

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de ensayos *in vitro* para la identificación de nuevas moléculas con actividad antimalárica y bloqueantes de la transmisión de la enfermedad**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Celia Miguel Blanco**

Directora

**M<sup>a</sup> Esperanza Herreros Avilés**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**GLAXOSMITHKLINE I+D**

*Diseases of the Developing World*



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo de ensayos *in vitro* para la identificación de nuevas moléculas con actividad antimalárica y bloqueantes de la transmisión de la enfermedad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Celia Miguel Blanco**

DIRECTORA

M<sup>a</sup> Esperanza Herreros Avilés

**Madrid, 2018**





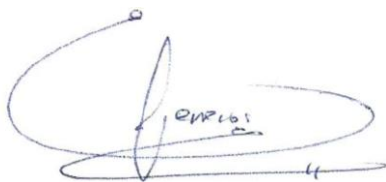
Dña. M<sup>a</sup> Esperanza Herreros Avilés, doctora en Farmacia, *Chief Scientist* y *Manager* de Biología en el departamento de Malaria de la empresa GlaxoSmithKline I+D,

**CERTIFICA:**

Que la tesis doctoral titulada: “Desarrollo de ensayos *in vitro* para la identificación de nuevas moléculas con actividad antimalárica y bloqueantes de la transmisión de la enfermedad” que presenta Dña. Celia Miguel Blanco, Licenciada en Biología y Máster en Microbiología y Parasitología por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección, en el centro *Diseases of the Developing World* (DDW) de GlaxoSmithKline I+D (Tres Cantos, Madrid) y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación como directora de la mencionada tesis doctoral.

Madrid, 2018



M<sup>a</sup> Esperanza Herreros Avilés



# Agradecimientos

---

*La presente Tesis doctoral ha sido realizada en el centro de investigación Diseases of the Developing World (DDW) de GlaxoSmithKline I+D (Tres Cantos, Madrid), gracias a un proyecto financiado por la Fundación Bill y Melinda Gates, y desarrollado en colaboración con el grupo del Prof. Robert Sinden y el Prof. Jake Baum del departamento Life Sciences en el Imperial College of London (Londres).*

*Tras estos intensos años de esfuerzo intentando compaginar trabajo y tesis, finalmente puedo dar por concluido este periodo de mi vida. Por ello, ha llegado el momento de mostrar mi sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de una u otra manera, han sido parte fundamental del mismo, permitiendo que este día se hiciese realidad.*

*En primer lugar, quiero agradecer a la que fue mi jefa, a la par que directora de esta tesis, la Dra. Esperanza Herreros, la oportunidad que me brindó de entrar a formar parte de la familia GSK. Muchas gracias por tu gran apoyo, así como por la confianza depositada durante todos estos años. Entre otras muchas cosas, me enseñaste a sacar provecho y crecerme ante las situaciones adversas, lo cual me ha ayudado a crecer tanto personal como profesionalmente.*

*Gracias también a la Dra. Ana Martín del departamento de Fisiología, Genética y Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas de la UCM, por su tutela durante la tesis y su ayuda con los trámites burocráticos.*

*A Joël, por confiar en mí e introducirme en el mundo de *Plasmodium* y sus gametocitos. A mis “gametogirls” Irene, Sonia y Janneth, ha sido un verdadero placer trabajar codo a codo con vosotras. Habéis sido las mejores compañeras y amigas, muchas gracias por vuestro apoyo incondicional y por todas esas risas, tan gratificantes como necesarias en algunos momentos.*

*Gracias también a mis compañeros del Imperial College, Michael y Andrea, y a mi jefe Jake, por todo lo que me habéis enseñado sobre la malaria estos años y la gran acogida que me brindasteis durante mi estancia en Londres.*

*A todos mis compañeros y amigos de GSK, con los que he tenido la suerte de trabajar en mayor o menor medida, muchas gracias por estar ahí cuando os he necesitado. Por todo lo que he aprendido de cada uno de vosotros, así como por vuestro afecto y comprensión durante todos estos años de duro trabajo.*

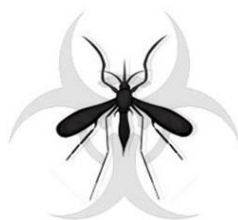
*Gracias a mis amigos, en especial a Ángela, Diego, Clara, Sara y Felipe, por todo el apoyo y el cariño que me habéis dado estos años. Vosotros constituís una parte fundamental de mi vida y sé que siempre os voy a tener ahí, en las buenas y en las malas. Gracias también a mi hermana Andrea que, aun en la distancia, ha sabido transmitirme su cariño y su apoyo.*

*Para terminar, quiero dar las gracias a las personas sin las cuales yo no habría llegado a ser quien soy hoy en día, mis padres. Nunca podré agradecer lo suficiente todo el esfuerzo y sacrificio que habéis hecho en vuestra vida para darme la oportunidad de llegar hasta aquí. Solo espero haber estado a la altura y haceros sentir orgullosos del resultado.*

*MUCHAS GRACIAS A TODOS*

*If you think you are too small  
to make a difference,  
try sleeping with a mosquito.*

*-Dalai Lama-*





# Índice

<b>Índice de figuras y tablas</b> .....	1
<b>Acrónimos y abreviaturas</b> .....	3
<b>Summary</b> .....	5
<b>Resumen</b> .....	9
<b>Introducción</b> .....	13
1. Ciclo de vida del parásito responsable de la malaria en humanos.....	15
2. La gametocitogénesis en <i>P. falciparum</i> .....	24
3. La gametogénesis en <i>P. falciparum</i> .....	28
4. Distribución geográfica de la enfermedad y su vector .....	29
5. Sintomatología clínica de la malaria.....	32
6. Tratamiento y prevención de la malaria .....	33
7. Descubrimiento de antimaláricos mediante cribado de alto rendimiento.....	39
<b>Objetivos</b> .....	45
<b>Materiales y métodos</b> .....	49
1. Células sanguíneas .....	51
2. Cultivo de formas asexuales eritrocíticas de <i>P. falciparum</i> .....	51
3. Producción de gametocitos .....	51
4. Ensayo de activación del gametocito femenino ( <i>PfFGAA</i> ).....	52
5. Compuestos y controles .....	53
6. Adquisición y análisis de imagen .....	54
7. Análisis de datos .....	55
8. Ensayo bioluminiscente de ATP.....	56
9. Ensayo de exflagelación del gametocito masculino .....	56
10. <i>Standard Membrane Feeding Assay</i> (SMFA).....	57
11. Ensayo de citotoxicidad con células hepáticas HepG2.....	58
12. Evaluación de la eficacia terapéutica antimalárica <i>in vivo</i> .....	58
13. Estudios de farmacocinética <i>in vivo</i> .....	59
14. Ensayo de aclaramiento intrínseco.....	59
15. Ensayo de permeabilidad a través de membranas artificiales.....	60

<b>Resultados</b> .....	61
Capítulo I. Escalado y validación del ensayo de activación del gametocito femenino de <i>P. falciparum</i> (PfFGAA) .....	63
1. Puesta a punto del PfFGAA en formato de alta densidad .....	65
2. Comparativa del PfFGAA en los formatos de bajo y alto rendimiento.....	71
3. Validación del ensayo PfFGAA en formato de alto rendimiento.....	73
Capítulo II. Cribado de la colección “Tres Cantos Antimalarial Set” (TCAMS) en el ensayo PfFGAA.....	75
1. Determinación de las condiciones de cribado del TCAMS.....	77
2. Cribado de la colección TCAMS .....	79
2.1. Identificación de los compuestos con actividad para bloquear la transmisión de malaria .....	79
2.2. Clasificación química de los compuestos activos .....	81
3. Caracterización del perfil biológico de 90 moléculas con actividad frente a gametocitos V y formas asexuales de <i>P. falciparum</i> .....	87
3.1. Estudios <i>in vitro</i> .....	87
3.2. Estudios <i>ex vivo</i> en el mosquito .....	89
3.3. Estudios <i>in vivo</i> en un modelo de ratón.....	92
<b>Discusión</b> .....	95
1. Importancia del desarrollo de nuevos métodos de identificación de compuestos bloqueantes de la transmisión .....	97
2. Actividad de los antimaláricos comerciales frente a la formación del gameto femenino .....	100
3. Identificación y caracterización de moléculas con actividad dual en la colección TCAMS .....	106
<b>Conclusiones</b> .....	115
<b>Bibliografía</b> .....	119
<b>Anexos</b> .....	133
Tablas suplementarias .....	135
Artículos publicados en relación con la tesis .....	159

# Índice de figuras y tablas

---

- Figura 1.** Ciclo de vida de *Plasmodium spp.*
- Figura 2.** Ciclo exoeritrocítico o hepático de *Plasmodium spp.*
- Figura 3.** Fases del proceso de invasión eritrocítica del merozoíto.
- Figura 4.** Ciclo asexual intraeritrocítico de *P. falciparum*.
- Figura 5.** Proceso de gametocitogénesis de *P. falciparum*.
- Figura 6.** Estructura celular de los diferentes estadios de gametocitos.
- Figura 7.** Ciclo esporogónico de *Plasmodium spp.*
- Figura 8.** Secuestro de los estadios asexuales y los gametocitos jóvenes.
- Figura 9.** Proceso de diferenciación de las formas asexuales eritrocíticas en gametocitos.
- Figura 10.** Evolución de la endemividad de malaria entre los años 2000 y 2016.
- Figura 11.** Hembra del mosquito *Anopheles stephensi*.
- Figura 12.** Distribución global de los vectores de malaria dominantes o potencialmente importantes.
- Figura 13.** Principales clases de antimaláricos.
- Figura 14.** Actividad de diferentes clases de antimaláricos sobre las distintas fases del ciclo de vida de *P. falciparum*.
- Figura 15.** Imágenes y representación gráfica de la curva de dosis-respuesta del compuesto usado como control positivo, tioestreptón.
- Figura 16.** Diagrama del protocolo del ensayo de activación del gametocito femenino de *P. falciparum* en formato de alto rendimiento.
- Figura 17.** Imagen de los eventos discriminados por el algoritmo empleado en el ensayo *PfFGAA* mediante los parámetros de tamaño, redondez y fluorescencia.
- Figura 18.** Calidad y sensibilidad del ensayo *PfFGAA* en formato de alto rendimiento.
- Figura 19.** Determinación de las condiciones óptimas para el cribado de alto rendimiento de la colección TCAMS.
- Figura 20.** Cascada de progresión del cribado de la colección TCAMS en el ensayo *PfFGAA*.
- Figura 21.** Gráfico de correlación entre los compuestos positivos en el cribado con el ensayo *PfFGAA* comparado con sus actividades en el ensayo bioluminiscente de ATP.

**Figura 22.** Estructura química de 15 compuestos TCAMS progresados para evaluar su perfil biológico.

**Figura 23.** Diversidad de perfiles biológicos que permite identificar el ensayo *PfFGAA*.

**Figura 24.** Diagrama del protocolo empleado en el ensayo SMFA.

**Figura 25.** Efecto de los compuestos TCAMS sobre el proceso de exflagelación de los gametocitos masculinos.

**Figura 26.** Efecto de los compuestos TCAMS seleccionados en el ensayo SMFA.

**Figura 27.** Diagrama del ensayo de eficacia terapéutica en ratones infectados con *P. berghei*.

**Figura 28.** Efecto de los dos compuestos TCAMS seleccionados que fueron ensayados en el modelo *in vivo* de ratón de *P. berghei*.

**Figura 29.** Estructuras químicas de compuestos TCAMS que han sido descritos previamente.

**Figura 30.** Fases sexuales de *P. falciparum* sobre las que actúan los compuestos identificados por el ensayo *PfFGAA*.

**Tabla 1.** Actividad de 20 fármacos antimaláricos en el ensayo *PfFGAA*.

**Tabla 2.** Evaluación en dosis-respuesta de los compuestos positivos con más del 50% de inhibición en el ensayo *PfFGAA*.

**Tabla 3.** Actividad gametocitocida del set de antimaláricos MMV50 en el formato de alto rendimiento del ensayo *PfFGAA*.

**Tabla 4.** Actividad de 90 compuestos frente a los gametocitos en estadio V (ensayo *PfFGAA*) y su toxicidad en células hepáticas de mamífero (HepG2).

**Tabla 5.** Perfil biológico y químico de los seis compuestos de TCAMS ensayados en el SMFA.

**Tabla 6.** Compuestos del TCAMS con actividad frente a múltiples estadios de *Plasmodium*.

**Tabla suplementaria 1.** Parámetros biológicos de los 405 *hits* del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *PfFGAA*.

**Tabla suplementaria 2.** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

**Tabla suplementaria 3.** Parámetros biológicos de los 90 compuestos caracterizados con los diferentes formatos del ensayo *PfFGAA*.

## Acrónimos y abreviaturas

---

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

AMA-1: antígeno apical de membrana 1, del inglés *apical membrane antigen 1*

CeLTOS: proteína del ooquineto y esporozoíto para atravesar células, del inglés *cell traversal protein for ookinete and sporozoite*

cGMP: guanosín monofosfato cíclico

clogP: valor calculado del coeficiente de partición, medida de lipofilidad de una molécula

CSA: condroitina sulfato A

CSP: proteína circumesporozoíto

DE: desviación estándar

DMSO: dimetilsulfóxido

DOZI: desarrollo del cigoto inhibido, del inglés *development of zygote inhibited*

EBLs: proteínas de unión al eritrocito, del inglés *erythrocyte binding-like proteins*

ED<sub>50</sub>: dosis efectiva al 50%

G6PD: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

GEST: proteína de salida del gameto y recorrido del esporozoíto, del inglés *gamete egress and sporozoite traversal protein*

GFI: glicosil fosfatidilinositol

GSK: GlaxoSmithKline

IC<sub>50</sub>: concentración inhibitoria al 50%

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1

IP3: inositol trifosfato

MalERA: *Malaria Eradication Research Agenda*

MMV: *Medicines for Malaria Venture*

MSP 1: proteína de superficie del merozoíto 1, del inglés *merozoite surface protein 1*

MESA: *Malaria Eradication Scientific Alliance*

Novartis-GNF: *Genomics Institute of the Novartis Research Foundation*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PATH: *Programme for Appropriate Technology in Health*

PfEMP-1: proteína de membrana del eritrocito de *P. falciparum* 1

PfFGAA: ensayo de activación del gametocito femenino de *P. falciparum*, del inglés *P. falciparum female gametocyte activation assay*

PI4K: fosfatidilinositol 4-kinasa

PIP-2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKIS: *Published Kinase Inhibitor Set*

pLDH: lactato deshidrogenasa de *Plasmodium*

PLP-1: *perforin-like protein 1*

Rhs: homólogos de proteínas de unión a reticulocitos, del inglés *reticulocyte-binding protein homologs*

RON: proteína del cuello de la roptria, del inglés *rhoptry neck protein*

SJCRH: *St. Jude Children's Research Hospital*

SMFA: *Standard Membrane Feeding Assay*

SPECT: proteína de micronema del esporozoíto esencial para atravesar células, del inglés *sporozoite microneme protein essential for cell traversal*

TCAs: terapias combinadas con artemisininas

TCAMS: *Tres Cantos Antimalarial Set*

# *Summary*

---



Malaria still remains a major global health problem, affecting more than 200 million people and causing over 400,000 deaths annually. This disease shows the highest mortality rate in children below 5 years old and pregnant women from Sub-Saharan Africa, where the highest burden of *Plasmodium falciparum* malaria is found. During the last decade several strategies have been deployed and implemented, both for vector control (female *Anopheles* mosquitoes) and chemotherapy for the human host. One of these strategies has focused on the discovery and development of new drugs that may cause a blockade of parasite transmission from human host to mosquito. To achieve this, elimination of *Plasmodium* transmissible stages – stage V gametocytes – is required since there is only one approved drug with activity against these stages, primaquine, which administration is limited to a part of the population where malaria is endemic.

This Thesis work reports the adaptation and development of a new *in vitro* assay that not only allows the identification of molecules inhibiting *P. falciparum* female gamete formation, but also to a high throughput level for compound screening. Utilizing the surface protein Pfs25 (conjugated with the fluorochrome Cy3) as specific marker for female gametes, we are able to identify (by fluorescence microscopy) compounds affecting gametocyte to gamete transformation, a process that naturally occurs inside the mosquito. Given that zygote formation and onwards development requires both male and female functionally viable gametes, the solely elimination of one of them will interrupt the parasite lifecycle.

The female gametocyte activation assay (*Pf*FGAA) scale-up to high throughput format was possible through a combined effort of gametocyte culture scale-up and high resolution imaging technology, which included a specific algorithm to discriminate viable female gametes. Once the optimal parameters of the assay were established, a set of 50 standard antimalarials was evaluated in the *Pf*FGAA. This evaluation not only validated the assay but also highlighted the reduced number of available drugs active against the parasite transmissible stages and, therefore, the urgent need to develop them.

The Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS), a collection of 13,533 compounds with activity against *P. falciparum* asexual blood stages, was selected for screening in the

*Pf*FGAA. This collection was chosen mainly based on our main objective of discovering dual-stage active molecules, with activity against the asexual blood stages, responsible for the clinical symptoms of malaria, as well as against stage-V gametocytes, responsible for the disease transmission.

The TCAMS screening campaign identified 405 molecules inhibiting female gamete formation. A broad diversity of both biological and chemical profiles were described among the hits, some of which were progressed to more specific assays to characterize their profile further. In addition, with the aim to confirm the potential of our hits as transmission-blocking molecules in the mosquito, as well as the correlation with the *in vitro* data, the activity of six molecules was evaluated in the gold-standard assay “Standard Membrane Feeding Assay” (SMFA). Furthermore, two of these molecules blocking transmission in the mosquito, were evaluated in the *P. berghei* mouse model, showing their activities against asexual blood stages *in vivo*. Finally, a series of pharmacokinetic studies and ADME revealed interesting data about their bioavailability.

To conclude, this Thesis work has allowed the development of a new *in vitro* assay useful for compound screen at high throughput format, as well as the identification of hundreds of new molecules with potential to block parasite transmission. Therefore, this constitutes an important advance not only for the development of potential clinical candidates, but also to increase the knowledge about parasite biology involved in transmission, which might be useful in any of the other strategies that eventually pursue malaria eradication.

# Resumen

---



La malaria aún constituye un grave problema de salud a nivel global, afectando a más de 200 millones de personas y provocando más de 400.000 muertes cada año. Esta enfermedad tiene la mayor tasa de mortalidad en niños menores de 5 años y mujeres embarazadas del África subsahariana, donde se concentra la mayor incidencia de casos producidos por la especie *Plasmodium falciparum*. Durante la última década se han desarrollado e implementado diversas estrategias tanto a nivel de control del vector (la hembra del mosquito *Anopheles*) como de quimioterapia para el hospedador humano. Una de estas estrategias se ha centrado en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos que permitan una interrupción de la transmisión del parásito desde el hospedador al mosquito. Para ello, se requiere la eliminación de los estadios transmisibles de *Plasmodium*, los gametocitos en estadio V, frente a los cuales solo existe actualmente un antimalárico comercial, la primaquina, cuya administración está contraindicada en una parte de la población donde la malaria es endémica.

En el presente trabajo de Tesis se describe la adaptación y el desarrollo de un ensayo *in vitro* que no solo permite la identificación de moléculas que inhiben la funcionalidad de los gametocitos V de *P.falciparum*, sino que además lo hace en un formato de alto rendimiento. Utilizando como marcador específico del gameto femenino la proteína de superficie Pfs25 conjugada con el fluorocromo Cy3, es posible identificar (mediante microscopía de fluorescencia) compuestos que impidan la transformación de los gametocitos femeninos a gametos, un proceso que ocurre de forma natural en el interior del mosquito. Dado que la formación del cigoto y su posterior desarrollo requiere de la presencia de gametos masculinos y femeninos viables, la eliminación de uno de ellos producirá una interrupción en el ciclo de vida del parásito.

La adaptación del ensayo de activación del gametocito femenino (*PfFGAA*, del inglés *P. falciparum* Female Gametocyte Activation Assay) a formato de alto rendimiento fue posible gracias a los esfuerzos combinados de escalado de la producción de gametocitos, así como a la tecnología de imagen de alta resolución, que permitió incorporar un algoritmo discriminante y específico de los gametos femeninos viables. Una vez conseguida la puesta a punto de los parámetros óptimos, se llevó a cabo la evaluación de un set de 50 antimaláricos comerciales que validó el

ensayo y puso de manifiesto la falta de fármacos activos frente a los estadios transmisibles del parásito y, con ello, la urgente necesidad de desarrollarlos.

Para el cribado de alto rendimiento con el ensayo *PfFGAA*, la colección elegida fue el *Tres Cantos Antimalarial Set* (TCAMS), constituida por 13.533 moléculas con actividad frente a las formas asexuales eritrocíticas de *P. falciparum*. La elección de esta colección se basó en la idea de encontrar moléculas con actividad dual, es decir, frente a los estadios asexuales eritrocíticos, que son responsables de la sintomatología clínica de la enfermedad, así como frente a los gametocitos en estadio V, que son responsables de la transmisión.

El cribado de la colección TCAMS permitió la identificación de 405 moléculas inhibitoras de la formación del gameto femenino. Entre las moléculas identificadas, se encontró una amplia diversidad de perfiles tanto químicos como biológicos, que fueron posteriormente progresados a ensayos más específicos para ser estudiados en mayor detalle. Por otro lado, y con el objetivo de confirmar el potencial de nuestras moléculas como bloqueantes de la transmisión en el mosquito, así como la correlación con los datos obtenidos en el ensayo *in vitro*, se evaluó la actividad de seis moléculas en el ensayo de referencia *Standard Membrane Feeding Assay* (SMFA). Adicionalmente, dos de estas moléculas ensayadas en el mosquito se estudiaron en el modelo de ratón de *P. berghei*, lo cual permitió evaluar la actividad *in vivo* de estos productos frente a las formas asexuales eritrocíticas. Finalmente, una serie de estudios farmacocinéticos y de ADME revelaron datos sobre la disponibilidad de estas dos moléculas en sangre.

En conclusión, este trabajo de Tesis ha permitido el desarrollo de un nuevo ensayo *in vitro* para cribado de alto rendimiento, así como el descubrimiento de cientos de nuevas moléculas con potencial para bloquear la transmisión del parásito. Por tanto, estos resultados suponen un importante avance no solo para el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos, sino también para incrementar el conocimiento sobre la biología del parásito implicada en su transmisión, que adicionalmente podría ser de utilidad en otras de las estrategias que persiguen la erradicación final de la malaria.

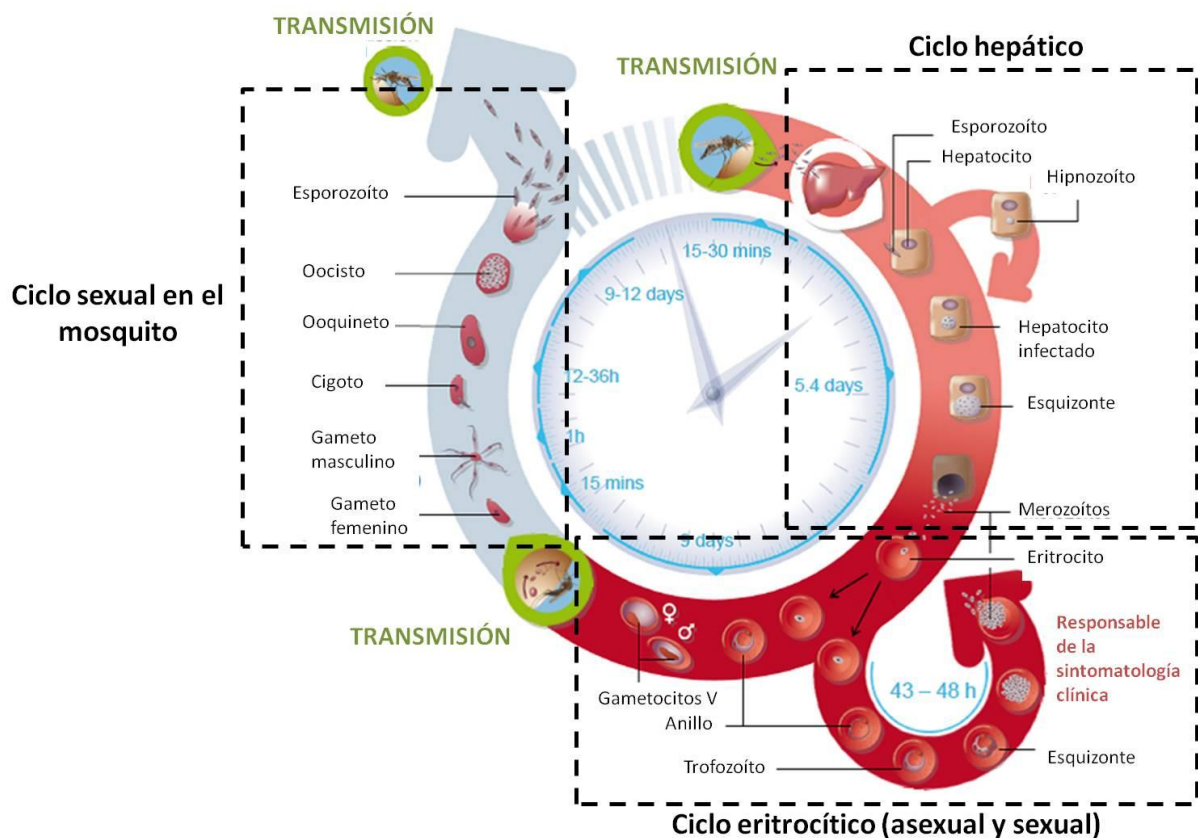
# Introducción

---



## 1. Ciclo de vida del parásito responsable de la malaria en humanos

Cinco especies de *Plasmodium* son responsables de producir malaria en los humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*), siendo la causada por *P. falciparum* la que presenta mayor severidad y mortalidad. El ciclo de vida de este protozoo (Figura 1) se desarrolla en el interior del vector, la hembra del mosquito *Anopheles*, y el hospedador vertebrado, y comprende cuatro fases principales que se describen a continuación.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp. La morfología de los distintos estadios varía según la especie, en la imagen se muestra el ciclo biológico de *P. falciparum* excepto en el caso de los hipnozoítos hepáticos, que solo se producen en *P. vivax* y *P. ovale*. Modificado de *Medicines for Malaria Venture* (MMV) (<http://www.mmv.org/about-us/malaria-and-medicines/parasite-lifecycle>)

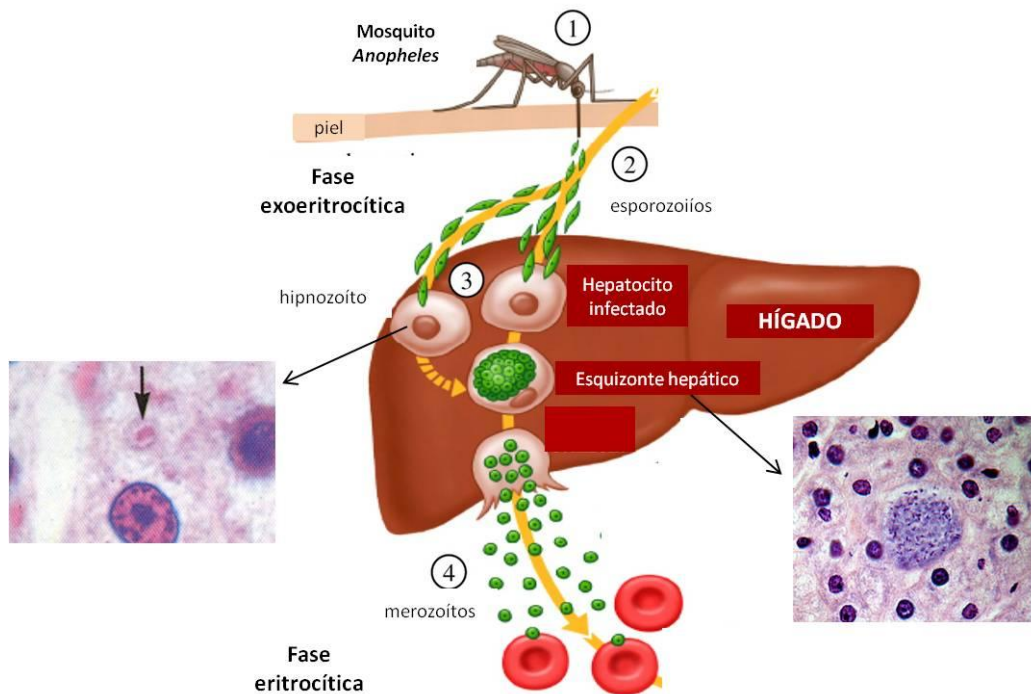
### 1.1. Ciclo exoeritrocítico o hepático

La picadura de un mosquito infectado puede llegar a transmitir entre 100-200 esporozoítos en la dermis del hospedador y, a pesar de la destrucción de la mayoría de ellos por el sistema inmune, los pocos remanentes son capaces de establecer infecciones en tan solo 1-3 horas <sup>1</sup>. La primera barrera con que se encuentra el parásito es la piel, sin embargo los esporozoítos han evolucionado para superar esta barrera mediante variadas estrategias mecánicas tales como su motilidad y capacidad para atravesar células <sup>2</sup>, que les permiten alcanzar la circulación sanguínea para acceder al hígado. La proteína TRAP-like juega un papel fundamental en la salida de los esporozoítos de la dermis, mientras que las principales proteínas que posibilitan al esporozoíto atravesar la barrera sinusoidal hepática y la posterior invasión de los hepatocitos son: SPECT (del inglés *sporozoite microneme protein essential for cell traversal*), SPECT-2 o PLP-1 (del inglés, *perforin-like protein 1*), CelTOS (del inglés *cell traversal protein for ookinete and sporozoites*) y GEST (del inglés *gamete egress and sporozoite traversal protein*) <sup>3</sup>.

La fase exoeritrocítica o hepática (Figura 2) es asintomática debido a que el hígado es un órgano inmunológicamente privilegiado ya que está protegido frente a una fuerte respuesta inmune <sup>4</sup>. Aunque inicialmente se consideró como una fase insensible, varios trabajos han mostrado que las células inmunes hepáticas están presentes y activas en diferentes modelos de roedores, lo que sugiere que se produce una respuesta inmune inicial en la fase hepática que implica la activación de citoquinas proinflamatorias tales como el interferón tipo I <sup>4</sup> y células *natural killer* que inhiben el crecimiento del parásito <sup>5</sup> y producen la apoptosis de células infectadas <sup>6</sup>, así como el aislamiento de los parásitos en compartimentos para su eliminación <sup>7</sup>. Sin embargo, el parásito tiene la capacidad de evadirse del sistema inmune del hospedador <sup>8</sup>.

Los esporozoítos que sobreviven a este primer ataque inmunológico se desarrollan en el interior de los hepatocitos dando lugar a la forma hepática del parásito (Figura 2). El proceso de maduración y replicación de estas formas, que lleva de 2 a 10 días, culmina con la liberación de cientos de miles de merozoítos a la circulación

sanguínea <sup>9</sup>. Los merozoítos liberados iniciarán acto seguido el ciclo eritrocítico, que es responsable de la sintomatología clínica de la enfermedad y las patologías asociadas a la malaria <sup>10</sup>.

