [288] Nilsen A, LaCrue AN, White KL et al. Quinolone-3-diarylethers: a new class of antimalarial drug. *Sci. Transl. Med.* 5(177), 177ra37 (2013).
- [289] Nilsen A, Miley GP, Forquer IP et al. Discovery, synthesis, and optimization of antimalarial 4(1H)-quinolone-3-diarylethers. *J. Med. Chem.* 57(9), 3818–3834 (2014).
- [290] Smilkstein MJ, Pou S, Krollenbrock A et al. ELQ-331 as a prototype for extremely durable chemoprotection against malaria. *Malaria J.* 18(1), 291 (2019).
- [291] Frueh L, Li Y, Mather MW et al. Alkoxy carbonate ester prodrugs of preclinical drug candidate ELQ-300 for prophylaxis and treatment of malaria. *ACS Infect. Dis.* 3(10), 728–735 (2017).
- [292] Li Q, Xie L, Caridha D et al. Long-term prophylaxis and pharmacokinetic evaluation of intramuscular nano- and microparticle decoquinatate in mice infected with *P. berghei* sporozoites. *Malar. Res. Treat.* 2017, 7508291 (2017).
- [293] Nam T-g, McNamara CW, Bopp S et al. A chemical genomic analysis of decoquinatate, a *Plasmodium falciparum* cytochrome b inhibitor. *ACS Chem. Biol.* 6(11), 1214–1222 (2011).
- [294] da Cruz FP, Martin C, Buchholz K et al. Drug screen targeted at *Plasmodium* liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J. Infect. Dis.* 205(8), 1278–1286 (2012).
- [295] Beteck RM, Smit FJ, Haynes RK, N'Da DD. Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. *Malaria J.* 13(1), 339 (2014).
- [296] de Pilla Varotti F, Botelho ACC, Andrade AA et al. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(11), 3868 (2008).

- [297] de Lima DA, Andreotti CEL, Antiquera Ferreira F et al. Safety assessment of MEFAS: an innovative hybrid salt of mefloquine and artesunate for malaria treatment. *Drug Chem. Toxicol.* 1–6 (2019).
- [298] Czesny B, Goshu S, Cook JL, Williamson KC. The proteasome inhibitor epoxomicin has potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(10), 4080 (2009).
- [299] Kreidenweiss A, Kremsner PG, Mordmüller B. Comprehensive study of proteasome inhibitors against *Plasmodium falciparum* laboratory strains and field isolates from Gabon. *Malaria J.* 7, 187 (2008).
- [300] Shmuklarsky MJ, Klayman DL, Milhous WK et al. Comparison of β -artemether and β -arteether against malaria parasites in vitro and in vivo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(3), 377–384 (1993).
- [301] Tanaka TQ, Williamson KC. A malaria gametocytocidal assay using oxidoreduction indicator, alamarBlue. *Mol. Biochem. Parasitol.* 177(2), 160–163 (2011).
- [302] D’Alessandro S, Silvestrini F, Dechering K et al. A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J. Antimicrob. Chemother.* 68(9), 2048–2058 (2013).
- [303] Lelièvre J, Almela MJ, Lozano S et al. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP Bioluminescence “Transmission Blocking” Assay. *PLoS ONE* 7(4), e35019 (2012).
- [304] Kim KB, Crews CM. From epoxomicin to carfilzomib: chemistry, biology, and medical outcomes. *Nat. Prod. Rep.* 30(5), 600–604 (2013).
- [305] LaMonte GM, Almaliti J, Bibo-Verdugo B et al. Development of a potent inhibitor of the *Plasmodium* proteasome with reduced mammalian toxicity. *J. Med. Chem.* 60(15), 6721–6732 (2017).
- [306] Sun W, Tanaka TQ, Magle CT et al. Chemical signatures and new drug targets for gametocytocidal drug development. *Sci. Rep.* 4, 3743 (2014).
- [307] Dogovski C, Xie SC, Burgio G et al. Targeting the cell stress response of *Plasmodium falciparum* to overcome artemisinin resistance. *PLoS Biol.* 13(4), e1002132 (2015).
- [308] Aminake MN, Schoof S, Sologub L et al. Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(4), 1338 (2011).
- [309] Tarr SJ, Nisbet RER, Howe CJ. Transcript-level responses of *Plasmodium falciparum* to thiostrepton. *Mol. Biochem. Parasitol.* 179(1), 37–41 (2011).