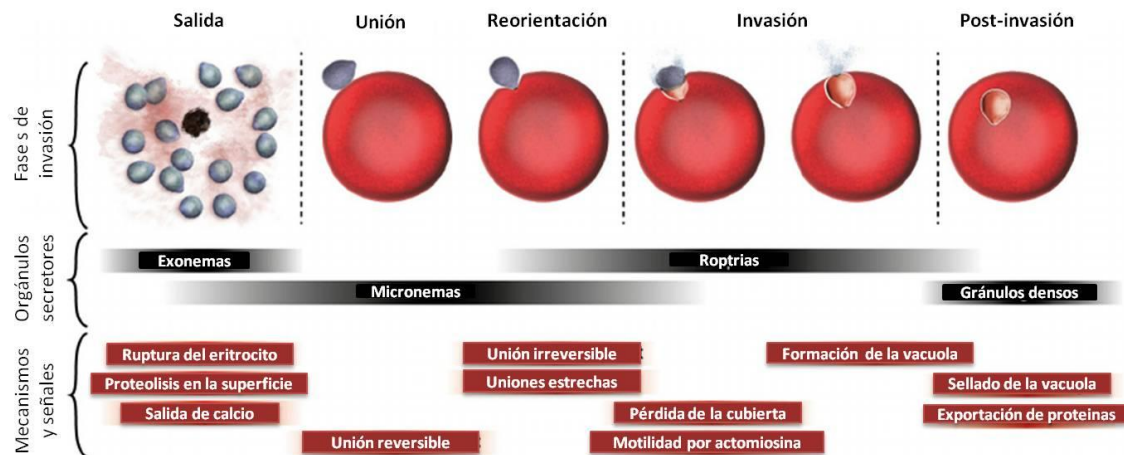


**Figura 2.** Ciclo exoeritrocítico o hepático de *Plasmodium* spp. Diagrama modificado de Hill 2011 <sup>11</sup>.

Algunas especies de *Plasmodium*, como *P. vivax* y *P. ovale*, son capaces de desarrollar esquizontes hepáticos conocidos como hipozoítos, formas quiescentes que se acantonan en los hepatocitos y permanecen latentes por periodos incluso superiores a un año. Estos hipozoítos son responsables de la recaída de la enfermedad y hasta la fecha son indetectables por los métodos diagnósticos actuales. Los mecanismos subyacentes a la reactivación de estas formas durmientes son poco conocidos aunque hay ciertos factores que pueden influir, como son la zona geográfica, la presencia de episodios febriles o la dosis de esporozoítos inyectados inicialmente <sup>12</sup>. Solo las 8-aminoquinolinas como la primaquina y la tafenoquina, esta última en fase clínica III, son capaces de eliminar estas formas de reducida actividad metabólica, presumiblemente mediante estrés oxidativo <sup>13</sup>.

## 1.2. Ciclo intraeritrocítico asexual

Los merozoítos liberados del hígado invaden los eritrocitos de una forma rápida y dinámica en un proceso de tres pasos: pre-invasión, invasión y equinocitosis (Figura 3), que se completa en dos minutos<sup>3,14</sup>.



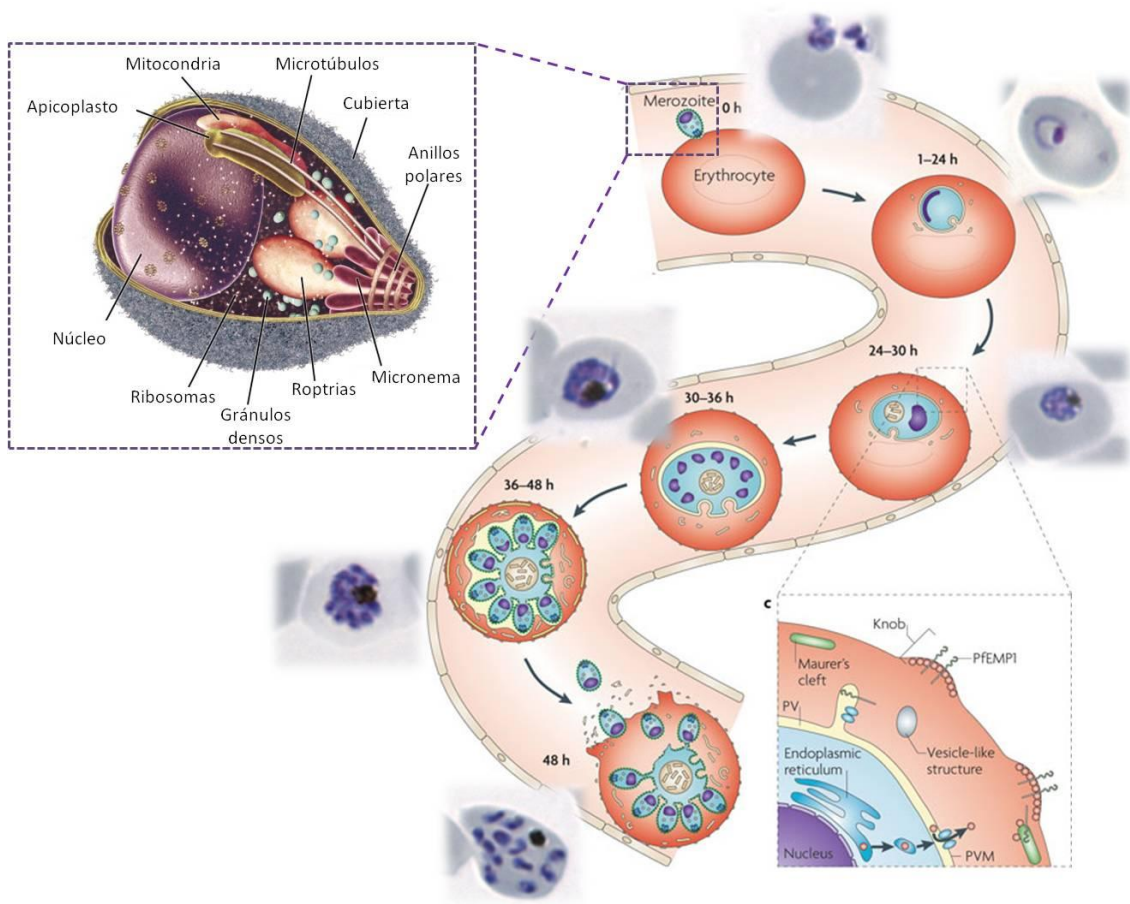
**Figura 3.** Fases del proceso de invasión eritrocítica del merozoíto. Se incluyen los orgánulos secretorios implicados en cada fase, así como los mecanismos y señales desencadenadas. Adaptada de Cowman *et al.* 2012<sup>15</sup>.

La cubierta del merozoíto contiene numerosas proteínas GFI (glicosil-fosfatidilinositol) ancladas en la membrana, que actúan como ligandos de proteínas de superficie del eritrocito<sup>16</sup>. De estas GFI, la proteína de superficie del merozoíto 1 (MSP-1, del inglés *merozoite surface protein 1*) es la más abundante y está involucrada en el reconocimiento y unión del merozoíto al eritrocito<sup>17</sup>. La pre-invasión consiste en una robusta interacción inicial del merozoíto con el eritrocito, durante la cual el parásito lleva a cabo una deformación de la membrana de la célula hospedadora mediante su motor de actomiosina. Este paso implica la actuación de dos familias de proteínas de membrana tipo 1 del parásito: EBLs (del inglés *erythrocyte binding-like proteins*) y Pfrhs (del inglés *P. falciparum reticulocyte-binding protein homologs*), que se unen a ligandos específicos como las glicoforinas (A, B y C) y el receptor del complemento 1 (CR1). Las proteínas EBLs y Pfrhs también juegan un importante papel de señalización celular durante la invasión<sup>15</sup>.

Tras la deformación del eritrocito, el merozoíto reorienta su extremo apical de forma que éste quede en contacto con la membrana plasmática, quedando unido el parásito de forma irreversible mediante uniones estrechas formadas por proteínas tanto del eritrocito como del parásito, principalmente el antígeno apical de membrana (AMA-1, del inglés *apical membrane antigen*) y el complejo RON (del inglés *roptry neck protein*)<sup>3,18</sup>. Los contenidos lipídicos de la roptria forman la vacuola parasitófora mientras el merozoíto es empujado al interior del eritrocito por el motor de actomiosina del parásito. Tras la fase de invasión activa, las membranas se fusionan por la parte posterior del merozoíto, sellando al parásito dentro de la vacuola parasitófora y del eritrocito. Finalmente se produce la equinocitosis, que causa el encogimiento del parásito y la formación de protusiones en la membrana del eritrocito, posiblemente debido a la entrada de calcio.

Una vez establecida la infección, el parásito se desarrolla en el interior del eritrocito a lo largo de un ciclo de 48h (Figura 4). El merozoíto internalizado pasa primero por la fase de anillo, en la cual el parásito pierde las estructuras del complejo apical que intervienen en la invasión. A continuación, comienza la introducción de hemoglobina desde el eritrocito infectado a través del citostoma en pequeñas vesículas donde se produce la digestión de las cadenas de globina como fuente de aminoácidos, que el parásito empleará para la generación de sus propias proteínas. Como residuo de esta digestión, los grupos hemo resultantes son polimerizados en forma de cristales de hemozoína o pigmento malárico para evitar la toxicidad que conllevarían para el parásito al acumularse como tales. El anillo evoluciona al estado de trofozoíto en el cual, por fusión de esas pequeñas vesículas que digieren la hemoglobina, se forma una gran vacuola digestiva donde se acumula el pigmento.

Finalmente, el parásito adquiere el nivel de maduración máximo en la fase de esquizonte, en el cual se lleva a cabo la división celular (esquizogonia) que culmina con la formación de 16-32 merozoítos. Esto conduce a la destrucción de la membrana del eritrocito y la salida explosiva de los parásitos, que invadirán los eritrocitos vecinos. El proceso de salida está estrechamente regulado, involucrando varias proteínas quinasas entre las que se encuentran la proteína dependiente de calcio PfCDPK5 y la proteína quinasa dependiente de cGMP (PfPKG).

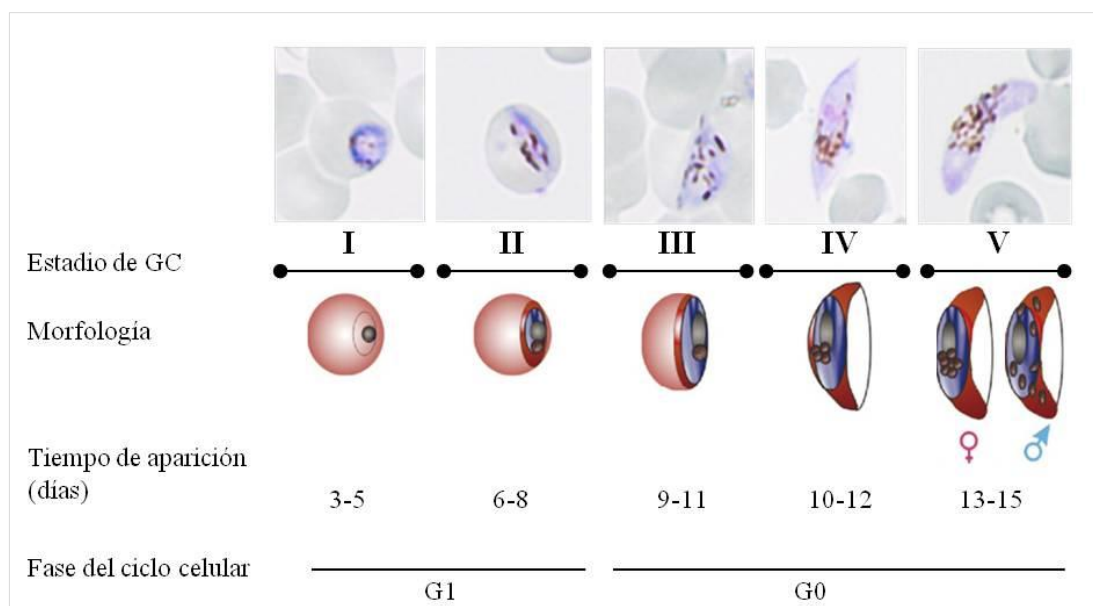


**Figura 4.** Ciclo asexual intraeritrocítico de *P. falciparum*. Estructura tridimensional del merozoito y escala temporal de los diferentes estadios asexuales que se desarrollan durante el ciclo de 48h. Adaptado de Goldberg & Cowman 2010 <sup>19</sup>.

### 1.3. Ciclo intraeritrocítico sexual

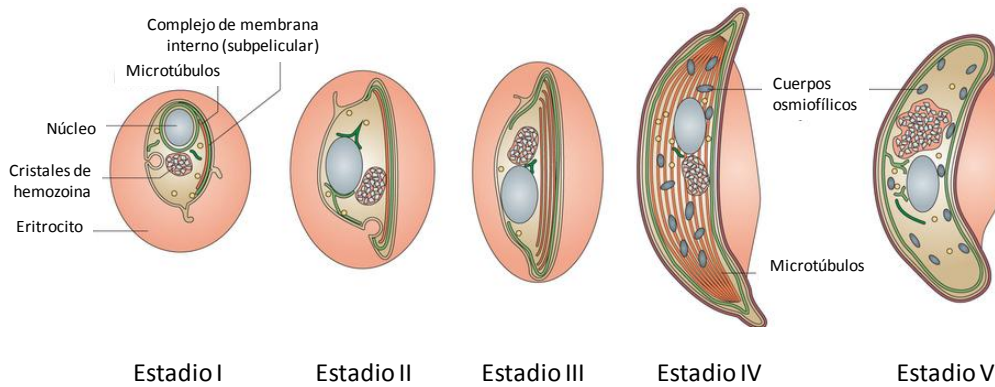
Cada 48 horas de ciclo asexual eritrocítico, entre 0.2-1% de los parásitos quedan comprometidos para dar lugar a las formas sexuales <sup>20</sup>, los gametocitos masculinos y femeninos, que son responsables de la transmisión de la enfermedad. Los gametocitos se desarrollan en el interior de los eritrocitos durante un periodo de entre 10-14 días, en el caso de *P. falciparum*, diferenciándose cinco estadios morfológicos de maduración (I, II, III, IV y V) <sup>21</sup> (Figura 5). Al igual que ocurre con los eritrocitos invadidos por las formas maduras asexuales, aquellos invadidos por gametocitos van a quedar secuestrados en el bazo y la médula ósea debido a la expresión de nuevas proteínas de superficie y a la rigidez de la membrana causada por el parásito <sup>22</sup>. La única forma circulante en el torrente sanguíneo son los gametocitos en estadio V que,

tras una nueva picadura, se transformarán en gametos (microgametos masculinos y macrogametos femeninos) en el estómago del mosquito.



**Figura 5.** Proceso de gametocitogénesis de *P. falciparum*. Los gametocitos (GC) se diferencian morfológicamente en cinco estadios de maduración, de los cuales el estadio I se confunde a menudo con los trofozoítos. A partir del estadio III se produce la parada del ciclo celular hasta que se produce el paso a gametos en el interior del mosquito. Adaptada de Dixon *et al.* 2008<sup>23</sup>.

Los gametocitos en estadio I (Figura 6) son indistinguibles de los trofozoítos asexuales, en cuanto a su morfología en microscopía de campo claro. Sin embargo, los gametocitos en estadio II son fácilmente reconocibles porque empiezan a alargarse y adquieren una forma de media luna, a la vez que la red de microtúbulos comienza a formarse. Al alcanzar el estadio III, la elongación es mayor, llegando a cubrir la mitad del eritrocito, y los extremos se redondean. La máxima elongación del gametocito se alcanza en el estadio IV, que tiene los extremos puntiagudos, y en los femeninos se pueden distinguir los cuerpos osmiofílicos así como un extenso retículo endoplásmico. Los gametocitos adquieren su forma de banana más característica en el estadio V. En este estadio, los gametocitos masculinos y femeninos son fácilmente distinguibles, encontrándose los segundos con una forma más curvada y azulados en tinción Giemsa.



**Figura 6.** Estructura celular de los diferentes estadios de gametocitos. Adaptada de Josling & Llinas 2015 <sup>24</sup>.

Los gametocitos son haploides y en ninguno de los estadios de maduración se produce replicación de su genoma. La síntesis de ácidos nucleicos está restringida a la síntesis de ARN y solo se produce en los estadios jóvenes. Por otro lado, se han encontrado ARNm en los estadios más maduros, por lo que se piensa que la maquinaria de traducción está reprimida hasta que se produce la formación de los gametos <sup>25</sup>.

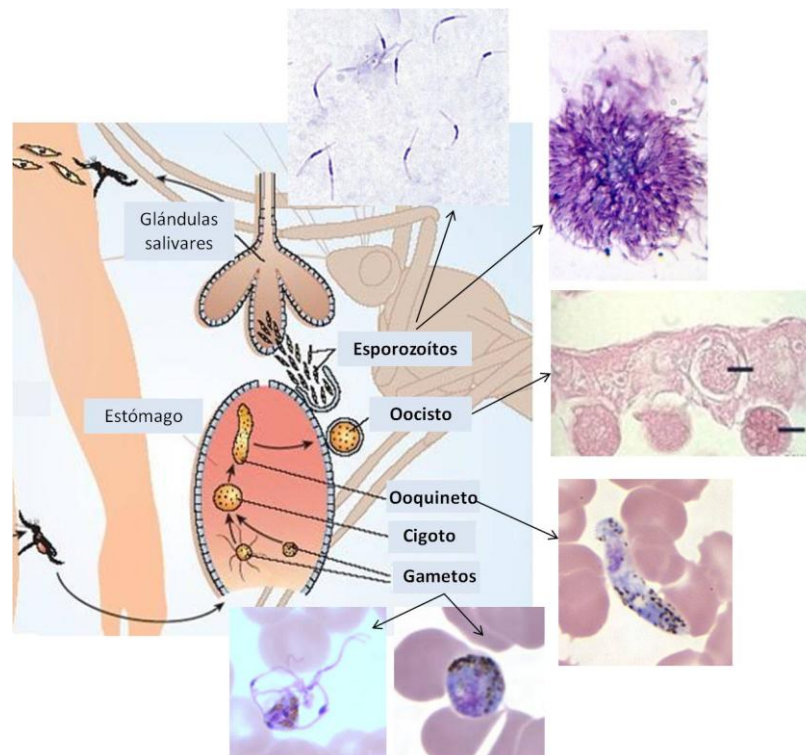
La producción de energía en *Plasmodium* proviene de glicolisis anaeróbica. Sin embargo, la expresión de los genes involucrados tanto en la glicolisis como en la síntesis de proteínas y el catabolismo de hemoglobina, está disminuida en los estadios de mayor maduración del gametocito <sup>25</sup>. Esto evidencia la reducción de actividad metabólica en estos estadios, así como la falta de actividad de antimaláricos que tienen como diana estos procesos.

#### 1.4. Ciclo sexual (esporogónico) en el mosquito

Para que el ciclo de *Plasmodium* se complete y los parásitos sean transmitidos a un nuevo hospedador, éstos tienen que pasar de nuevo por el mosquito y completar el ciclo sexual en su interior (Figura 7). Los gametocitos en estadio V que se encuentran circulando por los capilares periféricos son succionados por el mosquito hembra durante la picadura de la misma que, en caso de estar ya infectada con *Plasmodium*, depositará al mismo tiempo los esporozoítos que se encuentran en sus glándulas salivares, transmitiendo de nuevo el parásito al hospedador. Una vez

dentro del estómago del mosquito, los gametocitos masculinos y femeninos en estadio V dan lugar a los microgametos masculinos y macrogametos femeninos mediante el proceso de gametogénesis, como consecuencia de una bajada de temperatura de al menos 5°C y factores inductores propios del mosquito, como el ácido xanturénico. Durante este proceso, que dura aproximadamente 20 minutos, el gametocito masculino sufre tres rondas de replicación del ADN y genera ocho microgametos flagelados que salen del eritrocito en busca del gameto femenino. Por su parte, el gametocito femenino se redondea y se libera de la membrana del eritrocito que lo contenía, mientras comienza a expresar una serie de proteínas que son necesarias para la formación del cigoto.

Tras producirse la fertilización, el cigoto tetraploide se desarrolla dando lugar a una forma alargada y móvil, denominada ooquineto, que atraviesa la pared intestinal del mosquito y se ancla a la membrana basal. El ooquineto sufre entonces una nueva transformación dando lugar al oocisto, en cuyo interior se producen cientos de repeticiones mitóticas hasta completar el proceso de maduración (9-20 días). Una vez completado, el oocisto se rompe y libera cientos de esporozoítos que invaden las glándulas salivares del mosquito, listos para ser inoculados a un nuevo hospedador en la siguiente picadura.



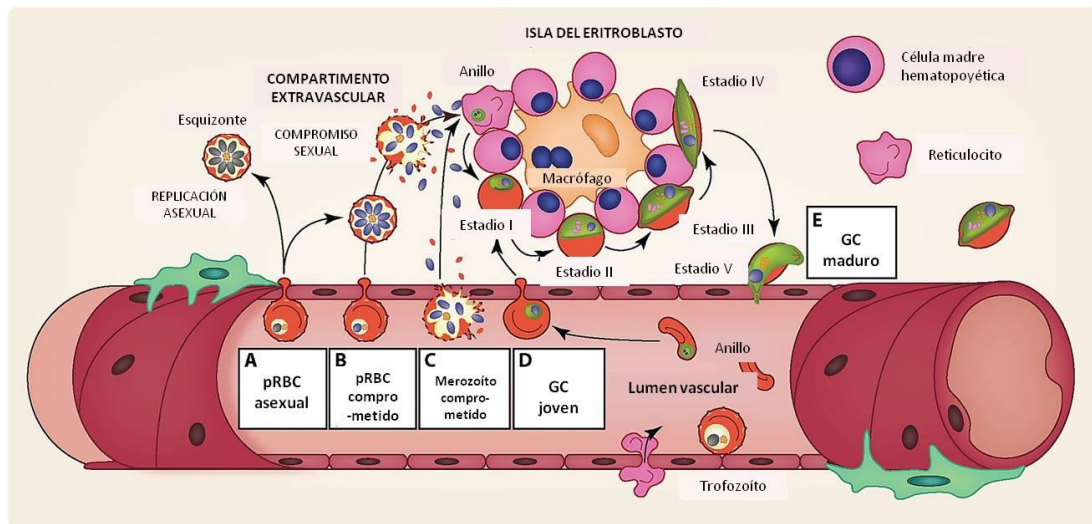
**Figura 7.** Ciclo esporogónico de *Plasmodium spp.* Adaptado de Ménard, 2005<sup>26</sup>.

## 2. La gametocitogénesis en *P. falciparum*

### 2.1. Secuestro de los estadios inmaduros de gametocitos

*P. falciparum* se diferencia de otras especies en que solo las formas asexuales jóvenes (“anillo”) y los gametocitos en estadio V circulan libremente en el torrente sanguíneo, mientras que el resto de formas eritrocíticas, tanto asexuales como los estadios I-IV de gametocitos, se encuentran secuestradas en órganos internos (Figura 8). Pasadas 20-24h tras la invasión del merozoíto, los trofozoítos maduros se adhieren a las células endoteliales de la microvasculatura a través de ligandos que el propio parásito expone en la superficie de los eritrocitos infectados. Éstos se unen a uno o más receptores de células endoteliales<sup>27,28</sup>, evitando con ello el aclaramiento del parásito a través del bazo. Uno de los principales ligandos pertenece a la familia de proteínas de membrana del eritrocito PfEMP1 (del inglés *erythrocyte membrane protein 1*), proteínas antigénicas variables codificada por la familia de genes *var*. PfEMP1 se expone en estructuras protuberantes en la superficie del eritrocito infectado, denominadas *knobs*, donde se une a una amplia variedad de receptores de células endoteliales incluyendo el receptor de trombospondina CD36, molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y condroitina sulfato A (CSA)<sup>29-31</sup>.

Durante el desarrollo de las fases sexuales, los estadios inmaduros permanecen secuestrados durante aproximadamente 10 días en los tejidos profundos, de los cuales son liberados solo cuando alcanzan el estadio V. Parece que mayoritariamente se acantonan en la médula ósea y el bazo, según han revelado estudios post-mortem<sup>32,33</sup>. Una vez liberados a la circulación periférica, los gametocitos requieren otros 2-3 días para ser totalmente infectivos<sup>34,35</sup> y pueden continuar circulando hasta 6 días más<sup>36</sup>. Recientemente se ha visto que estos estadios inmaduros muestran una baja o escasa unión a células endoteliales doble positivas para CD36/ICAM-1 y no tienen *knobs* en la membrana de los eritrocitos infectados<sup>37,38</sup>, a diferencia de las formas asexuales.



**Figura 8.** Secuestro de fases asexuales maduras y gametocitos jóvenes. GC, gametocito; pRBC, eritrocito parasitado. Imagen adaptada de Nilsson *et al.* 2015<sup>39</sup>.

En los estadios asexuales, la síntesis de nuevas estructuras celulares y el transporte de cientos de proteínas del parásito hacia el citoplasma del eritrocito permite el crecimiento del parásito y la adquisición de nutrientes. La consiguiente reorganización dinámica de la membrana plasmática del eritrocito y el citoesqueleto subyacente está asociada con una disminución de deformación de la membrana en la célula hospedadora<sup>40,41</sup>. Estos cambios, junto con la presencia del parásito intracelular, impiden la deformación del eritrocito y en consecuencia no pueden circular a través de los sinusoides del bazo<sup>42</sup>. En el caso de los gametocitos, se ha observado un incremento de rigidez (o disminución de la deformación de la membrana) en la progresión de los estadios II a IV<sup>43</sup>. Sin embargo, tanto la deformación como la visco-elasticidad de la membrana aumentan drásticamente en la transición de estadio IV a V<sup>44</sup>, lo cual permite la salida de estas formas maduras a la circulación periférica.

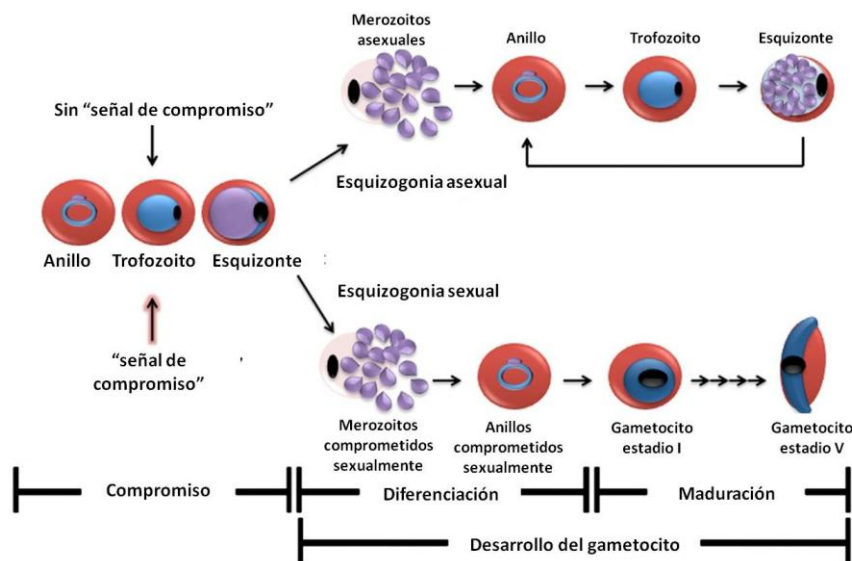
## 2.2. Regulación génica de la gametocitogénesis

Las transiciones de un estadio a otro en el ciclo de vida del parásito van acompañadas de cambios en la expresión génica, de forma que la mayoría de genes de *Plasmodium* solo se inducen durante un corto periodo de tiempo<sup>45-47</sup>, reflejando con ello marcadas diferencias tanto en la morfología celular como en la

funcionalidad. Los mecanismos que unen la expresión génica con la transición de estadios no han sido dilucidados totalmente.

Curiosamente, la mayoría de familias de factores de transcripción específicos de secuencia que se han encontrado en otros eucariotas parecen estar ausentes en *Plasmodium*. En su lugar, se ha observado a lo largo del filo Apicomplexa la expansión de una familia de proteínas que contiene uno o más dominios apetala2 (AP2) de unión a ADN<sup>48</sup>. El dominio AP2 fue identificado originariamente en plantas y las proteínas que contienen dominios AP2 (ApiAP2= Apicomplexa AP2) están presentes en todos los Apicomplexa estudiados hasta la fecha<sup>49</sup>. Los dominios AP2 de *P. falciparum* expresados por recombinación se unen específicamente a una amplia variedad de secuencias de ADN. Los motivos putativos de unión se identificaron *upstream* en la mayoría de genes, haciendo de ApiAP2s los principales candidatos para la generación de patrones de expresión génica específicos de estadio<sup>50</sup>.

El compromiso sexual de los parásitos ocurre en la generación asexual que precede a la gametocitogénesis (Figura 9), donde cada esquizonte produce una progenie de merozoítos que uniformemente se desarrollarán ya sea como gametocitos del mismo sexo o continuando el ciclo asexual<sup>51</sup>.



**Figura 9.** Proceso de diferenciación de las formas asexuales eritrocíticas en gametocitos. Imagen adaptada de Ikadai *et al.* 2013<sup>52</sup>.

Actualmente, aún se debate si en las infecciones naturales hay una parte constante de parásitos que se diferencia en formas sexuales durante el ciclo asexual eritrocítico o si este compromiso es un evento desencadenado por cambios ambientales <sup>53</sup>. En general, los parásitos expuestos a diferentes situaciones de estrés medioambiental, tales como la elevada parasitemia en el hospedador o los tratamientos farmacológicos, están asociados con un incremento del ratio de compromiso *in vitro* <sup>24</sup>. Esto tiene un sentido evolutivo para el parásito ya que, si el hospedador está muriendo debido a una elevada parasitemia, entonces el parásito requiere de su transmisión al mosquito para sobrevivir. Sin embargo, en las infecciones naturales, estos factores no desencadenan necesariamente la formación de gametocitos. La baja frecuencia de conversión tanto *in vitro* como *in vivo* sugiere que, aunque los factores ambientales parezcan tener influencia sobre la probabilidad de conversión de una célula en particular, la decisión de comprometerse es esencialmente estocástica.

Aunque hay evidencia de que la diferenciación a gametocitos se puede desencadenar mediante factores secretados o liberados por el parásito <sup>54</sup>, éstos aún no han sido definidos. En dos estudios recientes <sup>55</sup> se ha visto que existe un tipo de comunicación intercelular entre los eritrocitos infectados que implica la transferencia e internalización de vesículas tipo exosoma. Los autores demostraron que la internalización de estas vesículas en cultivos *in vitro* conducía a la diferenciación de los parásitos de la célula receptora en gametocitos. Por tanto, la acumulación de estas vesículas en el suero de pacientes infectados podría ser la señal que desencadenase y regulase la formación de estadios sexuales. Sin embargo el hecho de cómo las vesículas median este proceso en las bajas parasitemias *in vivo* está aún por determinar.

No existen marcadores para diferenciar el estadio anillo de gametocitos respecto al de formas asexuales, lo cual impide discernir si permanecen en la circulación o ya están secuestrados. A las 24-30h post-invasión, cuando el parásito entraría en fase de trofozoíto, el gametocito joven comienza a expresar los genes que codifican para las proteínas Pfs16 y Pfg27 <sup>56,57</sup>, las cuales se localizan en la membrana de la vacuola parasitófora y el citoplasma, respectivamente. Desde el estadio III, los gametocitos masculinos y femeninos expresan los genes que codifican las proteínas Pfs230,

Pfs48/45 y Pfs47, que se localizan en la membrana de los gametos e interactúan físicamente durante la fertilización y formación del cigoto <sup>58</sup>.

### 3. La gametogénesis en *P. falciparum*

La transformación de los gametocitos en estadio V a gametos requiere de un proceso de activación que se lleva a cabo en el interior del estómago medio del mosquito. Cuando éste pica a una persona infectada de malaria, los gametocitos en estadio V que circulan por sus capilares son succionados junto con la sangre que sirve de alimento a la hembra, permitiendo la ovoposición. El drástico cambio de temperatura que sufren estos gametocitos al pasar de los 37°C en el hospedador a los 26-28°C en el vector, es el principal factor de inducción del proceso de gametogénesis. El segundo factor es un ligero incremento del pH desde 7,5 a 8-8,5. El tercer y último factor descrito es la presencia de ácido xanturénico, un compuesto que se encuentra en el interior del mosquito y maximiza la eficiencia de conversión de gametocito a gameto <sup>59</sup>. El ácido xanturénico es un producto metabólico del catabolismo del triptófano que activa la guanilil ciclasa, produciendo un incremento en los niveles de GMPc, y activa la fosfolipasa C (PLC) que conduce a la salida de calcio del retículo endoplásmico y la consiguiente activación de rutas de señalización dependientes de calcio <sup>60</sup>.

El gametocito masculino, al activarse en el interior del mosquito, sufre un proceso rápido y complejo que se completa en unos 20 minutos. Este proceso conlleva en primer lugar la salida del gametocito del eritrocito y un incremento en su volumen celular, resultando una forma redondeada. Tras activarse la proteína kinasa dependiente de calcio CDPK4, se producen tres rondas de replicación de su ADN, así como el ensamblaje de axonemas <sup>61</sup>. El proceso de activación concluye con la salida de ocho microgametos masculinos flagelados que se moverán rápidamente para encontrar al gameto femenino y fertilizarlo. El contacto entre el gameto masculino y femenino se lleva a cabo a través de adhesión celular mediada por las proteínas Pfs48/45, Pfs230 y Pfs47.

Por su parte, el gametocito femenino pasa por un proceso de activación más sencillo, también mediado por el incremento en los niveles del calcio intracelular, que implica un incremento del volumen celular y la salida del eritrocito. Esta salida está mediada por la secreción de diversas proteínas<sup>60</sup>, así como por la acción lítica de los cuerpos osmiofílicos<sup>62</sup>. En el gameto femenino no se produce replicación del ADN, si no la traducción de proteínas cuyo ARNm fue previamente almacenado durante la fase de gametocito. Estos ARNm, cuya represión traduccional está controlada por la ARN helicasa DOZI (del inglés *development of zygote inhibited*) de clase DDX-6, codifican las proteínas de superficie Pfs25 y Pfs28<sup>25</sup> que intervienen en la formación del oocisto<sup>58</sup>.

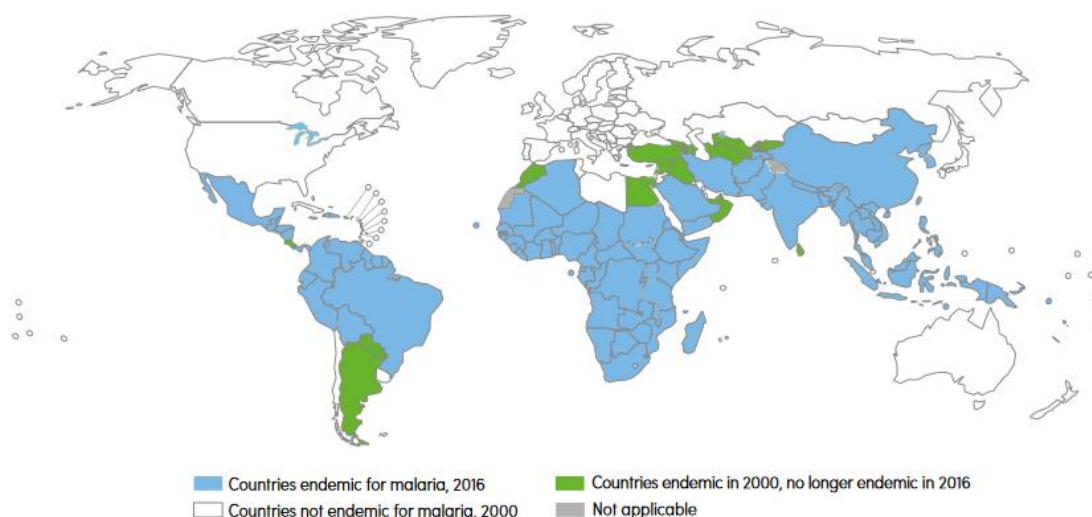
#### **4. Distribución geográfica de la enfermedad y su vector**

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por protozoos parásitos del género *Plasmodium*, que se transmite a través de la picadura de la hembra de mosquitos del género *Anopheles*. Esta enfermedad parasitaria causa más de 212 millones de casos al año y cerca de 429.000 muertes<sup>63</sup>, afectando en mayor medida a los niños menores de cinco años y mujeres embarazadas del África subsahariana. De las cinco especies que infectan a humanos, *P. falciparum* es la más virulenta<sup>64</sup> por ser responsable del 90% de las muertes relacionadas con malaria en África subsahariana, donde se reportan el 80% de los casos de todo el mundo.

Desde el año 2000, los avances en la lucha contra la malaria y el aumento de las medidas de control y prevención han conseguido una reducción de la incidencia (41%) de la enfermedad y la disminución de la tasa de mortalidad (29% a nivel global, 69% en niños menores de 5 años)<sup>63</sup>. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) contempla que los esfuerzos en la lucha contra la malaria no solo deben centrarse en la disminución de la morbilidad y mortalidad si no en nuevas estrategias para frenar la transmisión de la enfermedad, ya que esta medida tendría un efecto muy significativo en la reducción de la enfermedad. Para ello, en 2007 se creó la iniciativa malERA (del inglés *Malaria Eradication Research Agenda*), que propone la erradicación de la malaria como objetivo a largo plazo mediante una

interrupción de la transmisión de *Plasmodium* desde los individuos infectados al mosquito <sup>65</sup>.

La distribución de la malaria viene condicionada por dos factores: la supervivencia de los mosquitos y la capacidad de reproducción del parásito en su interior para completar el ciclo. Para que ambos factores se den, es limitante la temperatura ambiental ya que *Plasmodium* solo puede completar su ciclo vital en el interior del mosquito con temperaturas superiores a 20°C, por lo que las zonas afectadas por malaria son principalmente áreas tropicales y subtropicales (Figura 10).



**Figura 10.** Evolución de la endemicidad de malaria entre los años 2000 y 2016. Se considera que la malaria ha sido eliminada cuando, tras tres años consecutivos, no se ha registrado ningún caso. Fuente: base de datos de la OMS, *World Malaria Report 2016* <sup>63</sup>.

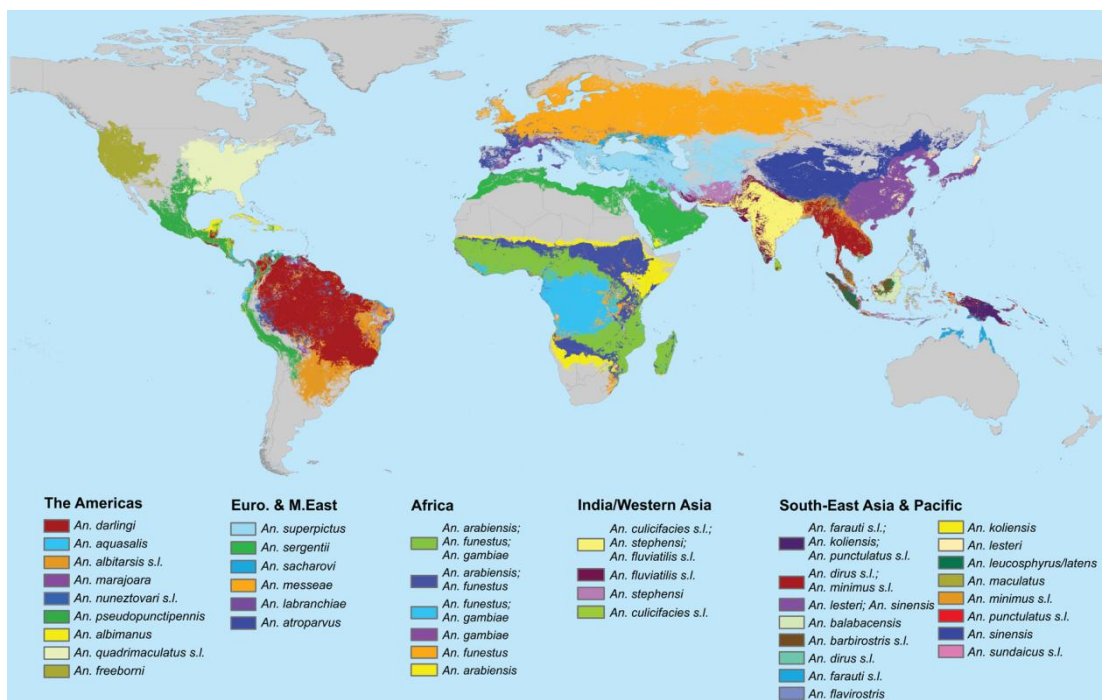
La malaria es transmitida entre humanos por la hembra de mosquitos del género *Anopheles* (Figura 11). Las hembras de estos mosquitos necesitan alimentarse de sangre para llevar a cabo la producción de huevos, y este tipo de alimentación es lo que une a los humanos y los mosquitos en el ciclo de vida del parásito. El desarrollo exitoso de los parásitos de malaria en el mosquito, desde el estadio de gametocito al de esporozoíto, depende de varios factores. Los más importantes son la temperatura ambiental y la humedad, ya que las temperaturas elevadas aceleran el crecimiento del parásito en el mosquito. Si el mosquito *Anopheles* sobrevive lo suficiente para permitir que el parásito complete su ciclo de vida en él, el ciclo esporogónico o

extrínseco dura entre 10 y 18 días. A diferencia del hospedador humano, el mosquito no muestra sufrimiento por la presencia del parásito.



**Figura 11.** Hembra del mosquito *Anopheles stephensi*.

Los mosquitos del género *Anopheles* se encuentran distribuidos por todo el mundo excepto en la Antártida (Figura 12). De las 430 especies que existen, entre 30 y 40 de éstas son vectores de malaria para los humanos, y la transmisión de la enfermedad por una especie u otra viene condicionada por la región y el ambiente. Además, estos mosquitos no solo se encuentran en áreas endémicas de malaria sino también en áreas donde ha sido eliminada, por lo que estas últimas están en riesgo constante de reintroducción de la enfermedad.



**Figura 12.** Distribución global de los vectores de malaria dominantes o potencialmente importantes. Fuente: Sinka *et al.* 2012 <sup>66</sup>.

## 5. Sintomatología clínica de la malaria

Los primeros síntomas de la malaria son inespecíficos y similares a los de una enfermedad vírica sistémica leve. Comprenden cefalea, decaimiento, fatiga, molestias abdominales y dolores musculares y articulares, generalmente seguidos de fiebre, escalofríos, sudoración, anorexia, vómitos y creciente malestar general. La malaria, por consiguiente, se suele diagnosticar sobre la base exclusiva de los síntomas, especialmente en las zonas endémicas, debido a esta falta de especificidad de la sintomatología. Los pacientes se pueden recuperar total y rápidamente si en esta fase inicial, sin indicios de disfunción de órganos vitales, se les administra sin demora un tratamiento eficaz. Sin embargo, si se administran medicamentos ineficaces o se retrasa el tratamiento, en particular en el caso de malaria por *P. falciparum*, seguirá aumentando la carga de parásitos y podrá presentarse una malaria grave. Esta progresión puede ocurrir en pocas horas.

La malaria severa se manifiesta generalmente con uno o más de los siguientes signos: coma (malaria cerebral), acidosis metabólica, anemia grave, hipoglucemia, insuficiencia renal aguda o edema pulmonar agudo. En esta fase de la enfermedad, la tasa de letalidad entre quienes reciben tratamiento suele ser del 10 al 20%. Sin embargo, sin tratamiento, la malaria grave es mortal en la mayoría de los casos.

La naturaleza de los síntomas clínicos de la malaria depende enormemente del grado de inmunidad protectora adquirida, que es resultado del patrón e intensidad de la transmisión de la malaria en la zona de residencia. Donde la transmisión de la malaria es “estable”, es decir donde las poblaciones están continuamente expuestas a una tasa elevada y bastante constante de inoculaciones maláricas (>10 por año), a principios de la niñez se adquiere inmunidad parcial contra la enfermedad clínica y su manifestación grave. En tales situaciones, prevalecientes en gran parte del África subsahariana y en partes de Oceanía, la enfermedad clínica aguda descrita más arriba se limita principalmente a niños pequeños, que presentan gran densidad de parásitos y enfermedad clínica aguda. Si no se trata, puede progresar muy rápidamente hacia una malaria grave; los adolescentes y adultos son parcialmente inmunes y rara vez padecen la enfermedad clínica, aunque pueden seguir alojando densidades bajas de parásitos en sangre. Sin embargo, la inmunidad se modifica durante el embarazo.

En las áreas de malaria inestable, prevaleciente en gran parte de Asia y América Latina, y en otras partes del mundo donde la malaria es endémica, las tasas de inoculación fluctúan enormemente con las estaciones y entre los distintos años. Las tasas de inoculación entomológica son generalmente <5 por año y a menudo <1 por año. Esto retrasa la adquisición de inmunidad y, como resultado, personas de todas las edades, adultos y niños por igual, enferman de malaria clínica aguda, con un alto riesgo de progresión a una malaria grave si no se recibe tratamiento. Puede haber epidemias en áreas de malaria inestable si la tasa de inoculación aumenta rápidamente debido a un aumento súbito de la densidad de mosquitos vectores. Las epidemias se manifiestan como una incidencia muy elevada de malaria en todos los grupos de edad y pueden superar la capacidad de respuesta de los servicios de salud.

## 6. Tratamiento y prevención de la malaria

### 6.1. Vacunas frente a la malaria

Uno de los frentes abiertos en la lucha contra la malaria consiste en el desarrollo e implementación de vacunas en los países endémicos que, una vez administradas, permitan tanto a la población como a los viajeros generar anticuerpos frente a diferentes formas del parásito. Actualmente se encuentran en desarrollo clínico dos vacunas frente a estadios pre-eritrocíticos, que tendrían la capacidad de prevenir la infección y la sintomatología clínica. Estas vacunas tienen como diana los esporozoítos o las células hepáticas, estimulando la formación de anticuerpos frente a proteínas de superficie del esporozoíto y/o inmunidad celular para interferir con la maduración de los estadios hepáticos. La vacuna RTS,S, desarrollada por GlaxoSmithKline (GSK) y PATH (del inglés *Programme for Appropriate Technology in Health*), es la primera vacuna que ha mostrado un efecto protector frente a la malaria en niños y que ha llegado a fase clínica III, recibiendo una opinión positiva de la agencia europea del medicamento en julio de 2015 para ser empleada fuera de la Unión Europea. Se trata una vacuna híbrida consistente en la fusión de la proteína circumesporozoíto (CSP, del inglés *circumsporozoite protein*) con el antígeno de superficie de la hepatitis B. Su eficacia frente a la malaria clínica se encuentra en torno al 36% y ha mostrado tener un efecto protector en niños durante 3

años tras la primera vacunación, aunque el seguimiento a largo plazo ha revelado una pérdida de esta eficacia <sup>67</sup>.

Por otro lado, la vacuna PfSPZ, desarrollada por Sanaria y actualmente en fase clínica I, ha mostrado tener una eficacia del 64% tras una primera vacunación y el mantenimiento de esta eficacia en más del 80% hasta 8 meses después <sup>68</sup>. Está formada por esporozoítos purificados y atenuados mediante radiación, que parecen producir una activación de las células T y con ello la inmunidad del individuo frente al parásito. La protección alcanzada en los ensayos iniciales requirió de 5 vacunaciones intravenosas, una ruta de administración con ciertos obstáculos según los requerimientos de la OMS. Esta vacuna está siendo ensayada actualmente en poblaciones endémicas.

La reducción de la transmisión de la malaria también puede conseguirse mediante la inmunización de potenciales portadores del parásito e induciendo anticuerpos que tienen como diana las formas sexuales del mismo. Cuando el mosquito pica a los portadores vacunados, la presencia de anticuerpos en la sangre producirá un bloqueo del desarrollo sexual del parásito en el interior del mosquito, previniendo con ello una nueva infección. Aunque la vacuna de bloqueo de la transmisión (TBV, del inglés *transmission blocking vaccine*) no produce una reducción inmediata de la probabilidad de infección de malaria en los pacientes vacunados, éstos pueden estar protegidos a través de la inmunidad colectiva. Numerosos estudios preclínicos han dado lugar al desarrollo de una serie de antígenos de *P. falciparum* como candidatos para la TBV, entre los que se encuentran Pfs230 <sup>69</sup>, Pfs25 <sup>70</sup> y Pfs48/45 <sup>71</sup>. Diversas plataformas han utilizado estos antígenos para generar anticuerpos que demostrasen tener actividad de bloqueo de la transmisión. Hasta la fecha, solo Pfs25 y su ortólogo en *P. vivax*, Pvs25, se han ensayado en fase clínica I.

## 6.2. Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos para la malaria pueden clasificarse en función del tipo de actividad que desempeñan y en función de su estructura química. A continuación se describe en detalle cada una de estas clasificaciones, así como los fármacos incluidos en cada categoría (Figura 13) y la parte del ciclo de vida del

parásito sobre la que actúan (Figura 14). Seguidamente, se incluye una descripción más detallada de los fármacos de mayor relevancia para el tratamiento antimalárico.

- **Clasificación según el tipo de actividad:**

- a) Esquizonticidas tisulares para quimioprofilaxis: actúan en las formas tisulares hepáticas primarias.
- b) Esquizonticidas tisulares para prevenir recidivas: actúan en los hipnozoítos de *P.vivax* y *P.ovale* en el hígado, que dan lugar a la recidiva de los síntomas.
- c) Esquizonticidas a nivel eritrocítico: actúan en las formas sanguíneas del parásito y por tanto frenan la sintomatología clínica de la malaria.
- d) Gametocitocidas: eliminan las formas sexuales del parásito y de esta forma previenen la transmisión del parásito al mosquito.
- e) Esporontocidas: previenen el desarrollo de oocistos en el mosquito y por tanto también frenan la transmisión del parásito.

- **Clasificación de acuerdo a la estructura química:**

- a) Arilaminoalcoholes: quinina, quinidina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina.
- b) 4-aminoquinolinas (4-AQs): cloroquina, amodiaquina, piperaquina, pironaridina.
- c) Inhibidores de la síntesis de folato: inhibidores de la dihidropteroato sintasa (sulfonas y sulfonamidas) e inhibidores de la dihidrofolato reductasa (biguanidas y diaminopirimidinas).
- d) 8-aminoquinolinas (8-AQs): primaquina, tafenoquina
- e) Antimicrobianos: tetraciclina, doxiciclina, clindamicina, azitromicina, fluoroquinolonas, tioestreptón
- f) Peróxidos (sesquiterpeno lactonas): artemisinina, dihidroartemisinina, artemeter, arteeter, artesunato, artemisona.
- g) Naptoquinonas: atovaquona.
- h) Fenotiazina: azul de metileno

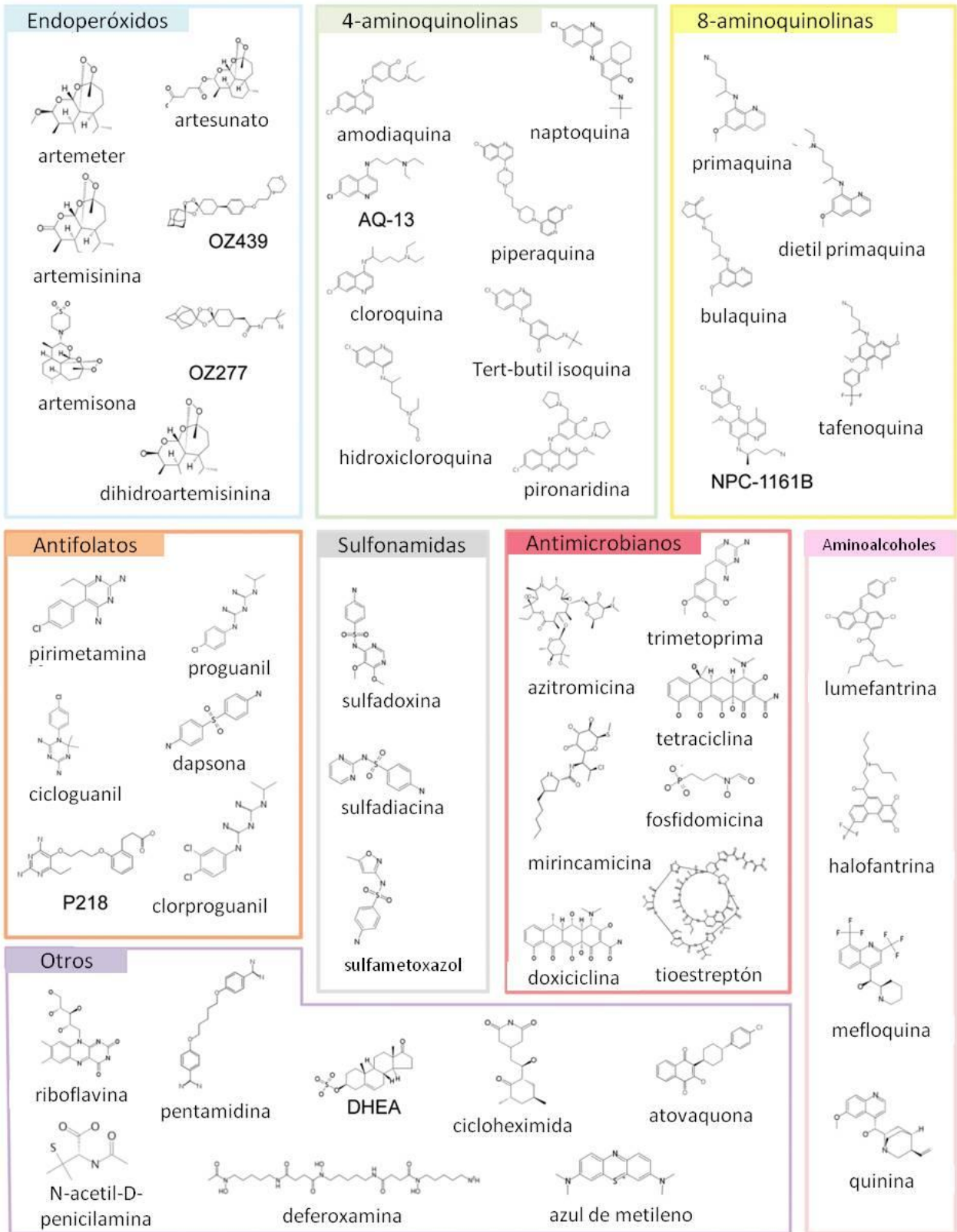
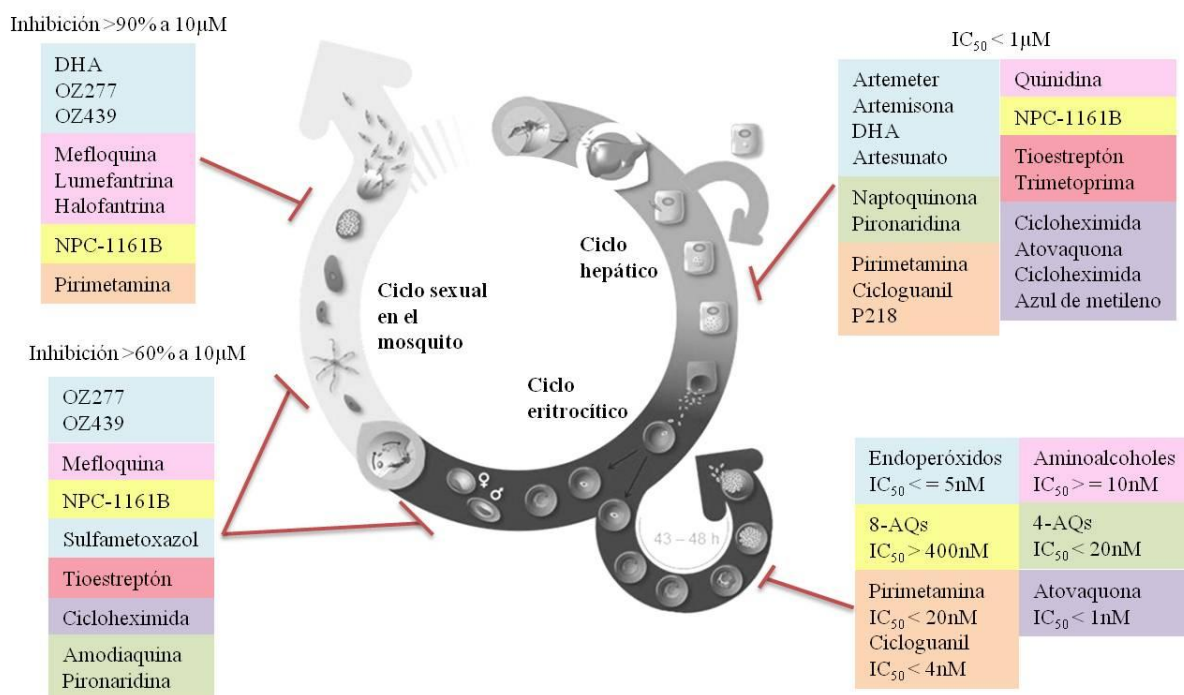


Figura 13. Principales clases de antimaláricos. Modificada de Delves *et al.* 2012<sup>72</sup>.



**Figura 14.** Actividad de diferentes clases de antimaláricos sobre las distintas fases del ciclo de vida de *P. falciparum*. El registro de colores se corresponde con el utilizado en la figura 13 para las diferentes clases de antimaláricos. Modificado de Delves *et al.* 2012 <sup>72</sup>.

### 6.3. Tratamientos recomendados por la OMS para la malaria por *P. falciparum* <sup>74</sup>

- **Tratamiento de la malaria sin complicaciones**

La malaria sin complicaciones se define como una malaria sintomática sin signos de gravedad ni evidencia de disfunción de órganos vitales. El tratamiento de primera línea recomendado por la OMS consiste en un tratamiento combinado con artemisininas (TCAs). Las artemisininas permiten una eliminación rápida de la parasitemia (reducen de 100 a 1.000 veces el número de parásitos en cada ciclo asexual) y una pronta resolución de la sintomatología.

Como la artemisinina y sus derivados se eliminan rápidamente (~ 45min), se requiere un tratamiento de 7 días cuando se administra con compuestos de vida media corta (tetraciclinas o clindamicina) o de 3 días si se administra con compuestos de vida media larga, como por ejemplo las siguientes combinaciones:

- Artemeter + lumefantrina
- Artesunato + amodiaquina o mefloquina o sulfadoxina-pirimetamina
- Dihidroartemisinina + piperaquina

La elección del TCA dependerá del nivel de resistencia asociado al medicamento de la combinación. La artemisinina y sus derivados no deben usarse nunca como monoterapia ya que puede conducir a la aparición de resistencias y, con ello, al fallo terapéutico. Por otro lado, su administración está contraindicada en mujeres gestantes durante el primer trimestre, para las cuales está recomendado el tratamiento de quinina con clindamicina durante 7 días.

Las TCAs también se pueden administrar en combinación con una dosis de primaquina (0,75mg/kg) para eliminar las formas sexuales del parásito, excepto en mujeres gestantes y niños menores de 6 años.

Los tratamientos antimaláricos de segunda línea para la malaria por *P. falciparum* sin complicaciones son:

- Tratamiento alternativo utilizando el TCA más eficaz en esa región
- Artesunato + tetraciclina/clindamicina, administrado durante 7 días
- Quinina + tetraciclina/clindamicina, administrado durante 7 días

- **Tratamiento de la malaria grave**

Se define como malaria grave cuando el paciente presenta una o más características clínicas que incluyen pérdida de conciencia, debilidad extrema, convulsiones, dificultad respiratoria, colapso circulatorio, anemia grave o acidosis metabólica, entre otros. El objetivo principal es evitar la muerte del paciente, por lo que se realiza la administración intravenosa o intramuscular de artesunato durante al menos 24h, lo cual produce una reducción rápida de la parasitemia. El tratamiento se completa con 3 días de TCA, al cual se puede añadir una dosis de primaquina.

## 7. Descubrimiento de nuevos antimaláricos mediante cribado de alto rendimiento

En la última década se ha producido una sustancial intensificación del control y la prevención de la malaria, contando con la implementación de nuevas estrategias de control del vector así como de quimioterapia. Sin embargo, esta enfermedad todavía se considera un reto de salud pública a nivel mundial y su eliminación se discute ahora como un objetivo realista pero necesita del desarrollo de nuevas herramientas, particularmente en áreas de elevada transmisión<sup>73,74</sup>. Es poco probable que la eliminación de la malaria se pueda lograr a menos que se descubran, desarrollen e implementen los fármacos y/o vacunas que interrumpan la transmisión del parásito<sup>65</sup>.

Tradicionalmente, los tratamientos farmacológicos antimaláricos han tenido como diana la reproducción de las formas asexuales del parásito en el interior de los eritrocitos, ya que son responsables de la sintomatología clínica de la malaria. Mientras que la mayoría de esquizonticidas, tales como la cloroquina, afectan a los estadios jóvenes de gametocitos (I, II y III), los gametocitos en estadio maduro no son sensibles a ellos<sup>34,72</sup>. Estos gametocitos “insensibles” en estadio V son responsables de la transmisión del parásito de la malaria al mosquito y permanecen quiescentes pero infecciosos en sangre periférica durante aproximadamente 22 días<sup>75</sup>. Por lo tanto, constituyen una diana más que apropiada para bloquear el ciclo de vida del parásito a través de la administración de fármacos tanto a pacientes infectados como a portadores asintomáticos.