- [310] Delves MJ, Ruecker A, Straschil U et al. Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(7), 3268–3274 (2013).
- [311] Ruecker A, Mathias DK, Straschil U et al. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(12), 7292–7302 (2014).
- [312] Ahyong V, Sheridan CM, Leon KE, Witchley JN, Diep J, DeRisi JL. Identification of *Plasmodium falciparum* specific translation inhibitors from the MMV Malaria Box using a high-throughput in vitro translation screen. *Malaria J.* 15(1), 173 (2016).
- [313] Lucantoni L, Duffy S, Adjalley SH, Fidock DA, Avery VM. Identification of MMV malaria box inhibitors of *Plasmodium falciparum* early-stage gametocytes, using a luciferase-based high-throughput assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(12), 6050–62 (2013).
- [314] Pestka S. Inhibitors of ribosome functions. *Annu. Rev. Microbiol.* 25(1), 487–562 (1971).
- [315] Corey VC, Lukens AK, Istvan ES et al. A broad analysis of resistance development in the malaria parasite. *Nat. Commun.* 7(1), 11901 (2016).
- [316] Machado M, Sanches-Vaz M, Cruz JP, Mendes AM, Prudêncio M. Inhibition of *Plasmodium* hepatic infection by antiretroviral compounds. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 329 (2017).
- [317] Hobbs CV, Tanaka TQ, Muratova O et al. HIV treatments have malaria gametocyte killing and transmission blocking activity. *J. Infect. Dis.* 208(1), 139–148 (2013).
- [318] Hobbs CV, De La Vega P, Penzak SR et al. The effect of antiretrovirals on *Plasmodium falciparum* liver stages. *AIDS* 27(10), 1674–1677 (2013).
- [319] Nsanzabana C, Rosenthal PJ. In vitro activity of antiretroviral drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(11), 5073–5077 (2011).

- [320] Hobbs CV, Neal J, Conteh S et al. HIV treatments reduce malaria liver stage burden in a non-human primate model of malaria infection at clinically relevant concentrations in vivo. *PLoS ONE* 9(7), e100138 (2014).
- [321] Hobbs CV, Gabriel EE, Kamthunzi P et al. Malaria in HIV-infected children receiving HIV protease-inhibitor-compared with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-based antiretroviral therapy, IMPAACT P1068s, substudy to P1060. *PLoS ONE* 11(12), e0165140 (2016).
- [322] Achan J, Kakuru A, Ikilezi G et al. Antiretroviral agents and prevention of malaria in HIV-infected Ugandan children. *N. Engl. J. Med.* 367(22), 2110–2118 (2012).
- [323] Sonoiki E, Nsanjabana C, Legac J, Sindhe K MV, DeRisi J, Rosenthal PJ. Altered *Plasmodium falciparum* sensitivity to the antiretroviral protease inhibitor lopinavir associated with polymorphisms in *pfdmr1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(1), e01949–16 (2017).
- [324] Parikh S, Gut J, Istvan E, Goldberg DE, Havlir DV, Rosenthal PJ. Antimalarial activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(7), 2983 (2005).
- [325] Kraft TE, Armstrong C, Heitmeier MR, Odom AR, Hruz PW. The glucose transporter PfHT1 is an antimalarial target of the HIV protease inhibitor lopinavir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(10), 6203 (2015).
- [326] Ikilezi G, Achan J, Kakuru A et al. Prevalence of asymptomatic parasitemia and gametocytemia among HIV-infected Ugandan children randomized to receive different antiretroviral therapies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88(4), 744–746 (2013).
- [327] Peatey CL, Andrews KT, Eickel N et al. Antimalarial asexual stage-specific and gametocytocidal activities of HIV protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(3), 1334 (2010).
- [328] Dechering KJ, Thompson J, Dodemont HJ, Eling W, Konings RNH. Developmentally regulated expression of *pfs16*, a marker for sexual differentiation of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89(2), 235–244 (1997).
- [329] Massimine KM, McIntosh MT, Doan LT et al. Eosin B as a novel antimalarial agent for drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(9), 3132 (2006).
- [330] Tanabe K. Inhibitory effect of rhodamine 123 on the growth of the rodent malaria parasite, *Plasmodium yoelii* 1. *J. Protozool.* 31(2), 310–313 (1984).
- [331] Tripathi R, Vishwakarma RA, Dutta GP. New antimalarial drug development: pre-clinical status of α and β artelinate as fast acting blood schizontocide. *Proc. Indian Natn Sci. Acad.* 74(3), 111–117 (2008).
- [332] Tripathi R, Puri SK, Dutta GP. Sodium β -artelinate – a new potential gametocytocide. *Exp. Parasitol.* 82(3), 251–254 (1996).
- [333] Mishra SK, Asthana OP, Mohanty S et al. Effectiveness of α , β -arteether in acute *falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89(3), 299–301 (1995).
- [334] Tripathi R, Dutta GP, Vishwakarma RA. Gametocytocidal activity of alpha/beta arteether by the oral route of administration. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 652–654 (1996).
- [335] Tripathi R, Dutta GP, Vishwakarma RA. Gametocytocidal activity of the antimalarial α/β arteether against *Plasmodium cynomolgi* B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43(6), 571–575 (1990).
- [336] Tabarrini O, Massari S, Daelemans D et al. Structure–activity relationship study on anti-HIV 6-desfluoroquinolones. *J. Med. Chem.* 51(17), 5454–5458 (2008).
- [337] Rajabalian S, Foroumadi A, Shafiee A, Emami. Functionalized N-(2-oxyminoethyl) piperazinyl quinolones as new cytotoxic agents. *J. Pharm. Sci.* 10(2), 153–158 (2007).
- [338] Greeff J, Joubert J, Malan SF, van Dyk S. Antioxidant properties of 4-quinolones and structurally related flavones. *Bioorg. Med. Chem.* 20(2), 809–818 (2012).
- [339] Winter R, Kelly JX, Smilkstein MJ, Hinrichs D, Koop DR, Riscoe MK. Optimization of endochin-like quinolones for antimalarial activity. *Exp. Parasitol.* 127(2), 545–551 (2011).
- [340] Biagini GA, Fisher N, Shone AE et al. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109(21), 8298 (2012).
- [341] Namelikonda NK, Monastyrskyi A, Manetsch R. Scalable multigram syntheses of antimalarial 4(1H)-quinolones ELQ-300 and P4Q-391. *Eur. J. Organ. Chem.* 2017(23), 3328–3334 (2017).
- [342] Monastyrskyi A, Kyle DE, Manetsch R. 4(1H)-pyridone and 4(1H)-quinolone derivatives as antimalarials with erythrocytic, exoerythrocytic, and transmission blocking activities. *Curr. Top. Med. Chem.* 14(14), 1693–1705 (2014).

- [343] Sáenz FE, LaCrue AN, Cross RM et al. 4-(1H)-Quinolones and 1,2,3,4-tetrahydroacridin-9(10H)-ones prevent the transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles freeborni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(12), 6187 (2013).
- [344] LaCrue AN, Sáenz FE, Cross RM et al. 4(1H)-Quinolones with liver stage activity against *Plasmodium berghei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(1), 417 (2013).
- [345] Cross RM, Monastyrskyi A, Mutka TS, Burrows JN, Kyle DE, Manetsch R. Endochin optimization: structure–activity and structure–property relationship studies of 3-substituted 2-methyl-4(1H)-quinolones with antimalarial activity. *J. Med. Chem.* 53(19), 7076–7094 (2010).
- [346] Cross RM, Namelikonda NK, Mutka TS, Luong L, Kyle DE, Manetsch R. Synthesis, antimalarial activity, and structure–activity relationship of 7-(2-Phenoxyethoxy)-4(1H)-quinolones. *J. Med. Chem.* 54(24), 8321–8327 (2011).
- [347] Akompong T, Ghorri N, Haldar K. In vitro activity of riboflavin against the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(1), 88 (2000).
- [348] Akompong T, Eksi S, Williamson K, Haldar K. Gametocytocidal activity and synergistic interactions of riboflavin with standard antimalarial drugs against growth of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(11), 3107 (2000).
- [349] Lucantoni L, Yerbanga RS, Lupidi G, Pasqualini L, Esposito F, Habluetzel A. Transmission blocking activity of a standardized neem (*Azadirachta indica*) seed extract on the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in its vector *Anopheles stephensi*. *Malaria J.* 9(1), 66 (2010).
- [350] Dhar R, Zhang K, Talwar GP, Garg S, Nirbhay K. Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *J. Ethnopharmacol.* 61(1), 31–39 (1998).