Existen diversas estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos. A pesar del esfuerzo realizado para mejorar las moléculas activas ya existentes (por ejemplo modificando una estructura para la cual el parásito ha adquirido resistencia), la mayoría de las nuevas clases de antimaláricos provienen de cribados de alto rendimiento. Mediante esta aproximación, se realiza el cribado de una extensa biblioteca de compuestos para identificar compuestos que sean activos frente al parásito mediante lo que se conoce como ensayo fenotípico o de célula entera. Alternativamente, la biblioteca puede ser cribada por su actividad frente a una diana específica, que suele ser una proteína que es crucial para la supervivencia del parásito. Tras el cribado, un análisis químico-informático permite la identificación de

las estructuras más prometedoras, cuya posterior selección se basa en la potencia, coste, facilidad de síntesis, toxicidad y novedad. Una vez seleccionadas las estructuras, se suelen sintetizar derivados adicionales (análogos), que se evalúan de nuevo frente a célula entera o a la proteína en cuestión. Estos ensayos permiten revelar la relación entre estructura y actividad, lo cual predice el efecto de las modificaciones químicas sobre las propiedades de la molécula, como la biodisponibilidad o la concentración en plasma.

El cribado celular es la aproximación más tradicional para la identificación de compuestos con actividad antimicrobiana. Consiste en exponer al microorganismo (en este caso un cultivo de parásitos) al compuesto a ensayar (un compuesto químico o extracto de productos naturales) y tras un periodo de incubación determinado, se examina el cultivo para determinar si el compuesto ha sido capaz de matar al microorganismo. A pesar de lo sencillo que puede parecer, el reto consiste en que los ensayos sean altamente reproducibles y tengan un coste adecuado que permita evaluar miles de compuestos en un ínfimo volumen de ensayo. Los avances tecnológicos en dispensación de líquidos, análisis de imagen, ensamblaje de bibliotecas de compuestos químicos y la automatización a gran escala han permitido el cribado de millones de compuestos en placas de 384 o 1536 pocillos de una forma inimaginable 20 años atrás. En los últimos 10 años, los cribados celulares de alto rendimiento han identificado cientos de nuevos compuestos que tienen el potencial para tratar la malaria.

### 7.1. Cribados en ensayos con estadios eritrocíticos asexuales

Los primeros cribados celulares a gran escala comenzaron en 2007 y fueron llevados a cabo por entidades con capacidad para cribado de alto rendimiento: Novartis-GNF (*Genomics Institute of the Novartis Research Foundation*) (1,7 millones de compuestos)<sup>76</sup>, SJCRH (*St. Jude Children's Research Hospital*) (309.474 compuestos)<sup>77</sup> y GSK (2 millones de compuestos)<sup>78</sup>. Estos cribados identificaron compuestos que inhiben la proliferación de los estadios eritrocíticos asexuales de *P. falciparum*. Dado que los parásitos crecen en los eritrocitos humanos (carentes de núcleo), el incremento del contenido de ácidos nucleicos durante un periodo de 72h

se empleó como método de lectura del crecimiento del parásito. Se utilizaron dos aproximaciones: marcadores fluorescentes de unión a ADN y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH). Con ellas se cribaron hasta 4 millones de compuestos y entre 0,4-1% de los mismos mostraron actividad antimalárica

Dado que muchos investigadores interesados en este descubrimiento pueden no tener acceso al equipamiento tan sofisticado que requiere este tipo de cribado, los resultados de las moléculas activas se hicieron públicos en las bases de datos de ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chemblntd>). De la biblioteca de 2 millones de compuestos ensayada por GSK se obtuvieron más de 13.500 moléculas activas frente a *P. falciparum*, que se designaron como *Tres Cantos Antimalarial Set* (TCAMS)<sup>78</sup>. Por otro lado, la organización *Medicines for Malaria Venture* (MMV) hizo una selección de 400 compuestos activos entre los publicados de los diferentes cribados, llevó a cabo una resíntesis de los mismos y fueron designados como *Malaria box*<sup>79</sup>. Esta pequeña colección fue puesta a disposición de los científicos de todo el mundo que quisieran contribuir a un mayor estudio de las moléculas con diversos ensayos biológicos. Como resultado de este ejercicio, denominado *The Malaria Box Project*, unos 200 grupos de investigación de todo el mundo, llevaron a cabo más de 290 cribados no solo frente a *Plasmodium* si no también frente a otros protozoos, helmintos, bacterias y células cancerosas<sup>80</sup>.

## 7.2. Cribados frente a los estadios implicados en la transmisión

Dado que los gametocitos, que son infecciosos para el mosquito, persisten en los pacientes tiempo después de que la sintomatología haya remitido, un buen candidato clínico también debe matar a los gametocitos para conseguir interrumpir la transmisión. Si los gametocitos permanecen viables y hay mosquitos en el ambiente, entonces la persona portadora puede infectar a su familia y a su comunidad así como reinfectarse a sí misma. Diversos grupos han desarrollado cribados de alto rendimiento con el fin de identificar moléculas activas frente a los gametocitos y, utilizando como punto de partida los 25.000 compuestos encontrados en las campañas de cribado anteriormente descritas, identificar compuestos con actividad

dual (frente a formas asexuales y sexuales) que permitiesen no solo tratar la sintomatología si no también bloquear la transmisión del parásito.

Aunque el cribado fenotípico ha sido ampliamente empleado en la identificación de compuestos activos frente a las formas asexuales eritrocíticas de *P. falciparum*<sup>76-78,81</sup>, el escalado de los ensayos con gametocitos es más laborioso debido a la tediosa y costosa producción de estos estadios. Además, los ensayos de alto rendimiento con formas asexuales se han basado en la replicación del parásito, pero esta aproximación no puede trasladarse a los ensayos con estadios sexuales ya que éstos no se dividen durante su proceso de maduración. Inicialmente, la evaluación de la actividad gametocitocida era demasiado laboriosa y subjetiva al residir en la observación microscópica de la morfología de los parásitos para determinar su viabilidad<sup>82</sup>. Dado que los gametocitos no se dividen durante los 12 días que les lleva el proceso de maduración desde el estadio temprano al más tardío o estadio V, que es el único transmisible, no es posible emplear los métodos de proliferación celular utilizados para el cribado de las formas asexuales. Por tanto, ha sido necesario desarrollar técnicas alternativas que permitiesen detectar la muerte de los gametocitos a gran escala.

Algunos de estos ensayos emplean la hidrólisis del ATP como medida de viabilidad del parásito<sup>83</sup>, considerando la pérdida de los niveles de ATP como un indicador de la muerte del gametocito. Por otro lado, también ha sido posible un contaje selectivo de parásitos que expresasen un marcador GFP específico de estadios de gametocitos unidos a genes reporteros de luciferasa<sup>84</sup> y marcadores de daño mitocondrial<sup>85</sup>. El primer cribado con gametocitos se llevó a cabo utilizando *Alamar blue*<sup>86</sup>, un indicador de oxido-reducción que cambia de color en respuesta a la reducción química del medio de cultivo, que ocurre cuando los gametocitos son metabólicamente activos. Otros cribados han implementado la actividad de la enzima pLDH<sup>87</sup>, también empleada en cribado con formas asexuales. Además, muchos de estos ensayos han sido adaptados a formato de alto rendimiento y se han utilizado para hacer cribados de grandes colecciones de compuestos<sup>85,88,89</sup>.

Sin embargo, dado que estos ensayos solo pueden predecir la capacidad de un compuesto para bloquear la transmisión mediante la muerte del gametocito, se han

incrementado los esfuerzos en encontrar ensayos más predictivos que sean capaces de medir la viabilidad de estadios posteriores, como el ooquineto <sup>90</sup>. Actualmente, solo es posible llevar a cabo este tipo de ensayos solo es posible llevarlos a cabo utilizando el parásito murino *P. berghei* ya que, a pesar de los numerosos intentos, no ha sido posible conseguir cultivar ooquinetos de *P. falciparum in vitro* de forma reproducible ni en la cantidad necesaria para realizar ensayos de alto rendimiento. En consecuencia, una generación alternativa de nuevos ensayos de gametocitos ha utilizado la formación de los gametos, como un parámetro más informativo para determinar tanto la funcionalidad, como la viabilidad de los gametocitos en estadio V <sup>91-95</sup>. Así, estos nuevos ensayos consiguen incrementar el contenido biológico de los anteriormente desarrollados, y ser más inclusivos en la detección de nuevas dianas moleculares. La idea fue descrita inicialmente por Delves y colaboradores <sup>91</sup>, quienes pusieron a punto la metodología necesaria para evaluar la formación de los microgametos masculinos y los macrogametos femeninos mediante microscopía. Posteriormente, consiguieron optimizar y unir ambos ensayos en un formato de placa de 96 pocillos, que permitió determinar la actividad de un compuesto sobre la formación de ambos gametos usando la misma muestra biológica <sup>92</sup>.

El presente trabajo de Tesis describe la optimización del ensayo de activación del gametocito femenino (*PfFGAA*), que ha sido el primero de los ensayos que evalúan la formación de gametos, en ser escalado y validado en formato de alto rendimiento (384 pocillos) <sup>95</sup>, así como en ser empleado para el cribado de una extensa colección de compuestos <sup>96</sup>. Hasta la fecha, los ensayos *in vitro* que miden la formación de los gametos femenino y masculino son los que cubren mayor contenido biológico y, por tanto, constituyen un buen sustituto del ensayo de referencia *Standard Membrane Feeding Assay* (SMFA) para evaluar la actividad de fármacos en los estadios del mosquito. En el ensayo SMFA, los potenciales candidatos se añaden al cultivo de gametocitos infecciosos que se utilizan para alimentar mosquitos y que, tras un intervalo de tiempo fijo, son diseccionados para determinar la eficiencia con que los oocistos se han desarrollado en su estómago medio <sup>97</sup>. Este ensayo se desarrolló inicialmente para determinar *in vivo* el impacto de los anticuerpos bloqueantes de la transmisión que tenían como diana gametos y oocistos. Dado el tiempo y los costes que requieren llevar a cabo el SMFA, actualmente es un ensayo que solo se emplea

para validar la capacidad de bloqueo de la transmisión de las moléculas identificadas en los ensayos *in vitro* con gametocitos maduros.

Entre los fármacos empleados actualmente en clínica para el tratamiento de la malaria producida por *P. falciparum*, exclusivamente la primaquina tiene actividad sobre los gametocitos en estadio V y, por tanto, la capacidad para bloquear la transmisión de la enfermedad. Su uso está recomendado en áreas de baja transmisión como única administración después de la TCA en pacientes infectados por *P. falciparum*<sup>74</sup>. Sin embargo, no se puede administrar de forma masiva a la población endémica para frenar la transmisión de la malaria ya que produce anemia hemolítica en los individuos con deficiencia en glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD)<sup>98</sup>, que es relativamente común en áreas donde la malaria es endémica, ya que se ha visto que produce cierto tipo de inmunidad frente a la infección por *Plasmodium*. A esta limitación en el uso de la primaquina se unen los recientes casos de resistencia a artemisinina en el sudeste asiático (subregión del Gran Mekong) que están amenazando la efectividad de los TCAs<sup>99-101</sup>. Por todo ello, el descubrimiento y desarrollo de fármacos con nuevos modos de acción, así como perfiles toxicológicos más seguros que permitan no solo tratar la malaria si no también prevenir e interrumpir su transmisión, es ahora más urgente que nunca.

# Objetivos

---



1. Desarrollo de un ensayo *in vitro* de alto rendimiento que permita la identificación de compuestos potencialmente bloqueantes de la transmisión de la malaria en humanos. Este ensayo está basado en el proceso de transformación de los gametocitos en estadio V de *P. falciparum* a gametos, el cual ocurre de forma natural en el interior del mosquito *Anopheles*.
2. Validar el ensayo desarrollado en el Objetivo 1 mediante la evaluación de un grupo de antimaláricos comerciales con actividad frente a las formas eritrocíticas asexuales y sexuales de *P. falciparum*. Así mismo, comparar la actividad de estas moléculas sobre los gametocitos en estadio V con los valores descritos previamente en estudios similares.
3. Establecer las condiciones óptimas del ensayo para llevar a cabo una campaña de cribado de alto rendimiento. Determinar (i) el tiempo de incubación y (ii) la concentración de los compuestos a ensayar.
4. Cribado de la colección *Tres Cantos Antimalarial Set* (TCAMS), con las condiciones establecidas en el Objetivo 3, para identificar moléculas con doble actividad antimalárica: (i) frente a las formas asexuales intraeritrocíticas y (ii) frente a los gametocitos en estadio V.
5. Caracterización del perfil biológico de las moléculas identificadas en el cribado de la colección TCAMS, así como su actividad específica en el mosquito mediante el ensayo de referencia *Standard Membrane Feeding Assay* (SMFA).
6. Evaluar la eficacia *in vivo* de algunos de los compuestos caracterizados en el Objetivo 5, usando para ello un modelo de ratón de *P. berghei*, con objeto de determinar su potencial para ser desarrollados en un futuro como fármacos antimaláricos.



# Materiales y métodos



## 1. Células sanguíneas

Para el cultivo de *Plasmodium falciparum* se utilizó un concentrado de eritrocitos proveniente de donaciones incompletas, cedidas por la Cruz Roja española. Previo a su incorporación al cultivo de parásitos, este concentrado se lavó tres veces con medio RPMI-1640 (Gibco) para eliminar los conservantes, centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, los eritrocitos se mantuvieron al 50% de hematocrito en medio RPMI y se conservaron a 4°C durante un máximo de 5 días. Para la inducción de los cultivos de gametocitos se utilizaron siempre eritrocitos lavados en el mismo día.

## 2. Cultivo de formas asexuales eritrocíticas de *P. falciparum*

Para el cultivo de las formas asexuales sanguíneas de *P. falciparum* se utilizaron las cepas 3D7 y NF54 (cedidas amablemente por el laboratorio del Prof. Robert Sinden, *Imperial College of London*). El método de cultivo empleado fue el descrito por Trager y Jensen<sup>102</sup>, para lo cual los parásitos se mantuvieron a 37°C en medio completo al 4% de hematocrito en cultivo continuo bajo una atmósfera 5%CO<sub>2</sub>, 3%O<sub>2</sub>, 92%N<sub>2</sub>. El medio completo, que se describe a continuación, fue utilizado tanto para el cultivo de estadios asexuales como para la inducción de gametocitos. Los componentes del medio fueron: RPMI 25mM HEPES (13018-031, Gibco), 2g/L de bicarbonato sódico (S6014, Sigma-Aldrich), 2g/L de glucosa (G8270, Sigma-Aldrich) y 50mg/L de hipoxantina (H9636, Sigma-Aldrich). Este medio se completó con 10% de suero humano (Interstate Blood Bank, Inc.) previamente inactivado durante 30 minutos a 56°C. La parasitemia se mantuvo entre 0,5 y 5% para evitar la generación espontánea de gametocitos, para lo cual se realizaron controles de los cultivos en días alternos mediante frotis teñidos con colorante Giemsa (Merck Millipore) al 5% en agua tamponada a pH 7.2, y se diluyeron a conveniencia.

## 3. Producción de gametocitos

La inducción de gametocitos a partir de cultivos asexuales se realizó siguiendo el método empleado en Kaushal *et al.*, 1980<sup>103</sup>. A día 0, las condiciones se establecieron en 4% hematocrito y 1% parasitemia (mayoritariamente en fase anillo), en 100mL de volumen final en botellas estériles de 500mL (Nalgene 3110-42,

Thermo Scientific). El medio se cambió diariamente durante 14 días y la temperatura de los cultivos se mantuvo a 37°C en incubadores (HeraCell 240i, Thermo Scientific) en una atmósfera hipo-oxigénica (5%CO<sub>2</sub>, 3%O<sub>2</sub>, 92%N<sub>2</sub>). Bajo estas condiciones, los cultivos tienen una progresión bastante reproducible, observándose un pico máximo de parasitemia de formas asexuales hacia el día 4, gametocitos en estadio I-II a día 7, gametocitos en estadio III a día 9, en estadio IV a día 11 y mayoritariamente en estadio V a día 14 post-inducción. El seguimiento de la producción de gametocitos se llevó a cabo mediante frotis teñidos con colorante Giemsa. La producción de gametocitos requiere de un estricto mantenimiento de la temperatura a 37°C, por lo cual todo el material empleado fue previamente atemperado y el cambio del medio de los cultivos se realizó sobre placas calefactoras (XH-2001, Premiere).

#### **4. Ensayo de activación del gametocito femenino (*Pf*FGAA)**

Para realizar el ensayo de activación del gametocito femenino es necesario que los cultivos tengan una mayoría de gametocitos en estadio V, lo cual se alcanza entre 14 y 16 días post-inducción. En este momento, los gametocitos son extremadamente sensibles a la temperatura, por lo cual es muy importante mantenerlos a 37°C durante todo el proceso que se describe a continuación para evitar su transformación a gametos.

En primer lugar se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de densidad añadiendo 10mL del cultivo sobre 5mL de Nycoprep™ 1.077 (Axis-Shield) y se centrifugó a 800g durante 20 minutos. La banda obtenida en la interfase se lavó en medio incompleto (RPMI-1640), se centrifugó a 1800rpm durante 5 minutos, y se resuspendió en 5mL de medio completo. El número de gametocitos en estadio V se determinó usando una cámara de Neubauer y la concentración se ajustó a 8.000 gametocitos por pocillo (usando un volumen de 90µL/pocillo). Los gametocitos se dispensaron en placas negras de 384 pocillos con fondo transparente (781946, Greiner Bio-One) que ya contenían los compuestos a ensayar. Las placas con los parásitos se incubaron a 37°C (3%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>, 92%N<sub>2</sub>) durante 24h o 48h dependiendo del experimento. Pasado ese tiempo, se llevó a cabo la activación de los

gametocitos mediante el proceso previamente descrito de disminución de la temperatura y adición de ácido xanturénico <sup>91</sup> (D120804, Sigma). Para ello, se añadieron 10µL/pocillo de medio de activación, cuya composición es: RPMI 1640 con HEPES 25mM, 50µg/mL hipoxantina, 2g/L NaHCO<sub>3</sub>, ácido xanturénico 100µM y 20% suero humano tipo A+. Para el ensayo de detección de compuestos exclusivamente activos en la fase de gameto (formato 0h), los gametocitos se activaron durante 30min y posteriormente se incubaron con los productos.

Para poder detectar los gametos femeninos, el medio de activación se suplementó con el anticuerpo anti-Pfs25 (concentración final de 0,5µg/mL) producido con hibridomas monoclonales <sup>104</sup> (MRA-315, BEI *resources*) y conjugado con el fluorocromo Cy3 (PA33000, GE Healthcare). Los cultivos activados se mantuvieron después durante 24h a 26°C protegidos de la luz. Pasado ese periodo, se procedió a la lectura de las placas utilizando el sistema de microscopía confocal Opera® para cribado de alto rendimiento (PerkinElmer).

## **5. Compuestos y controles**

Los compuestos se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) al 100% y se dispensaron para alcanzar una concentración única final de 2µM para el cribado primario, o en diluciones seriadas ½ comenzando a una concentración final de 25µM para su evaluación en dosis-respuesta. Cada compuesto se ensayó por duplicado en al menos tres experimentos independientes. Como control negativo (activación del gametocito femenino en presencia del vehículo), se analizaron un mínimo de 10 pocillos con 0,5% de DMSO en cada placa. Como control positivo (activación residual en presencia de un fármaco con reconocida actividad gametocitocida), se analizaron un mínimo de 10 pocillos por placa que contenían tioestreptón (T8902, Sigma-Aldrich) a una concentración final 50µM.

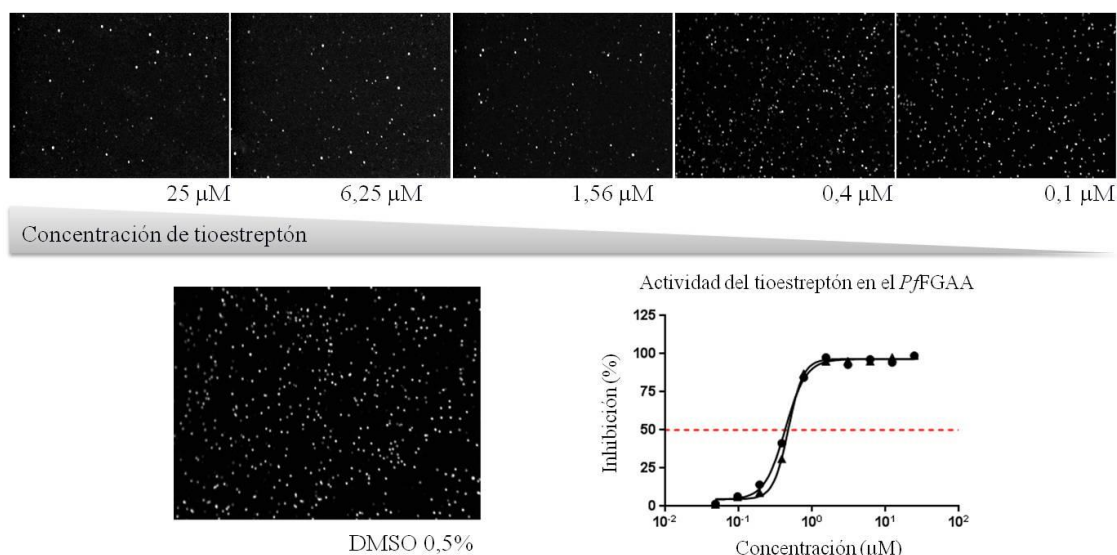
El grupo de moléculas MMV50, compuesto por 50 fármacos antimaláricos comerciales, fue proporcionado por la organización MMV (Ginebra, Suiza) y se utilizó para validar el ensayo en formato de alta densidad.

Los compuestos de la colección TCAMS fueron proporcionados por GSK, los productos se disolvieron en DMSO al 100% y se dispensaron en placas de 384 pocillos usando un dispensador Echo-CRS® (Labcyte).

## 6. Adquisición y análisis de imagen

La adquisición y el análisis de imagen se llevó a cabo con el sistema Opera® (PerkinElmer). Utilizando un objetivo 10x, se tomaron cinco imágenes desde el fondo de cada uno de los pocillos de las microplacas. La intensidad del fluorocromo Cy3 se determinó mediante exposición a una excitación de 532nm y tiempo de exposición de 80ms. Todas las imágenes se analizaron con el sistema Columbus® para análisis y almacenamiento de imágenes (PerkinElmer) mediante el uso de un algoritmo diseñado específicamente para este ensayo.

Una vez determinado el número de gametocitos femeninos activados por pocillo, los controles positivos (máxima inhibición en presencia de fármaco) y negativos (mínima inhibición en presencia de vehículo, 0,5% de DMSO) se usaron para definir el porcentaje de inhibición y calcular la concentración inhibitoria al 50% (IC<sub>50</sub>) para cada compuesto ensayado (Figura 15).



**Figura 15.** Imágenes y representación gráfica de la curva de dosis-respuesta del compuesto usado como control positivo: tioestreptón.

## 7. Análisis de datos

Durante la validación del ensayo, el cálculo de IC<sub>50</sub> se realizó mediante el programa GraphPad Prism usando un análisis de regresión no lineal, con dosis logarítmica normalizada de 4 parámetros y curva de pendiente variable.

La relación señal-ruido (S/R), señal-fondo (S/F) y el factor Z' se calcularon de acuerdo a las fórmulas descritas previamente <sup>105</sup>. Todas las fórmulas contienen la media y desviación estándar (DE) del control positivo (C<sup>+</sup>; tioestreptón) y del control negativo (C<sup>-</sup>; DMSO). Como medida de la calidad y la robustez de los ensayos de alto rendimiento, los valores del factor Z' deben ser siempre iguales o mayores a 0,4 <sup>106</sup>. Las fórmulas para calcular cada uno de estos parámetros se detallan a continuación:

$$\text{Relación señal/ruido} = \frac{\text{media del C}^- - \text{media del C}^+}{\text{DE del C}^+}$$

$$\text{Relación señal/fondo} = \frac{\text{media del C}^-}{\text{media del C}^+}$$

$$\text{Factor Z prima} = 1 - \frac{(3 \cdot \text{DE del C}^-) + (3 \cdot \text{DE del C}^+)}{\text{media del C}^- - \text{media del C}^+}$$

Los valores obtenidos se normalizaron respecto al porcentaje de inhibición de la respuesta biológica mediante los controles positivo (Inh C<sup>+</sup>) y negativo (Inh C<sup>-</sup>), de acuerdo a la ecuación descrita a continuación:

$$\% \text{Inhibición} = 100 - \left[ \frac{X - (\text{Inh C}^+)}{(\text{Inh C}^-) - (\text{Inh C}^+)} \cdot 100 \right]$$

La inhibición de los controles positivo y negativo se calculó en base a la media de las diferentes réplicas dentro de cada placa donde el compuesto X se ensayó.

El análisis de los parámetros estadísticos del ensayo durante el cribado de la colección TCAMS, así como el punto de corte estadístico basado en tres veces la desviación estándar de la muestra, se calcularon usando el programa ActivityBase XE (IDBS, Guilford, Surrey). El análisis de los positivos y su visualización se

llevaron a cabo usando Spotfire DecisionSite (Spotfire, Inc., Massachusetts). Los valores de pIC<sub>50</sub> se calcularon en ActivityBase XE usando una función de regresión no lineal para análisis de curvas de dosis-respuesta.

## **8. Ensayo bioluminiscente de ATP**

Con objeto de determinar la viabilidad de los gametocitos maduros (estadios IV y V) se empleó un ensayo de bioluminiscencia que determina los niveles intracelulares de ATP<sup>83,88</sup>. Los gametocitos se aislaron mediante un proceso de doble purificación consistente en un paso de sedimentación diferencial en gradiente de densidad seguido de un paso de aislamiento a través de columnas magnéticas<sup>83</sup>. Una vez purificados, los parásitos (12.500 gametocitos; 50µL/pocillo) se dispensaron en placas negras de 384 pocillos (781091, Greiner Bio-One) que ya contenían los compuestos a ensayar y se incubaron a 37°C durante 48h en una atmósfera de 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 92% N<sub>2</sub>. Para determinar los niveles de ATP intracelular se utilizó un kit Bactiter-Glo® (G8231, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después de añadir el reactivo necesario para la reacción luciferina-luciferasa (50µL/pocillo), se midió la luminiscencia emitida por los parásitos utilizando un lector de microplacas (Victor, Wallac).

## **9. Ensayo de exflagelación del gametocito masculino**

La exflagelación del gametocito masculino se midió siguiendo el protocolo previamente descrito<sup>91</sup> con ligeras modificaciones. Se partió de cultivos de gametocitos en estadio V a día 14-16, de los cuales se recogieron 5mL y se incubaron en placas de 6 pocillos con la concentración de compuesto correspondiente durante 48h a 37°C, bajo una atmósfera de 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 92% N<sub>2</sub>. Después de la incubación, una muestra de 200µL de cada pocillo se centrifugó usando una microfuga durante 30 segundos. Tras descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 20µL de medio de activación previamente atemperado a 37°C. Inmediatamente después, la muestra se colocó en una cámara de conteo (BVS100, Immune systems) y, tras 15 minutos a temperatura ambiente (22-23°C), se contaron

los centros de exflagelación utilizando microscopía de campo claro y un objetivo x10 (DM4000 B, Leica).

### **10. Standard Membrane Feeding Assay (SMFA)**

Los cultivos de gametocitos con una mayoría de estadios V se dispensaron en placas de 6 pocillos (5mL/pocillo) y se incubaron con los compuestos a una concentración final de 1 o 2 $\mu$ M (concentración equivalente a la IC<sub>90</sub> del compuesto en el ensayo de activación del gametocito femenino) durante 48h a 37°C y bajo una atmósfera de 3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> y 92% N<sub>2</sub>. Tras 24h de incubación, el medio fue reemplazado por medio fresco con la concentración de compuesto inicialmente utilizada. Pasadas las 48h de exposición total, los cultivos se centrifugaron a 2500g durante 3min a 37°C y el pellet se diluyó 1:1 con eritrocitos frescos (100%). El producto final con el que se alimentó a los mosquitos se consiguió diluyendo esta última mezcla al 50% con suero humano precalentado a 37°C.

Los mosquitos hembras de *Anopheles stephensi* con 4-6 días de edad (Insectario de GSK) se alimentaron durante 30min a través de una membrana de parafilm unida a alimentadores de cristal (Fisher Scientific) conectados a un baño de agua circulante a 37°C. Una vez alimentados, los mosquitos se transfirieron a un incubador a 27°C y 75% de humedad, con ciclos de 12h de luz/oscuridad.

Después de 7-8 días, se diseccionaron los estómagos de los mosquitos que tenían los ovarios totalmente desarrollados (lo que indica que las hembras se han alimentado) y se tiñeron con una solución acuosa de mercurio-dibromofluoresceína al 0,2% (63869, Fluka) durante 10min. Después, se contabilizó el número total de oocistos por estómago usando un microscopio de campo claro (DM2000, Leica) bajo un objetivo 10x.

Tras normalizar las muestras con el control negativo de DMSO, se calcularon los porcentajes de la prevalencia (nº de mosquitos con al menos un oocisto) y de la intensidad de la infección (nº de oocistos por estómago). Se llevaron a cabo 2-3 experimentos independientes con duplicados internos, utilizando una media de 40 mosquitos por cada compuesto ensayado. El experimento se consideró válido cuando

la media de intensidad de oocistos en el grupo control fue mayor de 2 oocistos por estómago y la prevalencia de la infección mayor del 70%.

## **11. Ensayo de citotoxicidad con células hepáticas HepG2**

Para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad se emplearon células hepáticas humanas tipo HepG2 (HB-8065, ATCC). Cuando éstas se encontraron creciendo activamente, se levantaron de la superficie celular con tripsina y se dispersaron con 5mL de medio Eagles MEM (suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% NEAA y 1% de penicilina+estreptomicina) mediante pipeteo repetido. La suspensión celular se añadió a 500mL del mismo medio para conseguir una densidad celular final de  $1,2 \times 10^5$  células/mL y se sembraron en placas de 384 pocillos (25 $\mu$ L por pocillo) con ayuda de un dispensador Multidrop combi (Thermo Scientific). El número de células final (3000/pocillo) aseguró que las nuevas monocapas que se formaron en la microplaca no tuviesen más del 50% de confluencia en el momento de la siembra. Las células, ya en contacto con los productos, se incubaron a 37°C durante 48h en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, las placas y el reactivo de CellTiter-Glo® (G7571, Promega) se equilibraron a temperatura ambiente durante 30min antes de proceder a leer la señal luminosa. Usando un dispensador Multidrop combi, se añadieron 25 $\mu$ L/pocillo del reactivo y, después de 10min a temperatura ambiente, la señal de luminiscencia fue registrada usando el lector ViewLux (Perkin Elmer).

## **12. Evaluación de la eficacia terapéutica antimalárica *in vivo***

Para este ensayo se utilizaron ratones CD-1 libres de patógenos (Hsd:ICR) que se obtuvieron de Harlan Interfauna Ibérica (Barcelona). Los ratones CD-1 hembras de 8 semanas de edad se infectaron con  $10^7$  eritrocitos infectados con *P.berghei* (día 0) por vía intravenosa. Los compuestos se inyectaron a una concentración de 50mg/kg en solución acuosa que contenía 5%DMSO/ 20% captisol. En el día 2 y 3 post-infección, se inyectó a los ratones una dosis oral del compuesto, teniendo en cuenta su peso corporal (20mL/kg). El grupo control recibió el mismo tratamiento pero inyectando el vehículo en lugar del compuesto. Durante el experimento, se tomaron muestras de sangre periférica antes y después del tratamiento (24h después de la

última dosis), en las cuales se midió la parasitemia mediante citometría de flujo utilizando una tinción con el marcador de ácidos nucleicos YOYO-1<sup>107</sup>.