- [351] Jones IW, Denholm AA, Ley SV, Lovell H, Wood A, Sinden RE. Sexual development of malaria parasites is inhibited in vitro by the Neem extract Azadirachtin, and its semi-synthetic analogues. *FEMS Microbiol. Lett.* 120(3), 267–273 (1994).
- [352] Jerobin J, Makwana P, Suresh Kumar RS, Sundaramoorthy R, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Antibacterial activity of neem nanoemulsion and its toxicity assessment on human lymphocytes in vitro. *Int. J. Nanomedicine* 10(Suppl. 1), 77–86 (2015).
- [353] Mistry KS, Sanghvi Z, Parmar G, Shah S. The antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi*, *Tinospora cardifolia*, *Ocimum sanctum* and 2% chlorhexidine gluconate on common endodontic pathogens: an in vitro study. *Eur. J. Dent.* 8(2), 172–177 (2014).
- [354] Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A et al. Progress on *Azadirachta indica*-based biopesticides in replacing synthetic toxic pesticides. *Front Plant Sci.* 8, 610 (2017).
- [355] Imbahale SS, Mukabana WR. Efficacy of neem chippings for mosquito larval control under field conditions. *BMC Ecol.* 15, 8 (2015).
- [356] Hao F, Kumar S, Yadav N, Chandra D. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. *Biochim. Biophys. Acta* 1846(1), 247–257 (2014).
- [357] Upadhyay SN, Kaushic C, Talwar GP. Antifertility effects of neem (*Azadirachta indica*) oil by single intrauterine administration: a novel method for contraception. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 242(1305), 175–179 (1990).
- [358] Ganguli S. Neem: a therapeutic for all seasons. *Curr. Sci.* 82, 1304 (2002).
- [359] Nagendrappa PB, Naik MP, Payyappallimana U. Ethnobotanical survey of malaria prophylactic remedies in Odisha. *J. Ethnopharmacol.* 146(3), 768–772 (2013).
- [360] Yerbanga RS, Lucantoni L, Lupidi G et al. Antimalarial plant remedies from Burkina Faso: their potential for prophylactic use. *J. Ethnopharmacol.* 140(2), 255–260 (2012).
- [361] Billker O, Shaw MK, Jones IW, Ley SV, Mordue AJ, Sinden RE. Azadirachtin disrupts formation of organised microtubule arrays during microgametogenesis of *Plasmodium berghei*. *J. Eukar. Microbiol.* 49(6), 489–497 (2002).
- [362] Ganesh D, Fuehrer H-P, Starzengrüber P et al. Antiplasmodial activity of flavonol quercetin and its analogues in *Plasmodium falciparum*: evidence from clinical isolates in Bangladesh and standardized parasite clones. *Parasitol. Res.* 110(6), 2289–2295 (2012).
- [363] Lehane AM, Saliba KJ. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Res. Notes* 1, 26 (2008).
- [364] Udeinya JJ. Anti-malarial activity of Nigerian neem leaves. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87(4), 471 (1993).

- [365] Khalid SA, Duddeck H, Gonzalez-Sierra M. Isolation and characterization of an antimalarial agent of the neem tree *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.* 52(5), 922–927 (1989).
- [366] Udeinya IJ, Brown N, Shu EN, Udeinya FI, Quakeyie I. Fractions of an antimalarial neem-leaf extract have activities superior to chloroquine, and are gametocytocidal. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100(1), 17–22 (2006).
- [367] Yerbanga RS, Lucantoni L, Ouédraogo RK et al. Transmission blocking activity of *Azadirachta indica* and *Guiera senegalensis* extracts on the sporogonic development of *Plasmodium falciparum* field isolates in *Anopheles coluzzii* mosquitoes. *Parasites Vectors* 7(1), 185 (2014).
- [368] Dahiya N, Chianese G, Abay SM et al. In vitro and ex vivo activity of an *Azadirachta indica* A. Juss. seed kernel extract on early sporogonic development of *Plasmodium* in comparison with azadirachtin A, its most abundant constituent. *Phytomedicine* 23(14), 1743–1752 (2016).
- [369] Tapanelli S, Chianese G, Lucantoni L, Yerbanga RS, Habluetzel A, Tagliatela-Scafati O. Transmission blocking effects of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel limonoids on *Plasmodium berghei* early sporogonic development. *Fitoterapi* 114, 122–126 (2016).
- [370] Deng Y-x, Cao M, Shi D-x et al. Toxicological evaluation of neem (*Azadirachta indica*) oil: acute and subacute toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35(2), 240–246 (2013).