### **13. Estudios de farmacocinética *in vivo***

Para llevar a cabo los estudios de farmacocinética, se utilizaron ratones hembras CD1 de 8 semanas de edad (n=2) (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona). Los compuestos se inyectaron por vía oral a 50mg/kg diluidos en solución acuosa con captisol al 20% (v:v). Tras la administración de los compuestos, se tomaron muestras de sangre (25µl) a distintos tiempos: 30min, 1h, 6h y 8h. Las muestras de sangre se diluyeron con el mismo volumen de una solución acuosa con saponina al 1% (m:v) y se almacenaron a -80°C. El análisis de las muestras consistió en un método de precipitación de proteínas seguido de análisis por espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Applied Biosystems). El análisis de datos se llevó a cabo mediante el programa WinNonLin Phoenix versión 6.3.

### **14. Ensayo de aclaramiento intrínseco**

Para determinar los valores de aclaramiento intrínseco se utilizaron microsomas hepáticos de ratón (M1000, XenoTech). Los compuestos se ensayaron a una concentración final de 0,5µM y se incubaron durante 45min a 37°C en un tampón de fosfato potásico 50mM (pH 7,4) que contenía 0,5mg de proteína microsomal/mL. La reacción se inició al añadir el cofactor NADPH (N1630, Sigma) a una concentración final de 1mM. La concentración máxima del solvente orgánico se estableció en 0,25%. Se tomaron muestras de 100µL a distintos tiempos: 0,5, 15, 30 y 45min, tras lo cual se paró la reacción con acetonitrilo y las muestras se analizaron por LC-MS/MS (Applied Biosystems). El aclaramiento intrínseco se determinó mediante regresión no lineal, tras corregir con el volumen de incubación y asumiendo una cantidad de 48g de proteína microsomal de ratón por cada gramo de hígado.

## 15. Ensayo de permeabilidad a través de membranas artificiales

Se trata de un ensayo en formato de 96 pocillos que mide la velocidad con que un compuesto es capaz de permear a través de una membrana fosfolipídica. El compuesto se encuentra a una concentración de 10 $\mu$ M y la membrana está formada por L- $\alpha$ -fosfatidil colina de huevo al 1,8% (830051, Avanti Polar Lipids) y colesterol al 1% (C8667, Sigma) disuelto en n-decano (D0011, TCI American). Se añade un tampón fosfato 50mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> con 0,5% de 2-hidroxipropil-b-ciclodextrina) pH 7 en la parte superior e inferior de la placa (S5EJ046I08, MilliPore Corp.) y los lípidos forman bicapas entorno a los pequeños poros del filtro. Tres horas después, se mide la concentración de compuesto en los compartimentos donante y receptor mediante HPLC (Agilent 1100 LC). La permeabilidad (P) se mide utilizando las siguientes fórmulas:

$$P = -10^7 \ln \left( 1 - \frac{C_R}{C_{EQ}} \right) \frac{V_D}{1 - X} \frac{1}{A t}$$

$$C_{EQ} = \frac{(C_R V_R) + (C_D V_D)}{V_R + V_D}$$

Donde  $X = V_D/V_R$ ;  $C_R$  y  $C_D$  son las concentraciones finales en el lado receptor y donante, respectivamente;  $V_R$  y  $V_D$  son los volúmenes en el compartimento receptor y donante, respectivamente;  $A$  es el área (cm<sup>2</sup>) y  $t$  es el tiempo de incubación (s). Los valores de corte que establecen las diferentes categorías de permeabilidad son: Alta:  $P > 200$  nm/s; Media:  $10$  nm/s  $< P < 200$  nm/s; Baja:  $P < 10$  nm/s.

# Resultados

---



## **Capítulo I**

### **Escalado y validación del ensayo de activación del gametocito femenino de *P. falciparum* (PfFGAA)**



El ensayo de activación del gametocito femenino se basa en el proceso biológico de gametogénesis que ocurre de forma natural en el interior del mosquito, cuando éste pica a un ser humano y se alimenta de la sangre de un individuo infectado de malaria. Los gametocitos en estadio V, circulantes en sangre periférica, pasan al estómago medio del mosquito donde se liberan del eritrocito que los contiene y, debido a la bajada de temperatura (de 37°C a 27°C) y la presencia de factores inductores en el insecto, estos gametocitos se transforman en gametos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos). El gameto femenino comienza entonces a expresar proteínas, cuyos ARNm se mantenían reprimidos en las fases de gametocito, que son indispensables para la formación y desarrollo del cigoto. Una de estas proteínas es Pfs25<sup>108</sup>, una proteína de superficie localizada en la membrana externa del gameto femenino que, además de servir para detectar los gametos femeninos en ensayos *in vitro*<sup>91</sup>, se ha convertido en un importante candidato para desarrollar la vacuna bloqueante de la transmisión de la malaria<sup>70,109</sup>.

## 1. Puesta a punto del PfFGAA en formato de alta densidad

El ensayo PfFGAA fue inicialmente desarrollado en un formato sencillo de bajo rendimiento<sup>91</sup>. Durante el presente trabajo de Tesis se puso a punto en nuestro laboratorio y se llevaron a cabo una serie de modificaciones que permitieron su adaptación a un formato de alto rendimiento, con el objetivo final de hacer cribados de grandes colecciones de productos. Para ello, en primer lugar nos planteamos escalar la producción de gametocitos y, en segundo lugar, desarrollar un sistema de detección de imágenes usando un microscopio confocal de fluorescencia de alta resolución Opera® (Perkin Elmer).

La formación de los gametos femeninos se usó como marcador de la viabilidad y funcionalidad del cultivo de gametocitos en estadio V. La detección de la activación del gametocito femenino se basó en la expresión específica de la proteína Pfs25 en la superficie de aquellos gametos femeninos que han salido del eritrocito y por tanto se consideran activados, es decir, listos para la fertilización y formación del cigoto.

### 1.1. Producción de los gametocitos

La producción de gametocitos viables a gran escala es uno de los mayores pasos limitantes a la hora de realizar cribados de alto rendimiento con el fin de identificar compuestos gametocitocidas.

Existen varios factores que son cruciales para la generación y maduración de gametocitos de *P. falciparum*. Es importante no solo que éstos consigan alcanzar el estadio V, sino que los gametocitos sean de alta calidad, siendo lo suficientemente funcionales como para poder transformarse en gametos. Estos factores se detallan a continuación:

- Cepa de *P.falciparum*: se usa preferentemente NF54 por su elevada capacidad de producir gametocitos frente a otras cepas utilizadas en el laboratorio. Se observó que es importante no mantener las formas asexuales eritrocíticas en cultivo continuado durante más de 2 meses ya que el parásito pierde su capacidad de producir formas sexuales.
- Medio de cultivo: se trata de un medio base con RPMI, hipoxantina y glucosa, que debe estar suplementado con suero humano. Aunque las formas asexuales crecen bien en el laboratorio usando medios suplementados con AlbuMAX (albúmina de suero bovino rico en lípidos), la generación de gametocitos V funcionales requiere de al menos un 5% de suero humano en el medio de cultivo.
- Temperatura: el mantenimiento de una temperatura de 37°C durante todo el proceso de gametocitogénesis es crucial, ya que si ésta disminuye durante los primeros días puede afectar al porcentaje final de gametocitos y si lo hace al final del proceso, puede producir la activación espontánea de los gametocitos en estadio V. Por tanto, la producción se realizó utilizando tanto incubadores como placas calefactoras para los cambios de medio.

Aún teniendo en consideración estos factores, el porcentaje máximo de gametocitos que alcanzan el estadio V no supera el 3% del porcentaje total de células – eritrocitos - en cultivo. Dado que la realización de un cribado de alto rendimiento requería del manejo de un elevado número de cultivos celulares para conseguir suficiente inóculo

parasitario, el primero de nuestros objetivos fue el escalado de los cultivos. Mediante la utilización de botellas de 500mL, conseguimos incrementar el volumen de cada cultivo hasta 100mL, lo que nos proporcionó el número de gametocitos necesario para escalar el ensayo.

En segundo lugar, se consideró importante incorporar un paso de purificación o enriquecimiento que permitiese concentrar los parásitos y, con ello, disminuir el número de células por pocillo en las placas de ensayo. Para ello se empleó un gradiente de densidad con Nycoprep® que permitía sedimentar la mayor parte de las células sanguíneas (>90%) y aislar fácilmente los gametocitos en la interfase, ya que éstos son menos densos que los eritrocitos.

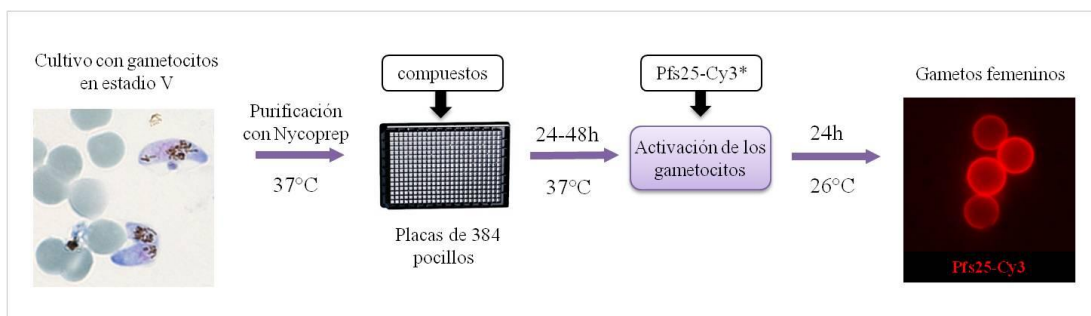
Mediante las dos modificaciones descritas, escalado de cultivos y purificación, se consiguió obtener más de  $2,5 \times 10^7$  gametocitos en estadio V por cultivo, equivalentes a 8 placas de ensayo utilizando 8.000 gametocitos/pocillo en placas de 384 pocillos. Así mismo, el paso de enriquecimiento fue esencial para obtener la máxima sensibilidad y reproducibilidad del ensayo en el formato de 384 pocillos.

## **1.2. Desarrollo del ensayo**

Nuestro siguiente paso fue optimizar el proceso de formación de los gametos femeninos a partir de los gametocitos V purificados. Este proceso puede simularse en el laboratorio utilizando ácido xanturénico<sup>59</sup>, un compuesto sintético muy similar a un factor natural que se encuentra en el estómago del mosquito para inducir la gametogénesis. Por ello, se procedió a la adición de un medio con base RPMI que contenía ácido xanturénico a una concentración final 100µM (denominado “medio de activación”), usando un volumen de 10µl/pocillo.

Por otro lado, la gametogénesis también requiere de una bajada de temperatura de al menos 5 grados. En consecuencia, tras añadir el nuevo medio de cultivo a las placas que estaban a 37°C, éstas se trasladaron a un incubador a 26-27°C, donde se mantuvieron durante 24h.

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de la proteína Pfs25 en la superficie de la membrana del gameto femenino es altamente específica y constituye un buen marcador para evaluar la formación de los mismos. Por ello, se decidió utilizar un anticuerpo monoclonal anti-Pfs25 procedente de hibridomas<sup>104</sup> que, conjugado con el fluorocromo Cy3, permitió la detección de formas redondeadas fluorescentes tan solo 30 minutos tras producir la activación de los gametocitos. Sin embargo, se observó que la máxima intensidad de la señal de fluorescencia se conseguía pasadas 24h después de producir la activación, ya que la expresión de la proteína Pfs25 en la superficie del gameto femenino se ve incrementada a lo largo del tiempo. Con objeto de minimizar al máximo el número de pasos del protocolo del ensayo PFGAA, añadimos el anticuerpo anti-Pfs25-Cy3 (0,5µg/ml) al medio de activación y posteriormente mantuvimos las placas durante 24h en un incubador a 26°C (Figura 16).



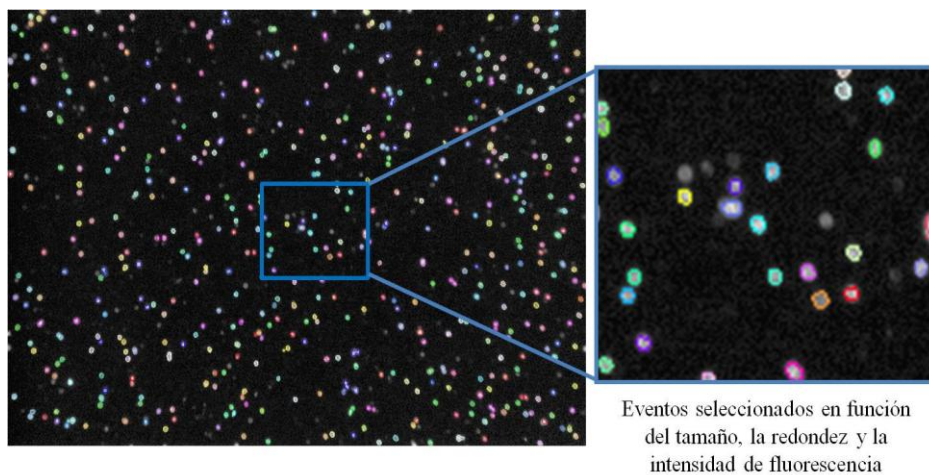
**Figura 16.** Diagrama del protocolo del ensayo de activación del gametocito femenino de *P. falciparum* en formato de alto rendimiento. Los gametocitos femeninos activados se detectan mediante la señal fluorescente del Cy3 en el Opera<sup>®</sup> High Content Screening system. Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017<sup>95</sup>.

### 1.3. Mejora del sistema de lectura del ensayo

En el formato de baja escala del ensayo PFGAA, la señal de fluorescencia de las células positivas para Pfs25-Cy3 se analizó usando un algoritmo sencillo de conteo de partículas<sup>91</sup>. Para el formato de alto rendimiento, la detección de los gametocitos femeninos viables activados se mejoró mediante la utilización de un microscopio confocal de alta resolución (Opera<sup>®</sup>) y el desarrollo de un nuevo algoritmo con mayor capacidad de resolución y discriminación<sup>95</sup>. Este algoritmo permitió calcular

el número de eventos - gametocitos femeninos activados - en base a la intensidad de la señal del anticuerpo Pfs25-Cy3.

Con el objetivo de seleccionar los parámetros discriminatorios más apropiados y descartar cualquier objeto fluorescente residual, así como gametos no viables, se utilizó un análisis de agrupamiento mediante el algoritmo *K-means*<sup>110</sup> que tenía en cuenta propiedades como la morfología, textura e intensidad de fluorescencia. Como resultado de este análisis, un grupo de parámetros que incluían la redondez, el área, la intensidad y la uniformidad, se seleccionaron como variables discriminantes en el algoritmo de análisis de imagen (Columbus®). Este análisis permitió diferenciar únicamente aquellos eventos asociados a los gametocitos femeninos activados (Figura 17).



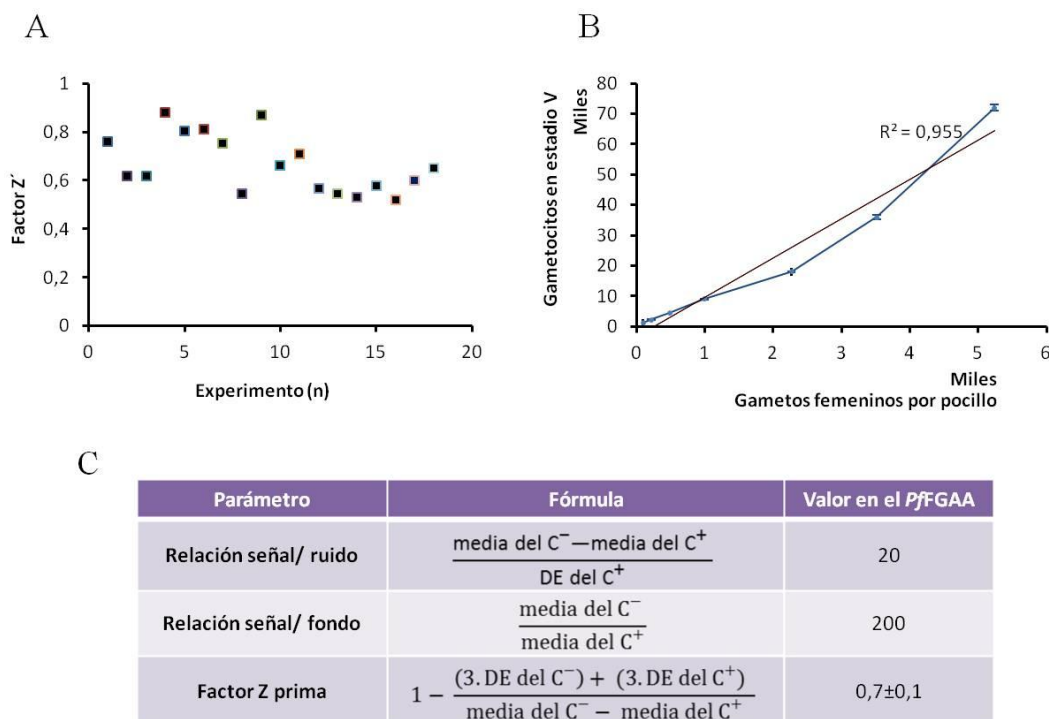
**Figura 17.** Imagen de los eventos discriminados por el algoritmo empleado en el ensayo PFGAA mediante los parámetros de tamaño, redondez y fluorescencia.

#### 1.4. Parámetros de calidad del ensayo

Siguiendo el procedimiento previamente indicado, el ensayo permitía evaluar alrededor de 20,000 compuestos por semana, cumpliéndose con ello nuestro objetivo de obtener un método de alto rendimiento.

El siguiente paso fue la determinación y el ajuste de los parámetros de calidad del ensayo (Figura 18) con el objetivo de asegurar su fiabilidad en cribados de alto rendimiento. Los parámetros calculados fueron los siguientes:

- **Relación señal/fondo:** es el cociente entre la media del control negativo y la media del control positivo. Cuanto más alto sea este valor, mayor calidad tiene el ensayo.
- **Relación señal/ruido:** tiene en cuenta no solo la diferencia entre las medias del control negativo y positivo, si no la desviación estándar del control positivo. Al igual que el parámetro anterior, cuanto más elevado sea este cociente, mayor será la calidad del ensayo.
- **Factor Z' o Z prima:** es un parámetro estadístico que tiene en cuenta las medias y desviaciones estándar del control positivo y negativo. Un ensayo se considera válido para cribado de alto rendimiento cuando su factor Z' es mayor de 0,4.



**Figura 18.** Calidad y sensibilidad del ensayo PfFGAA en formato de alto rendimiento. (A) Representación gráfica del factor Z' obtenido en 18 placas independientes durante la validación del formato de alto rendimiento. (B) Gráfica de linealidad de los gametocitos en estadio V frente a los gametos femeninos detectados en cada pocillo. (C) Parámetros de calidad evaluados y valores obtenidos en el ensayo. Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2015<sup>95</sup>.

## 2. Comparativa del ensayo PFGAA en los formatos de bajo y alto rendimiento

Se ensayaron 20 antimaláricos estándar frente a gametocitos en estadio V con el objetivo de comparar los valores obtenidos en el nuevo formato de alto rendimiento respecto al de bajo rendimiento previamente descrito por Delves y colaboradores <sup>91</sup>. Para ello, se ensayaron a una concentración única 10 $\mu$ M empleando un tiempo de incubación de 24h y se realizaron 3 experimentos independientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. En concordancia con lo observado en el modelo de bajo rendimiento, solo cuatro de los 20 compuestos inhibieron la formación del gameto femenino con valores superiores al 50%: cicloheximida, mefloquina, pironaridina y tioestreptón. Así mismo, esta evaluación sirvió para confirmar el reducido número de antimaláricos comerciales que tienen actividad frente a las formas sexuales maduras de *P.falciparum*.

El azul de metileno mostró una menor potencia en el formato de alto rendimiento (42%) respecto al previamente descrito en el formato de bajo rendimiento (95,82%). Sin embargo, la incubación de los gametocitos con este compuesto durante 24h adicionales (tiempo completo de incubación de 48h), mostró un incremento sustancial en su potencia, llegando a alcanzar el 90% de inhibición.

**Tabla 1.** Actividad de 20 fármacos antimaláricos en el ensayo PFGAA. Comparativa de los formatos de alto y bajo rendimiento. Modificada de Miguel-Blanco *et al.* 2015<sup>95</sup>.

Compuesto	Activación del gametocito femenino a 10µM			
	Formato de alto rendimiento		Formato de bajo rendimiento*	
	Media % inhibición	DE	Media % inhibición	EEM
Amodiaquina	34,6	5,3	27,25	4,5
Artemeter	28,2	8,7	9,97	11,48
Artemisinina	27,9	13,7	11,44	8,23
Artesunato	38,9	14,7	10,3	2,3
Azitromicina	19,4	5,2	12,95	6,92
Cloroquina	13,7	10,3	nd	nd
Cicloguanil	11,9	9,1	17,63	5,27
Cicloheximida	86,9	11,5	nd	nd
Dihidroartemisinina	43,3	15,1	9,36	4,26
Doxiciclina	9,0	10,4	45,41	3,18
Halofantrina	15,6	10,9	-0,89	9,63
Lumefantrina	14,1	11,2	nd	nd
Mefloquina	64,3	12,0	34,2	9,21
Azul de metileno	42,0	17,6	95,82	1,99
Primaquina	21,7	13,2	17,77	11,22
Pirimetamina	16,9	12,2	7,43	6,52
Pironaridina	100	2,7	95,56	1,17
Quinina	11,2	8,8	nd	nd
Sulfadoxina	10,4	11,7	nd	nd
Tioestreptón	97,4	1,2	97,85	0,46

Se indica la media del % del inhibición respecto a los controles de DMSO (n=6) ± la desviación estándar (DE) o el error estándar de la media (EEM). \*Datos de Delves *et al.* 2013<sup>91</sup>.

Posteriormente se llevó a cabo una evaluación en dosis-respuesta de aquellos compuestos que habían superado el 50% de inhibición después de 24h de exposición (Tabla 2). Entre todos los compuestos ensayados, el tioestreptón fue el más potente frente a la formación de gametos femeninos, con una IC<sub>50</sub> de 0,27µM.

**Tabla 2.** Evaluación en dosis-respuesta de los compuestos positivos con más del 50% de inhibición en el ensayo P<sub>f</sub>FGAA. Modificada de Miguel-Blanco *et al.* 2015<sup>95</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Media	DE
Tioestreptón	0,27	0,08
Azul de metileno	11,9	2,24
Pironaridina	2,42	0,72
Cicloheximida	1	0,34
Mefloquina	4,51	3,85

Se muestra la media de los valores de % de inhibición tras 24h de incubación respecto a los controles de DMSO (n=4) ± la desviación estándar (DE).

### 3. Validación del ensayo P<sub>f</sub>FGAA en formato de alto rendimiento

Tras comprobar que nuestros resultados en formato de alto rendimiento se correspondían con los descritos para el formato de bajo rendimiento, procedimos a la validación del ensayo P<sub>f</sub>FGAA para llevar a cabo cribados de grandes bibliotecas. Para ello, usamos un panel de 50 compuestos antimaláricos de diferentes familias químicas perteneciente a la organización MMV, conocido como MMV50, el cual incluía también los 20 compuestos ya ensayados (Tabla 1).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el azul de metileno y con objeto de identificar moléculas con modo de acción lento, decidimos evaluar la actividad de este panel de 50 compuestos en dosis-respuesta usando 48h de exposición (Tabla 3). De forma similar a lo obtenido previamente con el grupo de 20 compuestos, con el panel MMV50 se obtuvieron un reducido número de compuestos activos con valores de IC<sub>50</sub> submicromolares. Los compuestos con mayor potencia fueron: endoperóxidos, como la dihidroartemisinina (0,99μM), artesunato (0,64μM) y artemisona (0,94μM); el antimicrobiano tioestreptón (0,12μM) y el colorante azul de metileno (0,92μM).

**Tabla 3.** Actividad gametocitocida del set de antimaláricos MMV50 en el formato de alto rendimiento del ensayo PFGAA. Modificada de Miguel-Blanco *et al.* 2015<sup>95</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)		Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Media	DE		Media	DE
<b>Endoperóxidos</b>			<b>4-aminoquinolinas</b>		
Artemeter	9,96	2,06	Amodiaquina	9,01	0,86
Dihidroartemisinina	0,99	0,74	AQ-13	15,89	1,33
Artesunato	0,64	0,47	Cloroquina	>25	-
Artemisinina	7,59	5,96	Hidroxiclороquina	>25	-
OZ277 (RBX-11160)	3,59	0,81	Naptoquina	1,98	1,12
Artemisóna	0,94	0,25	Piperaquina	>25	-
			Pironaridina	1,57	0,10
<b>8-aminoquinolinas</b>			<b>Aminoalcoholes</b>		
Pamaquina	2,37	1,02	Halofantrina	>25	-
Primaquina	11,04	2,94	Lumefantrina	>25	-
Tafenoquina	7,60	0,80	Mefloquina (Racémico)	7,48	1,41
NPC-1161B	6,07	2,54	Mefloquina (+ RS)	4,87	0,99
			Quinina sulfato dihidrato	9,80	8,28
<b>Antifolatos</b>			<b>Sulfonamidas</b>		
Primetamina	>25	-	Sulfadiazina	16,54	0
Clorproguanil	4,68	0,28	Sulfametoxazol	>25	-
Proguanil	11,94	1,32	Sulfadoxina	>25	-
P218	>25	-			
<b>Antimicrobianos</b>			<b>Miscelánea</b>		
Azitromicina	13,02	0	Dehidroepiandrosterona	>25	-
Dapsóna	>25	-	Cicloheximida	5,36	0,55
Doxiciclina	>25	-	Riboflavina	>25	-
Trimetoprima	>25	-	N-acetil-D-penicilamina	>25	-
Tioestreptón	0,12	0,01	Deferoxamina mesilato	>25	-
Clindamicina	>25	-	Atovaquona	5,31	2,74
Cis-mirincamicina	16,69	1,94	Azul de metileno	0,92	0,24
Trans-mirincamicina	17,45	1,85	Quinidina	>25	-
Fosmidomicina	>25	-			
Pentamidina	7,41	1,40			
Tetraciclina	>25	-			

Se muestra la media de los valores del % inhibición respecto a los controles DMSO (n=3) ± la desviación estándar (DE).

## Capítulo II

### **Cribado de la colección *Tres Cantos Antimalarial Set* (TCAMS) en el ensayo PfFGAA**

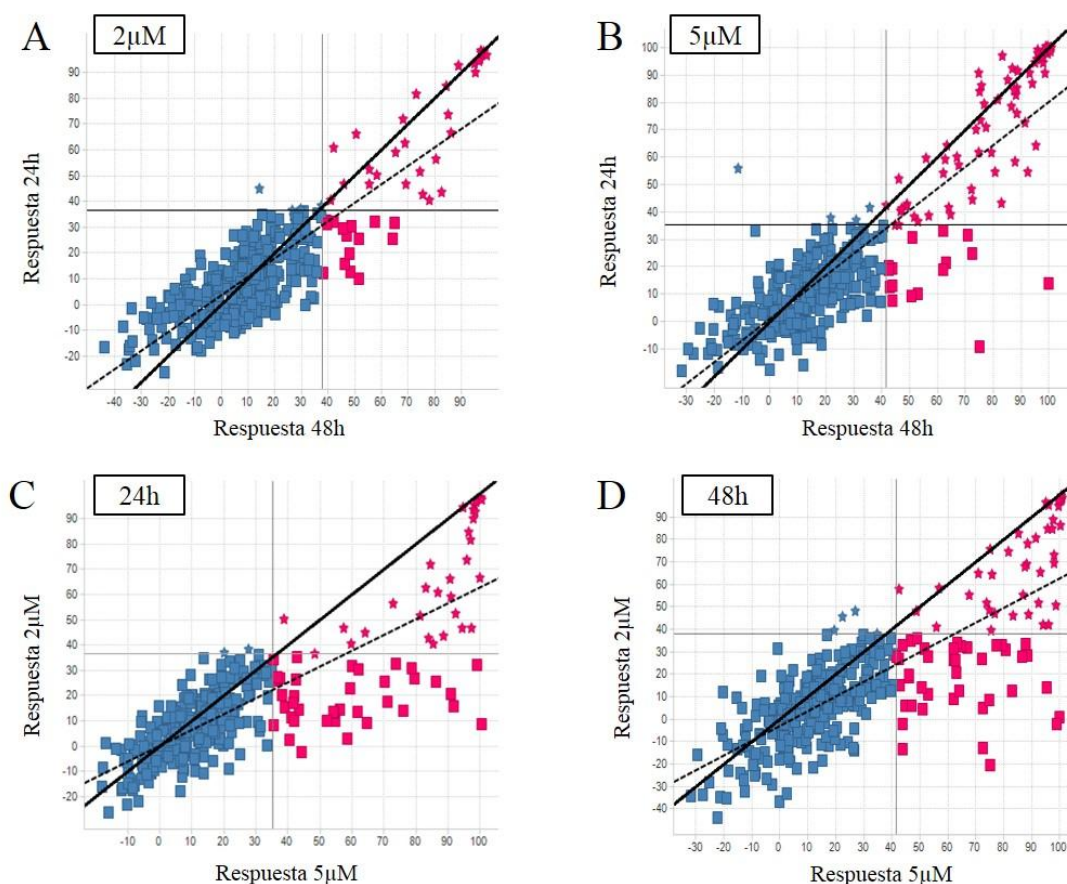


## 1. Determinación de las condiciones de cribado del TCAMS

Una vez validado el ensayo PFGAA en formato de alto rendimiento con la colección de 50 antimaláricos comerciales, el siguiente paso fue investigar las condiciones óptimas que se requerían para el cribado de la colección TCAMS. Esta colección, propiedad de GSK, contiene 13.533 compuestos con actividades menores de  $2\mu\text{M}$  ( $>80\%$  inhibición) frente a las formas asexuales eritrocíticas de *P. falciparum*<sup>78</sup>.

Un subgrupo de 356 compuestos, seleccionados de forma aleatoria entre los 13.533 compuestos de la colección, se utilizó para llevar a cabo un test de robustez que permitiese determinar la concentración y el tiempo de incubación óptimos para ensayar la colección completa. El test de robustez se llevó a cabo empleando dos concentraciones de producto (2 y  $5\mu\text{M}$ ), usando dos tiempos de incubación diferentes (24 y 48h).

Se estableció que un compuesto sería considerado activo (*hit*) en base al siguiente punto de corte: el valor correspondiente a la media de inhibición de todos los compuestos ensayados más tres veces la desviación estándar de la muestra. Posteriormente, se llevó a cabo una comparativa a pares de cada compuesto ensayado bajo las diferentes concentraciones y tiempo de incubación (Figura 19). Como cabía esperar, observamos que el número de compuestos activos se incrementaba al usar una elevada concentración y un mayor tiempo de exposición. Se obtuvieron 33 y 44 hits a 24h y 48h, respectivamente, al utilizar la concentración  $2\mu\text{M}$ ; mientras que a la concentración  $5\mu\text{M}$  se observaron 69 y 81 hits a 24h y 48h, respectivamente.