- [371] Upadhyay SN, Dhawan S, Garg S, Talwar GP. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. *Int. J. Immunopharmacol.* 14(7), 1187–1193 (1992).
- [372] Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis P. The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS ONE* 8(6), e62906 (2013).
- [373] Lucantoni L, Loganathan S, Avery VM. The need to compare: assessing the level of agreement of three high-throughput assays against *Plasmodium falciparum* mature gametocytes. *Sci. Rep.* 7, 45992 (2017).
- [374] van Voorhis WC, Adams JH, Adelfio R et al. Open source drug discovery with the malaria box compound collection for neglected diseases and beyond. *PLoS Pathog.* 12(7), e1005763 (2016).
- [375] Hansen FK, Sumanadasa SDM, Stenzel K et al. Discovery of HDAC inhibitors with potent activity against multiple malaria parasite life cycle stages. *Eur. J. Med. Chem.* 82, 204–213 (2014).
- [376] Patel PR, Sun W, Kim M et al. In vitro evaluation of imidazo[4,5-c]quinolin-2-ones as gametocytocidal antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26(12), 2907–2911 (2016).
- [377] Tanaka TQ, Deu E, Molina-Cruz A et al. *Plasmodium* dipeptidyl aminopeptidases as malaria transmission-blocking drug targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(10), 4645–4652 (2013).
- [378] Pastrana-Mena R, Mathias DK, Delves M et al. A malaria transmission-blocking (+)-usnic acid derivative prevents *Plasmodium* zygote-to-ookinete maturation in the mosquito midgut. *ACS Chem. Biol.* 11(12), 3461–3472 (2016).
- [379] Tanaka TQ, Guiguemde WA, Barnett DS et al. Potent *Plasmodium falciparum* gametocytocidal activity of diamionaphthoquinones, lead antimalarial chemotypes identified in an antimalarial compound screen. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(3), 1389–1397 (2015).
- [380] Maron MI, Magle CT, Czesny B et al. Maduramicin rapidly eliminates malaria parasites and potentiates the gametocytocidal activity of the pyrazoleamide PA21A050. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60(3), 1492–1499 (2015).
- [381] Yanow SK, Purcell LA, Pradel G et al. Potent antimalarial and transmission-blocking activities of centanamycin, a novel DNA-binding agent. *J. Infect. Dis.* 197(4), 527–534 (2008).
- [382] Alessandro S, Corbett Y, Ilboudo DP et al. Salinomycin and other ionophores as a new class of antimalarial drugs with transmission-blocking activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59(9), 5135 (2015).
- [383] Ōmura S, Crump A. Ivermectin and malaria control. *Malaria J.* 16, 172 (2017).
- [384] de Carvalho LP, Sandri TL, José Tenório de Melo E et al. Ivermectin impairs the development of sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63(8), e00085-19 (2019).
- [385] Chaccour CJ, Kobylinski KC, Bassat Q et al. Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. *Malaria J.* 12(1), 153 (2013).
- [386] Chaccour C, Lines J, Whitty CJM. Effect of ivermectin on *Anopheles gambiae* mosquitoes fed on humans: the potential of oral insecticides in malaria control. *J. Infect. Dis.* 202(1), 113–116 (2010).
- [387] Kobylinski KC, Foy BD, Richardson JH. Ivermectin inhibits the sporogony of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malaria J.* 11(1), 381 (2012).

- [388] Foy BD, Alout H, Seaman JA et al. Efficacy and risk of harms of repeat ivermectin mass drug administrations for control of malaria (RIMDAMAL): a cluster-randomised trial. *Lancet* 393(10180), 1517–1526 (2019).
- [389] Sylla M, Kobylinski KC, Gray M et al. Mass drug administration of ivermectin in south-eastern Senegal reduces the survivorship of wild-caught, blood fed malaria vectors. *Malaria J.* 9(1), 365 (2010).
- [390] Kobylinski KC, Sylla M, Chapman PL, Sarr MD, Foy BD. Ivermectin mass drug administration to humans disrupts malaria parasite transmission in Senegalese villages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85(1), 3–5 (2011).
- [391] Chaccour C, Hammann F, Rabinovich NR. Ivermectin to reduce malaria transmission I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations regarding efficacy and safety. *Malaria J.* 16(1), 161 (2017).
- [392] WHO. Malaria Policy Advisory Committee Meeting, Ivermectin for malaria transmission control. WHO, Geneva, Switzerland (2016).