**Figura 19.** Determinación de las condiciones óptimas para el cribado de alto rendimiento de la colección TCAMS. Ilustración gráfica de los resultados del test de robustez; comparativa de las condiciones ensayadas: 24-48h de incubación y concentración 2-5  $\mu\text{M}$ . (A) y (B) muestran la respuesta al incrementar la concentración; (C) y (D) muestran la respuesta al incrementar el tiempo de incubación. El color azul indica falta de actividad y el rosa actividad. Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2015<sup>95</sup>.

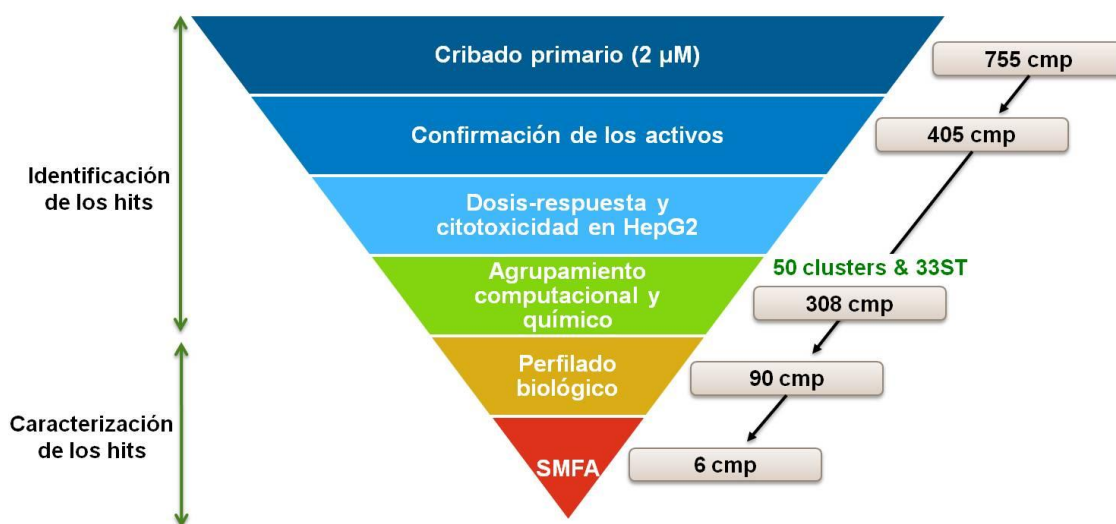
Tras analizar los resultados de la comparativa a pares, concluimos que el porcentaje de *hits* obtenidos usando la concentración  $2\mu\text{M}$  era la más adecuada para el cribado de la colección completa (9,27% y 12,36% tras 24h y 48h de incubación, respectivamente). Hay que tener en cuenta que estos valores son más elevados que los obtenidos generalmente en campañas de cribado de alto rendimiento (generalmente en torno al 1-2%) ya que la colección TCAMS está previamente filtrada por su actividad antimalárica frente a las formas asexuales, y por tanto era de esperar que se encontrase un mayor número de compuestos activos frente a los estadios sexuales.

Con objeto de incluir en nuestros resultados tanto moléculas de acción rápida como moléculas con modo de acción lento, nos decidimos por emplear el mayor tiempo de exposición, y las condiciones finales para el cribado fueron entonces definidas de la siguiente forma: tiempo de exposición de 48h y concentración final de los productos de 2 $\mu$ M.

## 2. Cribado de la colección TCAMS

### 2.1. Identificación de los compuestos para bloquear la transmisión de malaria

La colección de compuestos TCAMS fue evaluada en el ensayo PFGAA siguiendo la cascada de progresión que se describe a continuación en la Figura 20.



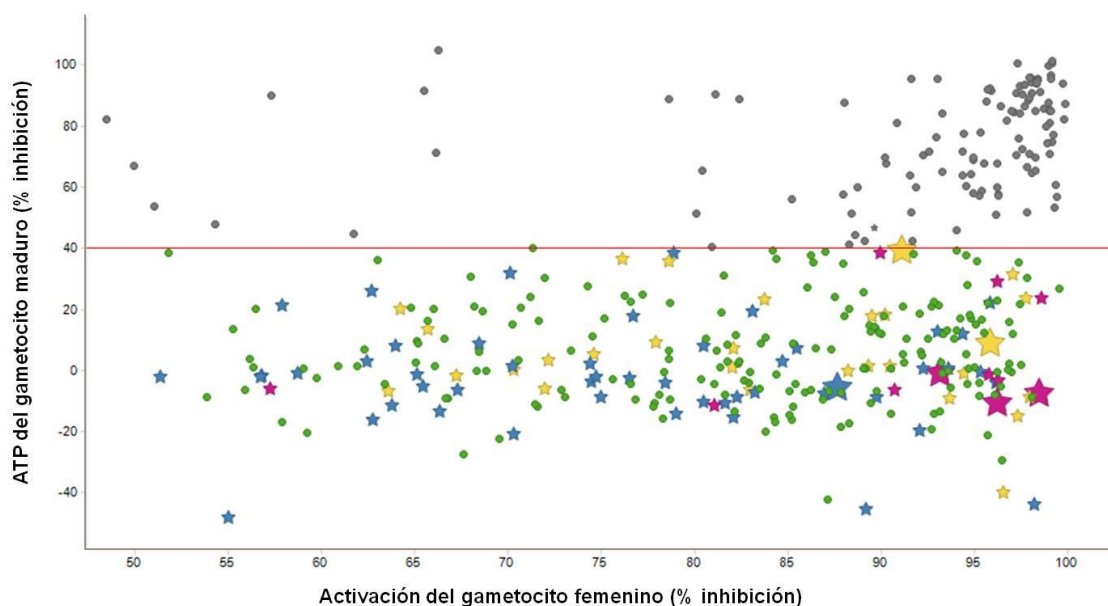
**Figura 20.** Cascada de progresión del cribado de la colección TCAMS en el ensayo PFGAA. En la figura se muestran los diferentes pasos seguidos durante el cribado del TCAMS, así como el número de compuestos identificados en las primeras fases y los seleccionados para completar el perfil químico y biológico. Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

El primer paso consistió en ensayar los 13.533 compuestos a punto único usando una concentración final de producto 2 $\mu$ M y 48h de incubación. Como resultado de este primer cribado, se identificaron 755 hits usando como punto de corte estadístico la

media de las muestras más tres veces la desviación estándar de las mismas, que correspondía al 53% de inhibición. Seguidamente, los hits se ensayaron de nuevo, esta vez por triplicado, a la misma concentración y se obtuvo una confirmación de actividad con el mismo punto de corte para 405 de los 755 compuestos ensayados. El porcentaje final de moléculas de la colección con actividad en el ensayo *PffGAA* fue del 3%.

Los 405 compuestos confirmados se evaluaron en dosis-respuesta para determinar su concentración inhibitoria al 50% ( $IC_{50}$ ) (Tabla suplementaria 1). Se observó una buena correlación entre los hits confirmados y su actividad en las curvas de dosis-respuesta, obteniéndose una  $IC_{50}$  menor de  $2\mu M$  para más del 80% de los compuestos. Adicionalmente, se evaluó la citotoxicidad de estos compuestos en células hepáticas de mamífero (HepG2) para determinar con ello la especificidad de las moléculas frente al parásito. En total, unas 120 moléculas mostraron valores de  $IC_{50}$  superiores a  $10\mu M$ , considerándose por tanto más específicas frente a *Plasmodium* que a células de mamífero (Tabla suplementaria 1).

Por otro lado, también quisimos comprobar la actividad gametocitocida de los 405 compuestos activos y para ello utilizamos el ensayo bioluminiscente de ATP<sup>88</sup>. Este ensayo permite determinar los niveles intracelulares de ATP de los gametocitos maduros, que se corresponden con su viabilidad celular<sup>83</sup>, y con ello identificar productos que tengan actividad cida específica sobre estos estadios. Tras ensayar los compuestos en las mismas condiciones que en el cribado primario ( $2\mu M$  y 48h), se observó que de los 405 compuestos activos en el ensayo *PffGAA*, solo 147 compuestos eran también identificados como moléculas activas en el ensayo de ATP (Figura 21, Tabla suplementaria 1). Este resultado sugiere que las 258 moléculas restantes estarían produciendo una inhibición funcional del gametocito que no se traduciría en muerte celular pero le incapacitaría para progresar al estadio de gameto.



**Figura 21.** Gráfico de correlación entre los compuestos positivos en el cribado con el ensayo *Pf*FGAA comparado con sus actividades en el ensayo bioluminiscente de ATP. Un total de 258 compuestos (círculos verdes y estrellas de diferentes colores) de los 405 *hits* fueron activos exclusivamente en el *Pf*FGAA, mientras que 147 (círculos grises) fueron activos en ambos ensayos. Las estrellas representan los compuestos caracterizados en mayor detalle: lentos en azul, rápidos en amarillo y los que actúan sobre el gameto en rosa. Los compuestos ensayados en el SMFA se indican con estrellas de mayor tamaño. Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

## 2.2. Clasificación química de los compuestos activos

Con objeto de evaluar tanto la diversidad como la novedad química obtenidas tras el cribado de la colección TCAMS con el ensayo *Pf*FGAA, los 405 compuestos confirmados como moléculas inhibitoras de la activación del gametocito femenino, fueron sujetos a un análisis computacional.

Mediante la aplicación de un algoritmo de agrupamiento por ligamiento completo y usando un coeficiente de similitud de Tanimoto de 0,55, se identificaron 57 grupos (*clusters*) y 33 moléculas únicas (*singletons*). La clasificación inicial se basó en las propiedades físico-químicas de las moléculas - peso molecular, lipofilidad y número de anillos aromáticos - así como en el índice de selectividad de las mismas. El índice de selectividad viene determinado por el cociente entre la potencia del compuesto en el parásito ( $IC_{50}$ ) y su toxicidad en células de mamífero ( $Tox_{50}$ ).

Tras este análisis, se decidió que 7 *clusters*, que comprendían 97 compuestos, serían excluidos y no pasarían a la siguiente fase de la cascada de progresión dado que tenían un perfil físico-químico de baja calidad. Las características que se tuvieron en cuenta para esta exclusión fueron: un peso molecular mayor de 600 g/mol, un clogP (valor calculado del coeficiente de partición) mayor de 6 y una citotoxicidad en HepG2 menor de 10 $\mu$ M. Esto nos llevó a trabajar con un número de moléculas más reducido pero de mejor calidad, clasificados en 50 *clusters* más 33 *singletons* (Tabla suplementaria 2). Más del 70% de estos compuestos pertenecían a *clusters* con tres o menos representantes, lo cual es indicativo de la amplia diversidad química identificada en este trabajo.

Finalmente, se seleccionó un grupo de 90 compuestos que fuese representativo de la toda la diversidad química identificada por nuestro ensayo (Tabla 4), con objeto de caracterizar su perfil biológico en mayor profundidad. La selección de estos compuestos se llevó a cabo teniendo en cuenta dos parámetros principales: el valor de IC<sub>50</sub> (o potencia) del compuesto en el parásito y el valor de Tox<sub>50</sub> (o citotoxicidad) en células HepG2. En base a estos parámetros, seleccionamos los compuestos con mayor potencia y menor toxicidad dentro de cada *cluster*. En la Figura 22 se indica parte de la diversidad química incluida en los 90 compuestos seleccionados, mostrándose en mayor detalle la estructura química de 15 compuestos que se encuentran dentro de un espacio físico-químico apropiado (considerando un valor de clogP <5 y el número de anillos aromáticos < 3).

**Tabla 4.** Actividad de 90 compuestos frente a gametocitos V usando el ensayo PFGAA y su toxicidad en células hepáticas de mamífero (HepG2 TOX<sub>50</sub>). \*Las actividades en estadios asexuales eritrocíticos han sido extraídas de Gamó *et al.* 2010<sup>78</sup>. Modificada de Miguel-Blanco *et al.*, 2017<sup>96</sup>.

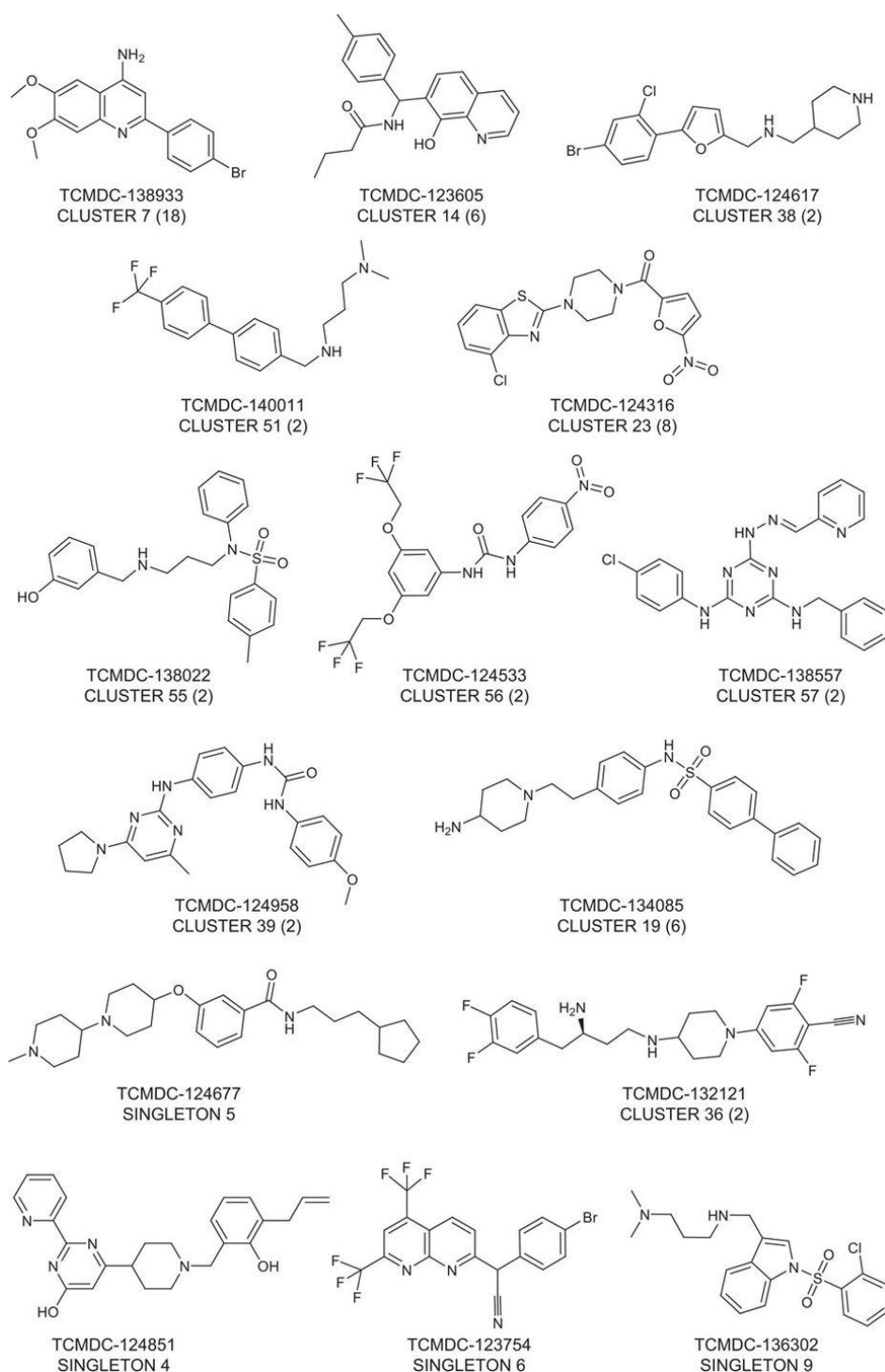
Cluster	Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) en gametocitos (PFGAA)	TOX <sub>50</sub> (μM) en células HepG2	*IC <sub>50</sub> estadios asexuales(μM)
2	TCMDC-134485	0,89	16,03	0,8
	TCMDC-134439	1,37	11,51	1,39
	TCMDC-134486	1,56	8,18	0,84
	TCMDC-134483	1,65	16,22	0,61
	TCMDC-134484	2,26	18,87	1,18
3	TCMDC-132809	0,47	14,79	0,44
	TCMDC-132865	1,41	16,43	1,12
	TCMDC-132870	1,53	14,29	1,15
	TCMDC-132813	2,16	18,09	0,72
4	TCMDC-141154	0,21	11,9	0,53
	TCMDC-141070	0,53	28,96	0,73
	TCMDC-140744	0,73	14,3	0,11
	TCMDC-140680	0,84	45,82	0,39
	TCMDC-140762	0,88	13,52	0,74
	TCMDC-140549	1,01	11,63	0,6
	TCMDC-141079	1,58	38,91	0,84
	TCMDC-140700	1,91	13,36	1
5	TCMDC-136191	1,03	7,42	0,78
	TCMDC-136152	1,7	10,96	0,83
6	TCMDC-138721	0,91	6,1	0,19
7	TCMDC-138933	0,76	4,95	0,17
	TCMDC-142207	1,22	12,17	0,17
8	TCMDC-140064	0,69	12,59	0,73
	TCMDC-140112	1,38	12,59	0,16
	TCMDC-140114	1,74	13,49	0,26
9	TCMDC-131564	0,72	4,28	0,24
10	TCMDC-132217	1,29	5,5	0,75
11	TCMDC-141698	0,44	4,79	0,67
13	TCMDC-124602	0,24	>100	0,66
	TCMDC-125247	0,49	89,13	0,26
	TCMDC-123993	0,73	32,3	0,66
14	TCMDC-123605	1,73	9,22	0,96
15	TCMDC-139810	0,86	4,03	0,45

**Tabla 4 (cont.).** Actividad de 90 compuestos frente a gametocitos V usando el ensayo PpFGAA y su toxicidad en células hepáticas de mamífero (HepG2 TOX<sub>50</sub>).

Cluster	Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) en gametocitos (PpFGAA)	TOX <sub>50</sub> (μM) en células HepG2	*IC <sub>50</sub> estadíos asexuales(μM)
18	TCMDC-124559	0,34	50,12	1,32
	TCMDC-125345	0,36	39,82	0,56
	TCMDC-125432	1,07	29,22	0,83
	TCMDC-123868	1,16	37,44	1,06
19	TCMDC-134085	0,75	7,17	1,02
	TCMDC-132219	2,63	5,13	0,32
20	TCMDC-134563	1,26	6,17	0,44
21	TCMDC-138394	1,91	12,05	0,28
23	TCMDC-124316	1,1	41,96	0,98
	TCMDC-124315	1,12	37,65	0,82
	TCMDC-125149	1,31	>100	0,97
	TCMDC-124311	1,44	25,79	0,32
	TCMDC-124787	2,12	28,85	0,75
24	TCMDC-136456	1,54	3,85	0,89
25	TCMDC-137820	1,06	<0,002	0,03
26	TCMDC-124263	0,24	NA	0,91
28	TCMDC-135052	0,74	4,79	0,74
29	TCMDC-135499	1,41	4,32	0,79
30	TCMDC-123767	0,16	>100	0,27
32	TCMDC-138493	0,82	3,98	0,23
34	TCMDC-140406	1,38	6,61	0,75
35	TCMDC-141611	0,87	4,9	0,86
36	TCMDC-132121	0,73	4,58	0,86
37	TCMDC-137801	1,46	>100	0,79
	TCMDC-123811	1,57	94,46	0,46
38	TCMDC-124617	0,72	4,37	1,51
	TCMDC-125237	1,87	10,6	0,75
39	TCMDC-124958	1,08	11,89	0,14
41	TCMDC-138667	0,62	5,96	0,14
	TCMDC-135229	3,14	21,43	0,87
43	TCMDC-135458	2,41	10,98	0,77
44	TCMDC-138237	1,58	14,13	0,65
45	TCMDC-137239	1,85	5,01	1,01
48	TCMDC-139548	1,09	3,09	0,51

**Tabla 4 (cont.).** Actividad de 90 compuestos frente a gametocitos V usando el ensayo PjFGAA y su toxicidad en células hepáticas de mamífero (HepG2 TOX<sub>50</sub>).

<i>Cluster</i>	Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) en gametocitos (PjFGAA)	TOX <sub>50</sub> (μM) en células HepG2	*IC <sub>50</sub> estadios asexuales(μM)
49	TCMDC-140699	0,9	4,79	0,31
50	TCMDC-139875	0,73	5,89	0,21
51	TCMDC-140011	1,68	4,9	0,87
52	TCMDC-140020	1,51	1,46	0,74
54	TCMDC-141444	1,98	5,19	1,22
55	TCMDC-138022	1,14	44,67	0,77
	TCMDC-125836	1,14	26,14	0,88
56	TCMDC-124533	1,16	6,24	0,47
57	TCMDC-138557	0,26	13,96	0,78
	TCMDC-138546	1,96	13,18	0,87
ST 61	TCMDC-123899	0,05	NA	0,31
ST 62	TCMDC-134292	0,66	11,89	0,84
ST 63	TCMDC-124940	0,69	3,99	0,51
ST 64	TCMDC-124851	0,72	21,14	1
ST 65	TCMDC-124677	0,94	>100	0,23
ST 68	TCMDC-123754	1,16	2,32	0,44
ST 71	TCMDC-136302	1,43	33,25	0,35
ST 72	TCMDC-136658	1,46	26,82	0,45
ST 78	TCMDC-138818	1,47	4,9	0,84
ST 80	TCMDC-138968	1,64	1,51	0,79
ST 83	TCMDC-139270	1,74	11,49	1,1
ST 84	TCMDC-140476	1,84	11,78	1,07
ST 88	TCMDC-142257	5,25	77,62	0,76



**Figura 22.** Estructura química de 15 compuestos TCAMS progresados para evaluar su perfil biológico. Estos compuestos forman parte de los 90 seleccionados para caracterizar en mayor detalle y se encuentran dentro un espacio físico-químico apropiado ( $\text{clogP} < 5$ ,  $n^\circ$  anillos aromáticos  $< 3$ ). Se indica entre paréntesis el número de compuestos de cada *cluster*. Fuente: Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

### **3. Caracterización del perfil biológico de 90 moléculas con actividad frente a gametocitos V y formas asexuales de *P. falciparum***

#### **3.1. Estudios *in vitro***

Las 90 moléculas representativas de la diversidad química identificada en el cribado del TCAMS con el ensayo PFGAA fueron estudiadas en mayor profundidad utilizando este mismo ensayo. Para llevar a cabo la caracterización, incorporamos ligeras modificaciones en el ensayo *in vitro* de tal manera que nos permitiese evaluar los siguientes parámetros: velocidad de acción de los compuestos y actividad frente al gameto femenino.

##### 3.1.1. Velocidad de acción

Con objeto de determinar la velocidad de acción de los compuestos, se introdujo la modificación del tiempo de incubación en el ensayo PFGAA, de forma que los gametocitos se incubaron durante 24h con los productos (en lugar de las 48h previamente empleadas en el cribado) y se determinó su valor de IC<sub>50</sub>. Posteriormente, los datos obtenidos en este estudio se compararon con aquellos obtenidos usando la incubación de 48h (Tabla 4, Tabla suplementaria 3).

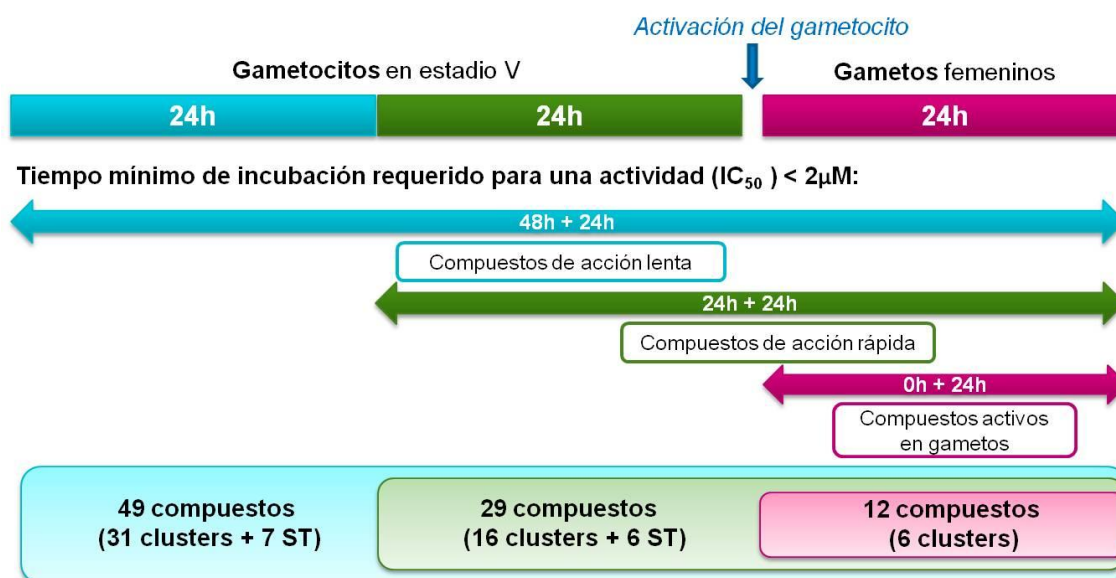
Se observó que 41 compuestos de los 90 ensayados tenían una actividad menor de 2 $\mu$ M tras solo 24h de incubación, por lo cual fueron denominados “de acción rápida”, mientras que los 49 compuestos restantes requerían de una incubación de 48h para mostrar dicha actividad y, en consecuencia, fueron denominados “de acción lenta” (Figura 23).

##### 3.1.2. Actividad frente al gameto femenino

Debido a las características del ensayo PFGAA, los compuestos están en contacto tanto con los gametocitos en estadio V como durante la formación y posterior activación de los gametos. Por lo tanto, ese formato de ensayo no permitía discernir en qué fase específica del parásito estaban actuando los compuestos identificados.

Con el fin de describir en mayor detalle si los compuestos eran activos frente a los gametocitos o los gametos femeninos, adaptamos el ensayo PFGAA introduciendo la modificación de incubar exclusivamente los compuestos una vez se hubiese completado la activación de los gametocitos (30 minutos) y por tanto estuvieran en fase de gameto femenino.

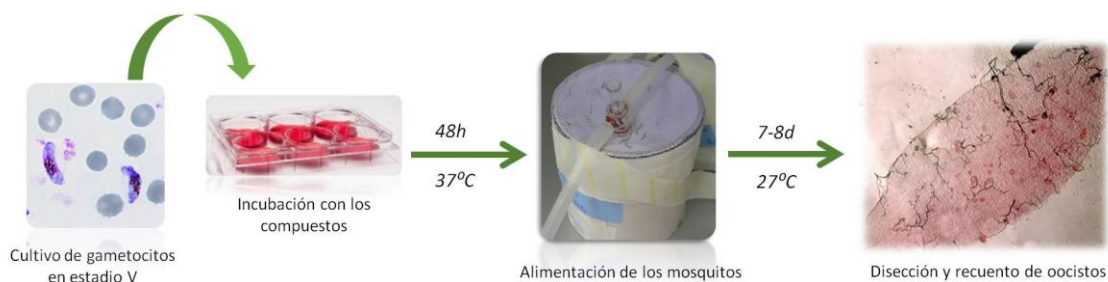
Bajo estas condiciones, se observó que 12 compuestos de los 90 ensayados impedían la expresión de la proteína Pfs25 sin necesidad de una incubación previa con los gametocitos (Figura 23). Esto sugiere que estas moléculas tienen como diana los gametos femeninos, aunque no excluye la posibilidad de que también sean activos frente a los gametocitos en estadio V.



**Figura 23.** Diversidad de perfiles biológicos que permite identificar el ensayo PFGAA. Los gametocitos V se incubaron con los compuestos durante 24 o 48h para determinar la velocidad de acción de su actividad inhibitoria. La evaluación de la actividad directa sobre el gameto se consiguió añadiendo los productos después de activar los gametocitos. Se muestra el número de compuestos y la diversidad química encontrada en cada categoría (*clusters* y *singletons*, ST). Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

### 3.2. Estudios *ex vivo* en el mosquito

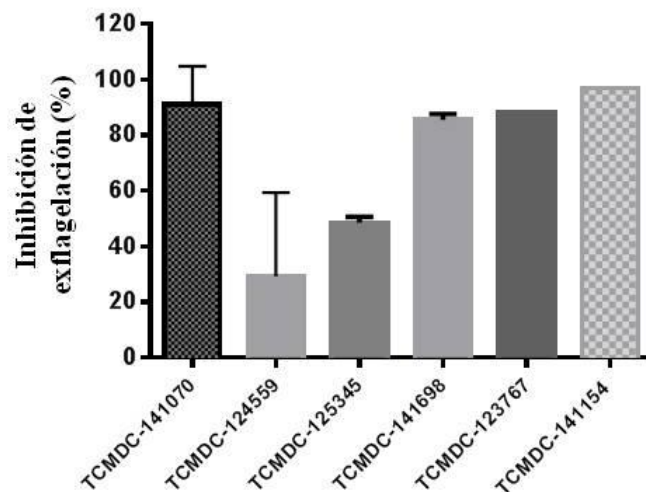
Con objeto de validar la capacidad de las moléculas identificadas para bloquear la transmisión de la malaria, y evaluar el valor de predicción del ensayo P<sub>f</sub>FGAA como sustituto *in vitro* de los ensayos con mosquitos, se llevó a cabo el ensayo de referencia SMFA (Figura 24).



**Figura 24.** Diagrama del protocolo empleado en el SMFA.

Este ensayo *ex vivo* requiere de la utilización de un elevado número de mosquitos que posteriormente son diseccionados manualmente, lo cual limita el número de compuestos a ensayar. En consecuencia, seleccionamos seis moléculas de gran potencia en el P<sub>f</sub>FGAA para evaluar en el SMFA, las cuales poseían perfiles biológicos diversos y pertenecían a grupos químicos diferentes (Tabla 5).

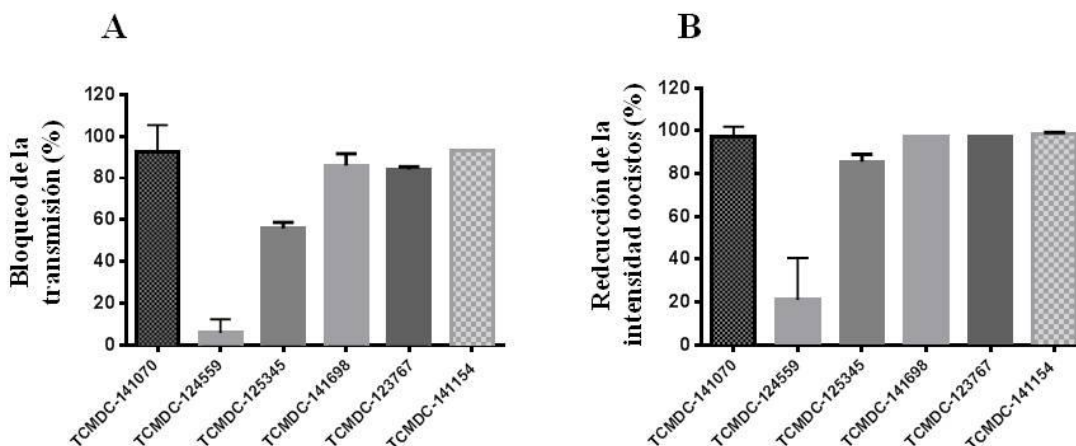
Previamente a la realización del ensayo en el mosquito, se llevó a cabo un ensayo de exflagelación con los seis compuestos para determinar su capacidad para inhibir la formación del gameto masculino. La concentración de los compuestos empleada en este ensayo fue la equivalente a la IC<sub>90</sub> (μM) de los compuestos en el ensayo P<sub>f</sub>FGAA, que sería la misma concentración a utilizar en el SMFA. Tras 48h de incubación con los gametocitos en estadio V, se observó que cinco de los seis compuestos inhibían el proceso de exflagelación por encima del 50%, mientras que el compuesto TCMDC-124559 lo inhibía en torno al 30% (Figura 25, Tabla 5).



**Figura 25.** Efecto de los compuestos TCAMS sobre el proceso exflagelación de los gametocitos masculinos. Los cultivos de gametocitos se incubaron durante 48h con los compuestos (TCMDC-141070 a 2  $\mu$ M, y a 1  $\mu$ M los cinco restantes). El porcentaje de inhibición se determinó por comparativa con los controles tratados con DMSO. Cada barra en el diagrama representa la media  $\pm$  la desviación estándar (DE). Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

De igual forma, en el SMFA se utilizó para cada compuesto la concentración equivalente a su IC<sub>90</sub> ( $\mu$ M) en el PFGAA en el formato de 48h de incubación. Los compuestos se ensayaron por duplicado en al menos 2 experimentos independientes. El formato de ensayo utilizado fue el método indirecto, es decir, los gametocitos en estadio V se incubaron con los compuestos durante 48h antes de realizar con ellos la alimentación de los mosquitos, siendo así un método equivalente a lo realizado en el ensayo PFGAA. Los parámetros evaluados en el SMFA, que permiten determinar la capacidad de bloqueo de la transmisión de los compuestos, son: (1) la intensidad o número de oocistos en cada mosquito y (2) la prevalencia de estos oocistos en todos los mosquitos sujetos al experimento o número de mosquitos infectados.

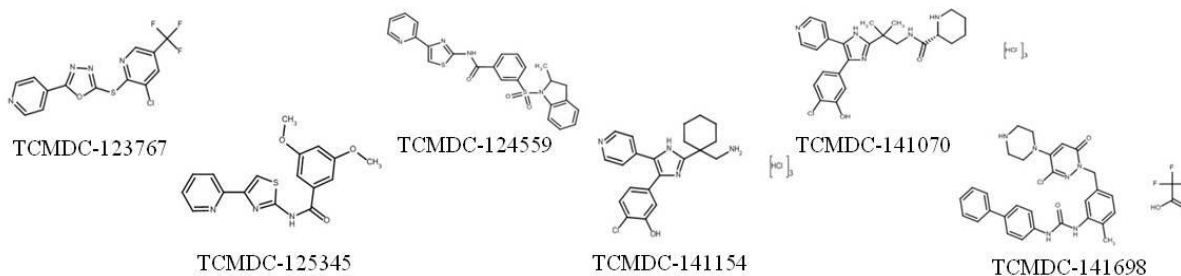
Como resultado de este análisis, se obtuvo que cinco de las seis moléculas reducían la prevalencia de oocistos entre 58 y 100% (Figura 26A) y una reducía la intensidad de oocistos por encima del 80% (Figura 26B). Por el contrario, el compuesto TCMDC-124559, que anteriormente había mostrado inhibir la exflagelación en torno a un 30%, produjo una reducción de la prevalencia e intensidad de oocistos por debajo del 20% (Figuras 26A y 26B, respectivamente).



**Figura 26.** Efecto de los compuestos TCAMS en el ensayo SMFA. Se evaluaron: **A)** el porcentaje de bloqueo de la transmisión (inverso de la prevalencia de la infección) y **B)** la reducción de la intensidad media de oocistos. Cada barra representa la media del valor de dos (TCMDC-125345, TCMDC-141698, TCMDC-123767, TCMDC-141154) o tres (TCMDC-141070, TCMDC-124559) réplicas independientes  $\pm$  la desviación estándar (DE). Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

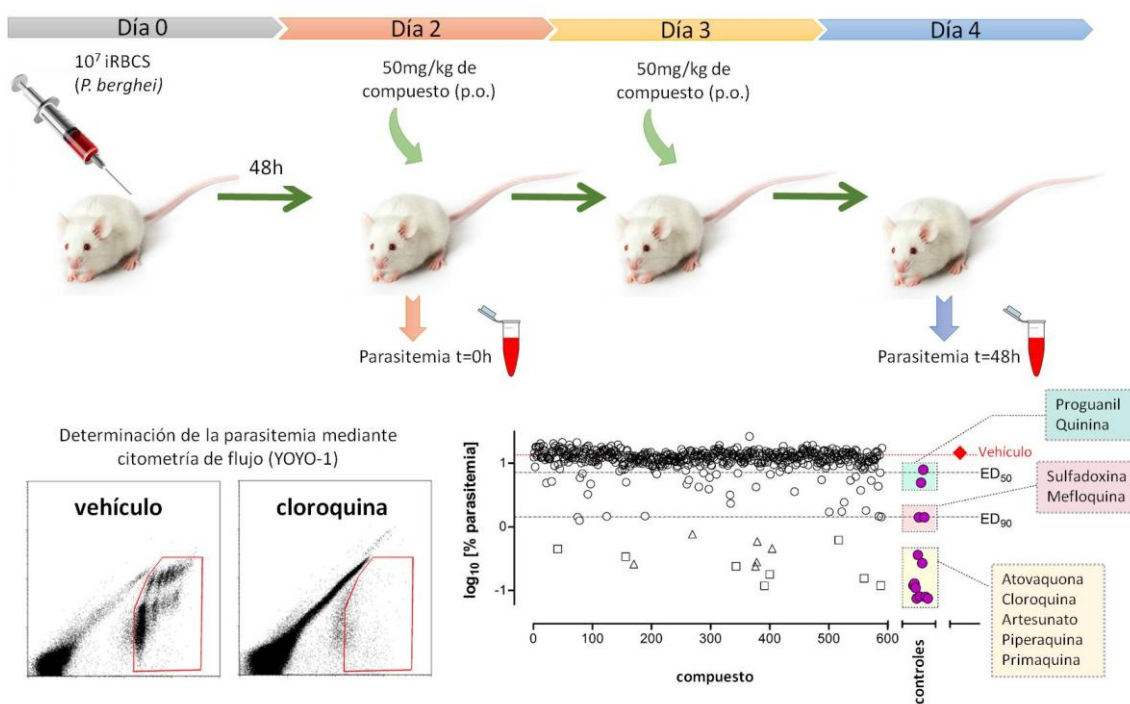
**Tabla 5.** Perfil biológico y químico de los seis compuestos de TCAMS ensayados en el SMFA. Modificado de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

Compuesto	Cluster	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos PFGAA	Concentración en el SMFA (μM)	Inhibición de exflagelación (%)	Bloqueo de la transmisión (%)	Tox <sub>50</sub> (μM)	Perfil biológico
TCMDC-123767	30	0,16	1	88	83	>100	lento
TCMDC-125345	18	0,36	1	50	60	39,82	rápido
TCMDC-141698	11	0,44	1	84	82	4,79	gameto
TCMDC-141070	4	0,53	2	99	88	28,96	gameto
TCMDC-141154	4	0,21	1	97	93	11,9	gameto
TCMDC-124559	18	0,5	1	30	15	>100	rápido



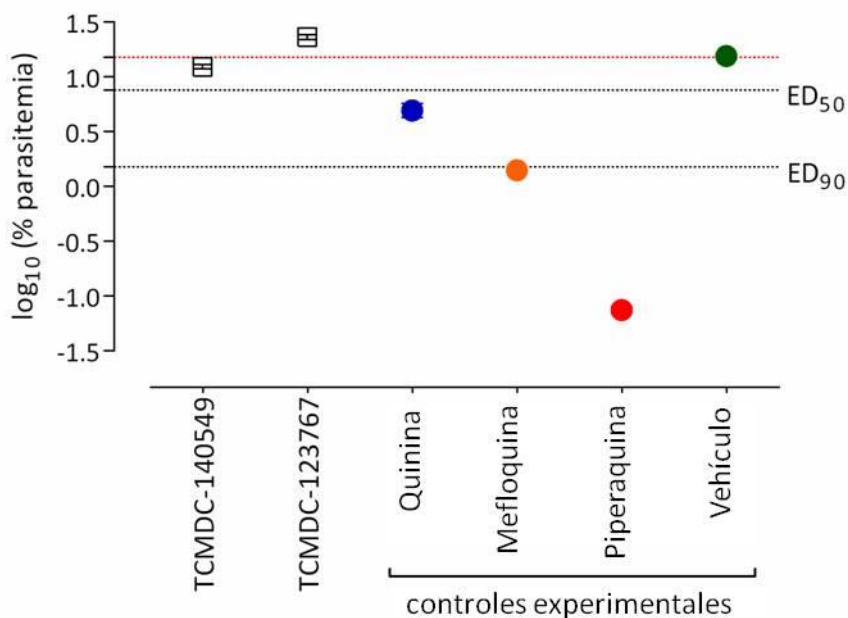
### 3.3. Estudios *in vivo* en un modelo de ratón

Con objeto de evaluar la eficacia *in vivo* de las moléculas que habían demostrado tener capacidad para bloquear la transmisión de la malaria en el mosquito, se seleccionaron dos compuestos para ensayar en el modelo murino de *Plasmodium berghei*<sup>107</sup> (Figura 27). Estas dos moléculas fueron: TCMDC-123767, perteneciente al *cluster* 30, y TCMDC-141154, perteneciente al *cluster* 4. La selección de estas moléculas no solo se basó en su actividad bloqueando la transmisión en el SMFA, sino en su potente actividad frente a los estadios asexuales eritrocíticos y gametocitos en estadio V en el PFGAA (Tablas 4 y 5, respectivamente).



**Figura 27.** Diagrama del ensayo de eficacia terapéutica en ratones infectados con *P. berghei*. Los ratones CD-1 son inoculados con 10<sup>7</sup> eritrocitos infectados (iRBCS) en el día 0. En los días 2 y 3, se les administran 50mg/kg del compuesto por vía oral (p.o.). La parasitemia se determina a tiempo (t) 0h y 48h, y se evalúa mediante citometría de flujo con tinción YOYO-1<sup>107</sup>. En el experimento se incluyen controles con diferente actividad (dosis efectiva, ED) frente al parásito, lo cual facilita la posterior clasificación del compuesto evaluado.

Debido a la falta de disponibilidad de una cantidad suficiente del compuesto TCMDC-141154 para llevar a cabo en ensayo con ratones, este producto tuvo que ser sustituido por su análogo del *cluster* 4: TCMDC-140549 (Tabla suplementaria 3). Los compuestos se ensayaron en ratones CD-1 a una concentración de 50mg/kg en un tratamiento monodosis de 2 días, y la eficacia de los mismos se determinó en base a una reducción del porcentaje de formas asexuales eritrocíticas mayor del 40% comparado con lo obtenido en el grupo de ratones control tratados con el vehículo. A pesar de la potente actividad de estos compuestos en el ensayo *in vitro* de formas asexuales, el crecimiento de *P. berghei* en el modelo murino no se vio reducido por debajo del valor umbral con ninguno de los compuestos (Figura 28).



**Figura 28.** Efecto de los dos compuestos TCAMS seleccionados que fueron ensayados en el modelo *in vivo* de ratón de *P. berghei*. Cada experimento incluyó un grupo control tratado con vehículo (círculo verde) como referencia para el cálculo del porcentaje de inhibición de parasitemia en sangre periférica (línea punteada roja). Se incluye la respuesta a antimaláricos comerciales incluidos como controles (círculos azul, naranja y rojo). Se muestra la media  $\pm$  el error estándar de la media. ED indica la dosis efectiva. Modificada de Miguel-Blanco *et al.* 2017 <sup>96</sup>.

Adicionalmente, se llevaron a cabo una serie de estudios farmacocinéticos *in vivo* y de ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) *in vitro* con el fin de esclarecer los motivos de la falta de actividad de estos dos compuestos *in vivo*.

Por un lado, los resultados del estudio farmacocinético en ratón mostraron que el compuesto TCMDC-123767 era eliminado rápidamente de la sangre, encontrándose su último valor detectable por encima del límite mínimo de cuantificación (2,5ng/ml) tan solo 1h después de ser administrado. Un estudio posterior de aclaramiento hepático *in vitro* apoyó las observaciones obtenidas en el estudio *in vivo*, ya que el compuesto TCMDC-123767 presentó valores elevados de aclaramiento intrínseco en microsomas de ratón (7,9 mL/min/g hígado). Por otro lado, el compuesto TCMDC-140549 se ensayó en un test de permeabilidad a través de membranas artificiales, mostrando valores de permeabilidad moderada (170nm/s).

En consecuencia, los resultados derivados de estos estudios podrían explicar que la falta de eficacia de los dos compuestos ensayados en el modelo de ratón no se deba a una falta de actividad de los compuestos sobre el parásito, si no a que su biodisponibilidad no es adecuada para permitir que los mismos lleven a cabo su actividad *in vivo*.

# Discusión

---



## 1. Importancia del desarrollo de nuevos métodos de identificación de compuestos bloqueantes de la transmisión

La malaria continúa siendo hoy en día un grave problema de salud pública a nivel mundial que afecta a más de 200 millones de personas cada año en África, Sudamérica y el sudeste Asiático. A pesar del sustancial incremento en las medidas de control de la enfermedad en países endémicos durante los últimos 10 años, su eliminación y final erradicación requieren de la implementación de nuevas estrategias tanto a nivel farmacológico como de control del vector. Este objetivo está fuertemente apoyado por la OMS así como por las instituciones que financian la investigación de enfermedades de países en desarrollo <sup>63,111</sup> y diversas iniciativas como *Roll Back Malaria*, *Malaria Eradication Research Agenda* (malERA) y *Malaria Eradication Scientific Alliance* (MESA). Recientemente se ha establecido una estrategia técnica global hasta el año 2030 que tiene como objetivos: (1) reducir la incidencia de casos de malaria al menos el 90%, (2) reducir la tasa de mortalidad de malaria un 90%, (3) eliminar la malaria en al menos 35 países, y (4) prevenir la aparición de nuevos casos en áreas libres de malaria <sup>112</sup>. Sin embargo, la reciente aparición de resistencias frente a los insecticidas que impregnan las redes antimosquitos así como frente a los fármacos antimaláricos de primera línea - las artemisininas – suponen un gran reto para alcanzar estos objetivos y ponen de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar e implementar métodos de profilaxis y tratamientos alternativos.

Dentro de este contexto, el presente trabajo de Tesis se ha centrado en el descubrimiento de nuevas moléculas (potenciales fármacos) que, además de controlar la enfermedad, impidan la transmisión del parásito. Este punto es crucial para la eliminación y erradicación de la malaria ya que, aunque la sintomatología clínica puede paliarse mediante la eliminación de los estadios asexuales intraeritrocíticos, el aclaramiento de los gametocitos es vital para impedir la propagación del parásito en áreas endémicas. El desarrollo de nuevos fármacos con actividad frente a estos gametocitos contribuiría tanto a mejorar el control como a reducir la transmisión, consiguiendo en último término la erradicación de la malaria. Dado que solo existe un fármaco con tal capacidad – la primaquina – y su uso está

restringido a una parte de la población, el desarrollo de antimaláricos frente a los gametocitos constituye un objetivo tan necesario como urgente.

Durante la última década, los ensayos de alto rendimiento han sido empleados con éxito para el cribado de millones de compuestos frente a las formas asexuales eritrocíticas de *P. falciparum*<sup>76-78</sup>. Estos cribados fenotípicos han identificado nuevas y potentes moléculas, algunas de las cuales se encuentran actualmente en fases de desarrollo clínico, como son el KAE609<sup>113</sup> y el OZ439<sup>114</sup>. Para alcanzar el objetivo de la erradicación de la malaria propuesto por la comunidad científica, una buena estrategia sería aplicar la misma aproximación a los estadios del parásito responsables de la transmisión, los gametocitos en estadio V. Sin embargo, este tipo de cribados conlleva una serie de dificultades implícitas en el trabajo *in vitro* con gametocitos: (1) su producción y manejo posterior requiere de un estricto mantenimiento de la temperatura a 37°C, (2) las formas más maduras - los estadios V- tardan al menos 12 días en aparecer en el cultivo, (3) el porcentaje de eritrocitos infectados con gametocitos en estadio V suele oscilar entre el 1-3% del total de eritrocitos del cultivo, (4) los gametocitos son metabólicamente “inactivos” ya que no digieren hemoglobina ni replican su ADN. Por todos estos motivos, el cribado de alto rendimiento con gametocitos, a pesar de ser una buena estrategia para maximizar las posibilidades de descubrir nuevos compuestos, ha supuesto un gran reto para los investigadores.

Los ensayos con gametocitos que se desarrollaron inicialmente eran capaces de determinar la muerte del parásito o su inhibición metabólica<sup>83,85-87</sup>, pero carecían de la habilidad para medir el efecto de aquellas moléculas que provocan una muerte celular lenta o que inhiben el desarrollo de los estadios posteriores en el mosquito. Dado que la formación de los gametos requiere de la activación de varias cascadas de transcripción iniciadas en el gametocito en estadio V, éstas también constituyen importantes dianas para conseguir bloquear la transmisión del parásito al mosquito. Con el ensayo desarrollado en este trabajo de Tesis, que utiliza la formación del gameto femenino como parámetro final de medida del ensayo, se incrementa, por tanto, el número de dianas moleculares que potencialmente podrían suponer un daño irreversible en el parásito e impedir con ello que continúe su ciclo de vida.

Los gametocitos son sexualmente dimórficos y, dado que tanto el gametocito masculino como el femenino son necesarios para la formación del cigoto, la eliminación de solo uno de ellos producirá una interrupción de la transmisión del parásito al bloquear su ciclo de vida en el mosquito. La detección de la formación del gameto femenino es, hasta la fecha, relativamente más sencilla que la del masculino, ya que la primera puede realizarse de forma consistente por microscopía de fluorescencia (con un anticuerpo altamente específico: anti-Pfs25), mientras que la segunda requiere la medición de un proceso extremadamente sensible que es dependiente del tiempo y la temperatura. En consecuencia, se consideró más apropiado proceder con el escalado del ensayo de activación del gametocito femenino (*Pf*FGAA), inicialmente desarrollado por Delves y colaboradores<sup>91</sup>, a un formato de alto rendimiento que permitiese, en último término, el cribado de la colección TCAMS para identificar moléculas con actividad antimalárica dual.

El escalado del ensayo *Pf*FGAA a un formato de alto rendimiento requirió en primer lugar el escalado de la producción de gametocitos en estadio V, lo cual conseguimos mediante la optimización de las condiciones del cultivo en botellas de gran volumen. Por otro lado, la introducción de un paso de enriquecimiento de los gametocitos (mediante un gradiente de densidad) permitió disminuir la señal de fondo producida por los eritrocitos del cultivo y, con ello, aumentar la relación señal/ruido del ensayo, mejorando la sensibilidad del mismo. También se mejoró el sistema de detección y análisis de imagen mediante la utilización del equipo Opera, así como el diseño de un algoritmo de análisis específico para discriminar los gametos femeninos viables mediante parámetros tales como la intensidad de la fluorescencia, la redondez y el tamaño de estos gametos<sup>95</sup>. En consecuencia, conseguimos un ensayo más sensible y robusto adaptado en formato de alto rendimiento.

De esta forma, y en base a los valores obtenidos en parámetros de calidad tales como el factor  $Z'$ , la linealidad, la relación señal/ruido y la relación señal/fondo (Figura 18), se aseguraron tanto la reproducibilidad como la fiabilidad de este nuevo ensayo para llevar a cabo cribados de extensas colecciones de compuestos .

## 2. Actividad de los antimaláricos comerciales frente a la formación del gameto femenino

Numerosos estudios previos han reportado la falta de actividad de los antimaláricos comerciales, principalmente esquizonticidas, frente a los gametocitos maduros<sup>91,92,94,115,116</sup>. Por consiguiente, consideramos que la mejor forma de validar el formato de alto rendimiento del ensayo *PfFGAA* pasaría por evaluar un panel de fármacos antimaláricos y determinar su actividad frente a la formación de los gametos femeninos. El set seleccionado fue MMV50 ya que contenía compuestos con una gran diversidad tanto química como de mecanismos de acción, entre los cuales se encontraban antimicrobianos, 4-aminoquinolinas, 8-aminoquinolinas, aminoalcoholes y derivados de la artemisinina, entre otros.

La evaluación del set de compuestos MMV50 permitió la identificación de cinco compuestos con actividades submicromolares frente a la formación del gameto femenino de *P. falciparum*. Estos resultados correlacionaron con los obtenidos previamente en ensayos con gametocitos maduros<sup>89,91,92,94</sup>. Los compuestos que mostraron una mayor actividad en nuestro ensayo fueron: el tioestreptón, la pironaridina, algunos endoperóxidos y el azul de metileno (Tabla 3).

### 2.1. Antimicrobianos

Los antimicrobianos inhiben la síntesis de proteínas mediante su unión a la subunidad ribosomal del apicoplasto de *Plasmodium*, lo cual produce una muerte lenta del parásito. Por ello, las tetraciclinas, como la doxiciclina, y los macrólidos, como la azitromicina, se administran siempre en combinación con otros antimaláricos de acción rápida. En general, los antimicrobianos son conocidos por su actividad esquizonticida, estando las fases sexuales del parásito fuera de su rango de actividad. Sin embargo, se ha visto que el tiopéptido tioestreptón ejerce su actividad principal frente a los gametocitos. Esto se debe a que no solo interfiere con la síntesis de proteínas mediante su unión a ribosomas del apicoplasto de *Plasmodium*, sino que además actúa a nivel del proteasoma del parásito, produciendo una acumulación de proteínas ubiquitinizadas que conducen a una rápida muerte del mismo<sup>117</sup>. Aunque

su actividad frente a las formas asexuales *in vitro* es moderada ( $IC_{50} = 8,9\mu M$ )<sup>117</sup>, se ha descrito que es altamente efectivo frente a los gametocitos maduros ( $IC_{50} = 0,56\mu M$ )<sup>85</sup> y además inhibe la formación de los gametos masculinos ( $IC_{50} = 0,96\mu M$ )<sup>91</sup> y femeninos (Tabla 3,  $IC_{50} = 0,12\mu M$ ). A pesar de su claro potencial como antimalárico frente a múltiples estadios del parásito (esquizontocida, gametocitocida y esporontocida), el uso del tioestreptón está restringido al ámbito veterinario y no se emplea en clínica debido a su baja solubilidad en agua y su baja biodisponibilidad<sup>118</sup>.

## 2.2. 4-aminoquinolinas y aminoalcoholes

La 4-aminoquinolina pironaridina es un inhibidor de la topoisomerasa II de *Plasmodium* que se está probando actualmente, como TCA, en ensayos clínicos en fase II y III en combinación con artesunato para tratar la malaria producida por *P. falciparum* y *P. vivax*<sup>119-121</sup>. Se trata de un antimalárico con actividad frente a los estadios hepáticos y eritrocíticos, así como frente a los estadios desarrollados en el mosquito. La actividad gametocitocida de la pironaridina *in vitro* ha sido descrita previamente ( $IC_{50} = 2-60nM$  en gametocitos II-III<sup>122</sup>) aunque ensayos más recientes han revelado que su actividad frente a gametocitos maduros (IV-V) no es tan potente como frente a los estadios jóvenes, mostrando valores de  $IC_{50} = 4,26\mu M$ <sup>85</sup> y  $3,25\mu M$ <sup>83</sup>. Esto podría explicarse por el papel fundamental de la topoisomerasa en la transcripción, replicación y reparación del ADN, ya que los gametocitos maduros se encuentran en estado quiescente. La pironaridina también inhibe la exflagelación así como la formación de los ooquistos de *P. falciparum*<sup>72</sup>. Estos resultados correlacionan positivamente con nuestros hallazgos sobre la actividad de la pironaridina frente a la activación del gametocito femenino ( $IC_{50} = 1,57\mu M$ ).

Al contrario que la pironaridina, otras 4-aminoquinolinas, como la cloroquina y la piperquina, y los aminoalcoholes, como la halofantrina y la quinina, son esquizontocidas que carecen de actividad frente a las formas sexuales de *Plasmodium*. Esto se debe al modo de acción de estos antimaláricos que, a través de la inhibición de la polimerización del grupo hemo que permite su transformación en hemozoína, conducen a la acumulación de productos tóxicos en el interior del parásito<sup>64,123</sup>. Dado que los gametocitos no llevan a cabo la digestión de la

hemoglobina del eritrocito, este tipo de fármacos no tienen actividad sobre los mismos. En consecuencia, la evaluación de diversas 4-aminoquinolinas, así como la de aminoalcoholes, en el ensayo *PfFGAA* mostró valores de actividad similares a los descritos en la bibliografía para estos compuestos<sup>83,87,91,92</sup>.

### 2.3. Azul de metileno

El azul de metileno fue el primer compuesto sintético en ser utilizado como fármaco. Su uso principal en clínica es para tratar la metahemoglobinemia, ya que la forma reducida del azul de metileno actúa como donante de electrones para revertir la oxidación del grupo hemo. Por otro lado, es un potente antimalárico frente a diferentes estadios del parásito, pero su modo de acción frente a *Plasmodium* no ha sido dilucidado por completo. Se ha descrito que previene la digestión de la hemoglobina, interfiriendo con ello en el proceso de detoxificación del grupo hemo en el parásito<sup>124</sup>, de forma similar a la cloroquina pero mediante una ruta diferente ya que no se ha observado resistencia cruzada<sup>125</sup>. También se ha descrito que podría actuar sobre la glutatión reductasa de *Plasmodium*<sup>126</sup>, aunque estudios más recientes señalan que ésta podría no ser una de sus principales dianas<sup>127</sup>. Aunque dejó de emplearse como antimalárico poco después de su descubrimiento debido a la aparición de la cloroquina (más eficiente frente al parásito), durante la última década se han retomado los ensayos clínicos combinados con azul de metileno. Se ha visto que éste acelera la eliminación de los estadios asexuales así como la de los gametocitos cuando se emplea en combinación con endoperóxidos<sup>128,129</sup>.

Numerosos estudios han caracterizado al azul de metileno como un potente inhibidor de gametocitos jóvenes y maduros *in vitro*, aunque los valores de actividad reportados son algo variables, probablemente debido a las diferentes condiciones experimentales empleadas en cada ensayo<sup>83,85,87,92,116,123</sup>. Dado que los gametocitos no digieren la hemoglobina, es poco probable que el azul de metileno actúe sobre ellos a través de su interferencia en la formación de hemozoína. Parece más probable que el mecanismo de acción de este fármaco en los estadios sexuales venga condicionado por las reacciones de óxido-reducción que genera su entrada en el eritrocito. Cuando el azul de metileno entra en el eritrocito se reduce a leuco-azul de metileno mediante la acción de enzimas reductasas que, utilizando el cofactor

NADPH, terminan liberando NADP<sup>+</sup>. La oxidación del leuco-azul de metileno se produce de forma espontánea y genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, junto al NADP<sup>+</sup>, son responsables de generar estrés oxidativo en el eritrocito y el parásito <sup>126</sup>.

En consecuencia, podríamos deducir que la diferencia observada entre la actividad del azul de metileno en el ensayo *Pf*FGAA en los formatos de bajo y alto rendimiento se debería a cómo el daño oxidativo generado por el fármaco se ve modificado en función de la densidad de eritrocitos. Hemos observado una concentración baja de eritrocitos en el ensayo (*Pf*FGAA en alto rendimiento) se traduce en una baja actividad del azul de metileno sobre el parásito, la cual puede ser incrementada al aumentar el tiempo de exposición al compuesto. Según nuestra hipótesis, la presencia de un mayor número de eritrocitos haría que la reducción del azul de metileno se llevase a cabo de forma más eficiente, generando con ello un daño oxidativo sobre el parásito más rápidamente que en los cultivos con menor densidad celular. Apoyando nuestras observaciones, un estudio ha destacado recientemente la importancia del metabolismo de óxido-reducción en los gametocitos en estadio V y el papel crucial de la NADPH para mantener su viabilidad <sup>130</sup>.

#### **2.4. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos**

Los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos son potentes esquizonticidas tanto a nivel hepático como eritrocítico. Por un lado, el proguanil y la pirimetamina inhiben la enzima dihidrofolato reductasa, bloqueando con ello la biosíntesis de purinas y pirimidinas, que a su vez son esenciales para la síntesis de ADN. La combinación de la pirimetamina con sulfadoxina se emplea en el tratamiento de la malaria no complicada de *P. falciparum* (en combinación con artesunato) ya que ambas tienen una acción sinérgica en el bloqueo de la división celular del parásito. Por otro lado, la atovaquona interfiere con la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, en concreto el citocromo bc1, produciendo una disrupción del potencial de membrana que interrumpe la síntesis de ATP y pirimidinas. La combinación de atovaquona y proguanil es efectiva para profilaxis y tratamiento de la malaria no complicada de *P. falciparum*.

Dado que el proceso de formación del gameto femenino no involucra procesos de replicación de ADN ni división celular, los resultados obtenidos en nuestro ensayo para los compuestos inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos se encontraban dentro de lo esperado. Por el contrario, este tipo de antimaláricos son altamente efectivos frente a la formación del gameto masculino<sup>91,92</sup> ya que ésta requiere que, durante el proceso de exflagelación, se lleven a cabo tres rondas de replicación para generar los ocho microgametos masculinos.

### 2.5. Artemisinina y sus derivados

Las terapias combinadas con artemisinina (TCAs) constituyen hoy en día el tratamiento de primera línea para tratar los casos de malaria no complicada producida por *P. falciparum*<sup>131,132</sup>. Los endoperóxidos, como la artemisinina y sus derivados, contienen en su estructura un puente endoperóxido que se rompe a través de un mecanismo dependiente de hierro. Esto resulta en la generación de radicales libres que alquilan una gran diversidad de proteínas y conducen, en último término, a la muerte del parásito. Tanto la artemisinina como sus derivados son metabolizados a dihidroartemisinina, tienen una vida media de 45min y sus efectos se observan en menos de 12h, constituyendo por ello los antimaláricos disponibles de acción más rápida. Sin embargo, a pesar de la reducida posibilidad de generar resistencias, su uso en monoterapia está contraindicado porque se asocia con altas incidencias de fallo terapéutico.

Los endoperóxidos han demostrado tener una potente actividad antimalárica frente a las formas asexuales eritrocíticas<sup>123</sup> y los gametocitos jóvenes<sup>133</sup>, pero se ha descrito un escaso efecto frente a los gametocitos en estadio IV-V *in vitro*<sup>83,134</sup>. Por otro lado, se ha observado que los endoperóxidos son efectivos fármacos gametocidas, ya que provocan una potente inhibición de la exflagelación de los gametos masculinos (80% a 1µM)<sup>91</sup> y algunos también bloquean la formación del gameto femenino a concentraciones submicromolares (Tabla 3). Sin embargo, la actividad real de bloqueo de la transmisión de las TCAs en clínica sigue siendo algo controvertida, ya que solo algunos ensayos clínicos han reportado una actividad moderada en los ensayos con mosquitos<sup>135-137</sup>. Recientemente se ha visto que algunas TCAs son más efectivas que otras en la eliminación de los gametocitos de los pacientes infectados

de malaria tras el tratamiento <sup>63</sup>. Sin embargo, la falta de una herramienta de medida eficaz para determinar la infectividad de estos gametocitos en el mosquito, como por ejemplo el *direct feeding assay*, hace que estos estudios no sean del todo concluyentes respecto a la capacidad de bloqueo de la transmisión de las artemisininas <sup>138</sup>.

## 2.6. 8-Aminoquinolinas

La propuesta actual de tratamiento que aconseja la OMS para eliminar tanto las formas asexuales eritrocíticas como los gametocitos consiste en la administración de TCAs combinado con bajas dosis de primaquina (0,25mg/kg) <sup>139-141</sup>. La 8-aminoquinolina primaquina es el único fármaco con actividad frente a los gametocitos maduros de todas las especies de *Plasmodium* cuyo empleo en clínica ha sido aprobado <sup>139</sup>. También es efectiva frente a las formas durmientes o hipnozoítos de *P.vivax* y *P.ovale*, por lo que produce una cura radical y previene las recidivas <sup>98</sup>. Por el contrario, tiene una actividad insignificante frente a las formas asexuales eritrocíticas del parásito <sup>139,141,142</sup>, por lo que siempre se administra conjuntamente con un esquizotocida.

La actividad de la primaquina sobre los gametocitos no puede ser determinada *in vitro* ya que ésta depende de la metabolización del fármaco en el hígado, generando los metabolitos activos responsables de generar el daño oxidativo en el parásito <sup>143</sup>. En consecuencia, la evaluación de la primaquina tanto en nuestro ensayo así como en los anteriormente desarrollados, mostró valores de IC<sub>50</sub> superiores a 10µM <sup>72,83,85,91,94</sup>. Se ha descrito que el modo de acción de la primaquina viene mediado por la generación de especies reactivas de oxígeno y metabolitos hidroxilados, preferentemente a través del citocromo P450 2D6 <sup>144</sup>, pero el metabolito activo sigue siendo desconocido.

La 8-aminoquinolina tafenoquina, que está siendo desarrollada a través de una colaboración entre GSK y la MMV, se encuentra actualmente en fase clínica III. Al igual que la primaquina, también es un profármaco que necesita ser metabolizado en el hígado y sus metabolitos activos producen especies reactivas de oxígeno que conducen en último término a la muerte del parásito. Por este motivo, los resultados

obtenidos en nuestro ensayo *in vitro* ( $IC_{50}= 7\mu M$ ) estaban dentro de lo esperado para este compuesto. Sin embargo, la tafenoquina presenta dos ventajas frente a la primaquina: (1) la inhibición de la actividad de la polimerasa del hemo en los estadios asexuales eritrocíticos, (2) tiene una vida media mucho más larga (14 días frente a las 6h de la primaquina), lo cual permite su administración como dosis única y con ello disminuir el riesgo de anemia hemolítica en los individuos con deficiencia de G6PD<sup>12</sup>.

### **3. Identificación y caracterización de moléculas con actividad dual en la colección TCAMS**

Una vez concluida la evaluación de los antimaláricos comerciales en el ensayo *PfFGAA* y comprobado el reducido número de los mismos con efecto inhibitorio sobre la formación del gameto femenino, el siguiente paso fue llevar a cabo el cribado de una colección de 13.533 compuestos conocida como TCAMS. Dado que nuestro principal interés consistía en la identificación de moléculas con actividad dual (frente a las formas asexuales y sexuales), decidimos optar por el cribado de la colección TCAMS por su conocida actividad frente a las formas asexuales eritrocíticas de *P. falciparum*<sup>78</sup>.

Previamente a la realización del cribado, llevamos a cabo un test de robustez de nuestro ensayo empleando para ello un reducido grupo de compuestos del TCAMS seleccionados aleatoriamente. Por un lado, este test corroboró la fiabilidad de nuestro ensayo para realizar campañas de cribado de compuestos y, por otro lado, sirvió para determinar las condiciones óptimas de tiempo de incubación y concentración de producto que se emplearían en el cribado de la colección completa. Basados en los resultados obtenidos en este test de robustez, se estimó que el número de compuestos activos que se obtendría en el cribado del TCAMS sería mayor que el habitual en este tipo de campañas (9 y 1%, respectivamente). Esto se debía, fundamentalmente, al hecho de que todas las moléculas de la colección eran activas frente ciertos estadios del parásito, incrementando con ello las posibilidades de encontrar moléculas que afectasen a otras fases del mismo.

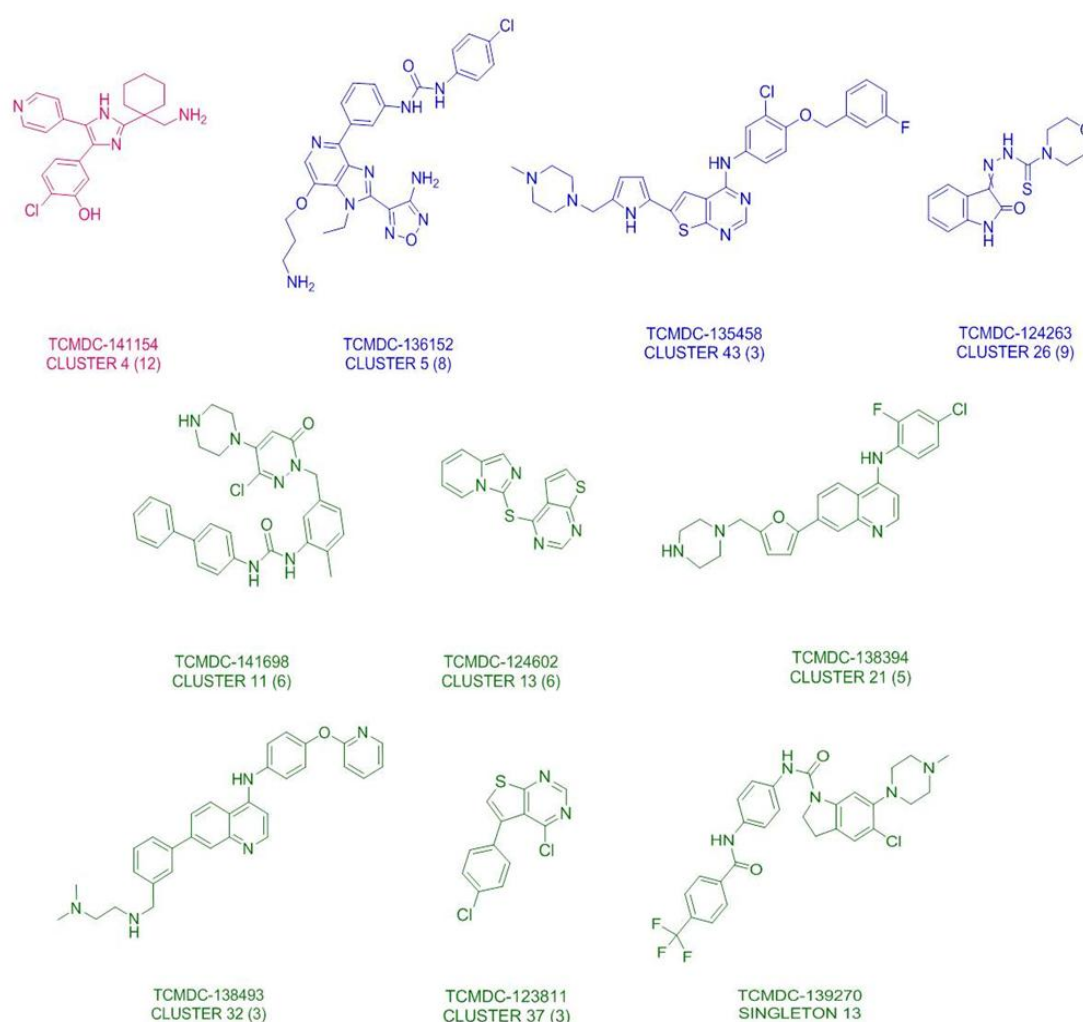
Dado que el número de compuestos activos estimado empleando la concentración  $2\mu\text{M}$  era suficientemente elevado, y dado que el uso de concentraciones mayores de compuesto incrementaba las posibilidades de seleccionar compuestos tóxicos, nos decantamos por el cribado de la colección completa a la concentración  $2\mu\text{M}$ . Respecto al tiempo de incubación, tuvimos en cuenta los resultados obtenidos previamente para el azul de metileno y su diferencia de actividad a 24 y 48h, por lo que decidimos cribar la colección TCAMS usando 48h de tiempo de incubación para todos los compuestos. De esta forma, el cribado permitiría identificar tanto compuestos de acción rápida como de acción lenta.

Tras el cribado de la colección del TCAMS a concentración única  $2\mu\text{M}$  en el ensayo *PfFGAA*, se confirmó la actividad de 405 compuestos como inhibidores de la formación del gameto femenino, que suponen nuevos puntos de partida químicos para el descubrimiento de fármacos bloqueantes de la transmisión de la malaria. Un análisis más exhaustivo de la actividad de estas moléculas mediante comparación con un ensayo bioluminiscente que determina los niveles intracelulares de ATP, reveló que el 65% de los compuestos (258), aunque no eran cidas, afectaban significativamente la funcionalidad de los gametocitos (Figura 21). Dado que los compuestos gametocitocidas ya habían sido caracterizados en un estudio previo por Almela y colaboradores<sup>88</sup>, nuestro trabajo se enfocó en la progresión de la nueva diversidad química identificada con el ensayo *PfFGAA*.

### 3.1. Caracterización química y mecanismo de acción

Respecto a la diversidad química identificada en esta campaña de cribado, los 405 compuestos fueron clasificados en un total de 57 *clusters* y 33 *singletons*. Algunos de estos compuestos mostraron cierta similitud con las estructuras de algunos antimaláricos clásicos, por ejemplo 4-aminoquinolinas (TCMDC-138933, *cluster* 7,  $\text{IC}_{50}=0,76\mu\text{M}$ ) y diaminopirimidinas (TCMDC-137820, *cluster* 25,  $\text{IC}_{50}=1,06\mu\text{M}$ ). Sin embargo, la mayoría comprendían nuevos quimiotipos y en torno al 25% de los mismos mostraron buenas propiedades físico-químicas, considerando para ello un  $\text{clogP}$  menor de 5 y un número de anillos aromáticos menor de 3.

Por otro lado, este nuevo grupo de moléculas del TCAMS incluía bastantes estructuras que habían sido previamente identificadas por GSK como prometedores antimaláricos frente a las formas eritrocíticas asexuales<sup>145</sup> y que están o han formado parte de programas de química médica para el descubrimiento de nuevos fármacos (Figura 29). Gracias a este trabajo, estas moléculas podrán ser ahora priorizadas con el valor añadido como potenciales bloqueantes de la transmisión. Así mismo, un análisis preliminar de la estructura de los hits reveló que algunos de los compuestos identificados estaban altamente relacionados con el *Published Kinase Inhibitor Set* (PKIS) de GSK<sup>146</sup> (Figura 29), lo cual sugiere que las kinasas de *Plasmodium* puedan ser posibles dianas de estas moléculas.



**Figura 29.** Estructuras químicas de compuestos TCAMS que han sido descritos previamente. Se muestran en azul los esquizonticidas identificados como prometedores puntos de partida antimaláricos, y en verde los compuestos relacionados con el PKIS de GSK. Un compuesto perteneciente a ambos grupos se muestra en rosa.

Con objeto de investigar sobre la diana de nuestros hits en mayor profundidad, se realizó una búsqueda de la información existente sobre el TCAMS tanto en la bibliografía como en las bases de datos de GSK, encontrando información para seis de nuestros compuestos. El compuesto TCMDC-141611 fue patentado por SmithKline Beecham como inhibidor del receptor de tirosina kinasa Tie-2, que está involucrado en la angiogénesis. A pesar de la ausencia de la familia clásica de tirosín-kinasas en el kinoma de *P. falciparum*<sup>145</sup>, hay evidencias de que la fosforilación de proteínas en el parásito contribuye a la regulación de los procesos de invasión y citoadherencia de las fases asexuales del parásito<sup>147</sup>. El compuesto TCMDC-142257 ha sido caracterizado como inhibidor de un transportador de hexosas de *P. falciparum* que, aunque guarda cierta similitud con el transportador de glucosa GLUT1 de mamíferos, tiene gran afinidad por el receptor del parásito<sup>148</sup>.

Por otro lado, también hemos identificado algunos potenciales inhibidores de proteínas kinasas, entre los que se encuentran: TCMDC-134683, inhibidor de la fosfatidil-inositol-3-kinasa CDK1; TCMDC-135853, inhibidor de la calcio/calmodulina dependiente de kinasas ABL; y TCMDC-140369 y TCMDC-141334, inhibidores de la Ser/Thr proteína kinasa BRAF<sup>78</sup>. No es de sorprender que se hayan identificado inhibidores de este tipo de proteínas con el ensayo *PfFGAA* ya que ha sido ampliamente descrita la implicación de las mismas en las cascadas de señalización que se activan durante el proceso de gametogénesis. El ácido xanturénico produce una activación de las señales celulares mediadas por calcio, como la ruta PIP2/PI3 y cGMP, que producen a su vez la activación de otras proteínas kinasas<sup>149</sup> que están directamente implicadas en los procesos de exflagelación del gameto masculino y de activación del gametocito femenino.

La colección TCAMS también ha sido ensayada frente los estadios hepáticos de *P. berghei*, identificándose alrededor de 100 moléculas activas<sup>150</sup>. Tras comparar los resultados de nuestro cribado con aquellos obtenidos en el estudio de Raphemont y colaboradores, observamos que 10 de nuestros hits también habían sido previamente identificados como activos frente a los estadios hepáticos (Tabla 6). Además, cuatro de esos compuestos mostraron un índice de selectividad frente a células de mamífero HepG2 mayor de 10, lo cual es indicativo de su especificidad frente a *Plasmodium*. Estos compuestos tendrían, por tanto, un gran potencial como moléculas con

actividad frente a múltiples estadios del parásito (asexuales hepáticos y eritrocíticos, y sexuales) y podrían ser potencialmente desarrolladas para profilaxis, tratamiento clínico y bloqueo de la transmisión.

**Tabla 6.** Compuestos del TCAMS con actividad frente a múltiples estadios de *Plasmodium*. \*Raphemont *et al.* 2015<sup>150</sup>. \*\* Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

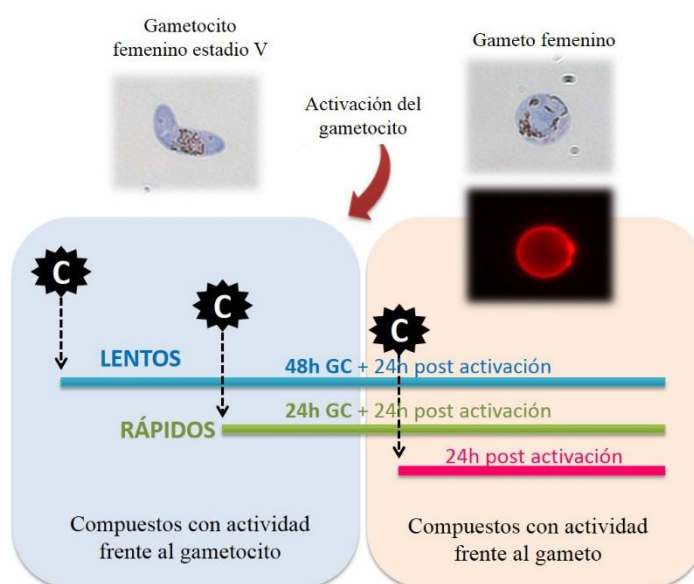
Compuesto	Cluster	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios hepáticos <i>Pb</i>	**IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales <i>Pf</i>	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad
TCMDC-123745	69	0,004	0,31	0,05	NA	NA
TCMDC-124602	13	0,733	0,66	0,24	>100	>416,67
TCMDC-135244	42	0,399	0,90	0,06	>100	>1,67
TCMDC-135853	67	0,509	0,13	2,26	11,79	5,22
TCMDC-140680	4	0,03	0,96	0,84	45,82	54,47
TCMDC-140762	4	0,071	0,74	0,88	13,52	15,32
TCMDC-141070	4	0,357	0,73	0,53	28,96	54,30
TCMDC-141381	4	0,04	0,16	0,20	5,01	25,16
TCMDC-141586	3	0,235	0,13	1,70	2,82	1,66
TCMDC-142233	48	0,239	0,77	1,17	1,78	1,51

### 3.2. Caracterización biológica

Con objeto de caracterizar en mayor profundidad el perfil biológico de la nueva diversidad química del TCAMS identificada por el ensayo *Pf*FGAA, se seleccionó un grupo de 90 compuestos representativos de cada una de las nuevas familias químicas. La caracterización consistió, por un lado, en evaluar la velocidad de acción de los compuestos (rápida o lenta) y, por otro lado, en determinar el estadio sobre el que ejercían su actividad, es decir, si actuaban sobre a los gametocitos en estadio V o los gametos femeninos. Desde el punto de vista del descubrimiento de fármacos antimaláricos, la forma más práctica de interrumpir el ciclo de vida de *Plasmodium* sería a través de la eliminación de los estadios transmisibles (gametocitos estadio V) que se encuentran presentes en sangre periférica de pacientes infectados. En este contexto, aquellos compuestos que actúen contra el gametocito y con un modo de acción rápido se preferirían sobre aquellos que requieren un mayor tiempo de

exposición o actúan a nivel de los estadios de mosquito. De todos los 90 compuestos ensayados, el 87% de los mismos mostraron actividad frente a los gametocitos en estadio V (además de su actividad frente a las formas asexuales) (Figura 23), lo cual puso de manifiesto su potencial utilidad como bloqueantes de la transmisión en clínica.

Por el contrario, el 10% de los compuestos restantes fueron activos frente a los gametos femeninos sin necesidad de una incubación previa con los gametocitos (Figura 23), lo cual sugiere que su actividad se desarrolla frente a estas fases en el mosquito. Sin embargo, se requiere de una investigación en más profundidad para determinar si estas moléculas también afectan a los gametocitos en estadio V y, en consecuencia, podrían tener el valor añadido de ser antimaláricos con actividad frente a múltiples formas sexuales del parásito (Figura 30).



**Figura 30.** Fases sexuales de *P. falciparum* sobre las que actúan los compuestos identificados por el ensayo PfFGAA. GC, gametocito; C, compuesto.

El desarrollo de un compuesto como fármaco depende de la ventana terapéutica existente entre su actividad frente al patógeno y su actividad frente a células humanas. En este trabajo se evaluó la actividad de los compuestos activos frente a la formación del gameto femenino de *P. falciparum* en células HepG2, una línea celular que deriva del tejido extraído del hígado de un varón con carcinoma hepático. Esta

línea celular se emplea como modelo de estudio *in vitro* del metabolismo hepático y la toxicidad farmacológica. Tras exponer las células HepG2 a nuestros 405 compuestos observamos que un 22% de los mismos mostraron índices de selectividad mayores de 10, lo cual sugiere que su diana podría tener la selectividad apropiada frente a las células humanas y, por consiguiente, permitiría continuar con la progresión de estas moléculas. Por el contrario, el 78% de los compuestos restantes requerirían modificaciones en su estructura química que redujesen su toxicidad en células de mamífero sin disminuir la selectividad por el parásito.

Por otro lado, al determinar la toxicidad de los 90 compuestos seleccionados para ser caracterizados en mayor detalle, se observó que en torno a un 45% de los mismos tenían un índice de selectividad mayor de 10 frente a las células HepG2. Este grupo de moléculas tiene, por tanto, mejores propiedades de seguridad farmacológica y podrían ser incluidas en programas de química médica si sus propiedades físico-químicas también son óptimas. Por el contrario, aquellas moléculas que han mostrado poseer una ventana terapéutica menor podrán ser empleadas inicialmente como *tool compounds* para investigar el modo de acción de las mismas sobre el parásito, pero también podrían ser modificadas químicamente para mejorar su especificidad y disminuir con ello el efecto tóxico.

Cabe destacar que el porcentaje de compuestos con valores de citotoxicidad superiores a 10 $\mu$ M en la colección completa del TCAMS fue del 15%, mientras que en nuestros 405 *hits* fue del 70%. Esto podría deberse al hecho de que los gametocitos son células quiescentes mientras que las formas asexuales son replicativas y tienen un metabolismo más acelerado. Los compuestos que afectasen simultáneamente a ambos estadios del parásito podrían, por tanto, estar afectando procesos generales de funcionalidad celular también presentes en mamíferos. Esta hipótesis sugiere que, con objeto de maximizar la identificación de compuestos no citotóxicos frente a gametocitos, sería más aconsejable realizar el cribado de una colección que no estuviese previamente filtrada por su actividad frente a las formas asexuales.

### 3.3. Confirmación de la actividad *in vivo*

Para confirmar que las moléculas identificadas en el ensayo *in vitro* de gametocitos realmente bloquean la transmisión del parásito en el mosquito, es necesario llevar a cabo su evaluación en el ensayo *ex vivo* de referencia SMFA. Dado que se trata de un ensayo muy laborioso y manual, seleccionamos seis de nuestros compuestos activos en el ensayo *Pf*FGAA para progresarlos al SMFA. Estos seis compuestos representaban los diferentes perfiles químicos y biológicos caracterizados con los diferentes formatos de nuestro ensayo (Tabla 5).

Como resultado de este estudio *ex vivo*, se observó que cuatro de los seis compuestos producían un bloqueo de la transmisión con valores superiores al 80% de inhibición (Figura 26), mientras que los dos restantes, TCMDC-124559 y TCMDC-125345, mostraron menor eficacia. Sin embargo, en el ensayo *in vitro*, los seis compuestos mostraron potencias de actividad dentro del mismo rango de valores, observándose una inhibición de la formación del gameto femenino con valores de  $IC_{50}$  entre 0,16 y 0,5  $\mu$ M (Tabla 5).

Por otro lado, se observó una buena correlación entre los porcentajes de inhibición de la formación del gameto masculino (Figura 25), la reducción de la intensidad de oocistos y el bloqueo de la transmisión (Figura 26A y 26B, respectivamente). A pesar del número limitado de compuestos ensayados, nuestros resultados podrían sugerir, por un lado, que la formación del gameto masculino (exflagelación) *in vitro* tenga mayor correlación con los parámetros de evaluación del ensayo *ex vivo* y, por otro lado, que un bloqueo efectivo de la transmisión podría requerir una potente actividad del compuesto inhibiendo la formación de ambos gametos. Dado que solo se han podido obtener datos de infectividad en el mosquito para un reducido número de las moléculas identificadas, sería necesario realizar estudios adicionales que permitiesen establecer una correlación más representativa entre los datos *in vitro* y *ex vivo*.

Una vez comprobada la actividad bloqueante de la transmisión de cuatro de las moléculas identificadas en el cribado, y dada su actividad dual al ser también activas frente las formas asexuales eritrocíticas, nuestro objetivo final fue medir su eficacia

en un modelo *in vivo*. Para ello seleccionamos las dos moléculas con mayor potencia tanto en el ensayo *Pf*FGAA como en el SMFA - TCMDC-123767 y TCMDC-140549 - y evaluamos su actividad frente a las formas asexuales en el modelo de ratón de *P.berghei*<sup>107</sup>. Como resultado de este experimento, ambos compuestos mostraron una dosis efectiva (ED50) mayor de 50 mg/kg tras un tratamiento monodosis de 2 días, lo cual era indicativo de una pobre eficacia de los compuestos para producir una reducción significativa de la parasitemia en el ratón.

Con objeto de comprobar si la falta de eficacia de nuestras moléculas era debido a su falta de actividad *in vivo* frente al parásito o bien a factores físico-químicos que los impidiesen actuar apropiadamente, se llevaron a cabo una serie de estudios fármaco-cinéticos. El desarrollo de moléculas candidatas a fármacos requiere la realización de estudios predictivos de absorción oral, con el fin de evidenciar posibles problemas de biodisponibilidad que se pueden presentar cuando son administrados por vía oral. El análisis fármaco-cinético de nuestras moléculas reveló muy bajos niveles en sangre tras la exposición al compuesto TCMDC-123767, así como un elevado aclaramiento a través de microsomas hepáticos *in vitro*. Esto podría traducirse en una reducida biodisponibilidad y, con ello, explicar la falta de efecto de esta molécula en el modelo *in vivo*.

Por otro lado, el compuesto TCMDC-140549 mostró un valor moderado de permeabilidad a través de membranas artificiales, lo cual también sugiere una baja biodisponibilidad de esta molécula *in vivo*. Dado que ambos compuestos han demostrado tener un valioso perfil parasitológico *in vitro*, se llevarán a cabo estudios adicionales para mejorar su estabilidad y disponibilidad en sangre que permitan evaluar su potencial desarrollo como fármacos antimaláricos. Entre las posibles mejoras para reducir el aclaramiento de las moléculas TCMDC-123767 y TCMDC-140549 se encontraría la de producir un bloqueo de sus posiciones lábiles, mientras que la solubilidad de TCMDC-123767 podría incrementarse mediante la incorporación de grupos polares y/o ionizables.

# Conclusiones

---



1. Se ha puesto a punto el ensayo de activación del gametocito femenino de *P. falciparum* (PFGAA) en formato de alto rendimiento. Es un ensayo robusto, sensible y reproducible que permite llevar a cabo cribados de extensas colecciones de compuestos. Este ensayo permite identificar moléculas que interrumpen el ciclo sexual de *P. falciparum* al bloquear la transición del gametocito en estadio V a gameto femenino, ya sea mediante una inhibición metabólica (matando al parásito) o funcional (impidiendo su progresión).
2. El ensayo PFGAA ha sido validado mediante la evaluación de 50 antimaláricos estándar (MMV50). Estos compuestos han mostrado un rango de actividad equivalente al descrito previamente en ensayos similares con gametocitos, resaltando como activos (submicromolares) algunos endoperóxidos, el tioestreptón y el azul de metileno. Así mismo, este estudio ha corroborado el reducido número de fármacos disponibles frente a la malaria que tienen capacidad para eliminar las formas responsables de la transmisión de la enfermedad.
3. La evaluación de un subgrupo de 356 moléculas de la colección *Tres Cantos Antimalarial Set* (TCAMS), a diferentes concentraciones de compuesto y tiempo de incubación, ha permitido determinar las condiciones óptimas de cribado de la colección completa. La concentración de compuesto elegida fue 2 $\mu$ M dado que el porcentaje de *hits* esperado era lo suficientemente elevado y además ofrecía un menor riesgo de toxicidad que concentraciones más elevadas. El tiempo de incubación se estableció en 48h dado nuestro interés en identificar moléculas con modo de acción tanto rápido como lento.
4. Utilizando las condiciones descritas en el punto 3, el cribado de la colección TCAMS con el ensayo PFGAA permitió la identificación de 405 moléculas con actividad antimalárica dual: frente a la formación del gameto femenino y frente a las formas asexuales intraeritrocíticas. La evaluación posterior de estos *hits* en un ensayo bioluminiscente de ATP reveló que 147 moléculas tenían actividad cida, mientras que 258 moléculas producían una inhibición funcional del parásito ya que solo eran detectadas mediante el ensayo PFGAA.

5. Dada la versatilidad del ensayo *PfFGAA*, se llevó a cabo la caracterización del perfil biológico de 90 moléculas, clasificándolas en función de su velocidad de acción y su actividad frente al gametocito o gameto femenino. Se identificaron un total de 49 moléculas con actividad lenta, 29 con actividad rápida y 12 con actividad directa frente el gameto femenino (sin previa exposición del gametocito). En consecuencia, este estudio pone de manifiesto el elevado porcentaje de compuestos identificados con actividad directa sobre el gametocito, los cuales tendrían mayor potencial de desarrollo clínico.

La caracterización *ex vivo* en el *Standard Membrane Feeding Assay* (SMFA) reveló una buena correlación con los datos *in vitro* para cuatro de las seis moléculas evaluadas. Por otro lado, se observó una buena correlación para las seis moléculas entre los parámetros evaluados en el mosquito y la inhibición de la formación del gameto masculino. A pesar de tratarse de un tamaño muestral reducido, esto puede sugerir que el bloqueo eficaz de la transmisión requiera de moléculas con actividad frente a ambos gametos.

6. El tratamiento de ratones infectados con *P. berghei* con dos compuestos cuya actividad se había confirmado en el mosquito, no produjo una reducción significativa de la parasitemia de formas asexuales *in vivo*. Estudios farmacocinéticos adicionales han sugerido que esta falta de eficacia se pueda deber a una baja biodisponibilidad de los mismos. Por consiguiente, el posterior desarrollo clínico de estas moléculas requeriría modificaciones químicas que permitiesen mejorar su disponibilidad en sangre, disminuyendo con ello el aclaramiento hepático e incrementando su posibilidad de absorción.

# Bibliografía

---



- 1 Risco-Castillo, V., Topcu, S., Marinach, C. *et al.* Malaria Sporozoites Traverse Host Cells within Transient Vacuoles. *Cell Host Microbe* **18**, 593-603, doi:10.1016/j.chom.2015.10.006 (2015).
- 2 Tavares, J., Formaglio, P., Thiberge, S. *et al.* Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection. *J. Exp. Med.* **210**, 905-915, doi:10.1084/jem.20121130 (2013).
- 3 Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D. & Marsh, K. Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**, 610-624, doi:10.1016/j.cell.2016.07.055 (2016).
- 4 Liehl, P., Meireles, P., Albuquerque, I. S. *et al.* Innate immunity induced by *Plasmodium* liver infection inhibits malaria reinfections. *Infect. Immun.* **83**, 1172-1180, doi:10.1128/iai.02796-14 (2015).
- 5 Liehl, P., Zuzarte-Luis, V., Chan, J. *et al.* Host-cell sensors for *Plasmodium* activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat. Med.* **20**, 47-53, doi:10.1038/nm.3424 (2014).
- 6 Meslin, B., Barnadas, C., Boni, V. *et al.* Features of apoptosis in *Plasmodium falciparum* erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. *J. Infect. Dis.* **195**, 1852-1859, doi:10.1086/518253 (2007).
- 7 Yano, T. & Kurata, S. Intracellular recognition of pathogens and autophagy as an innate immune host defence. *J. Biochem.* **150**, 143-149, doi:10.1093/jb/mvr083 (2011).
- 8 Hisaeda, H., Yasutomo, K. & Himeno, K. Malaria: immune evasion by parasites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 700-706, doi:10.1016/j.biocel.2004.10.009 (2005).
- 9 Prado, M., Eickel, N., De Niz, M. *et al.* Long-term live imaging reveals cytosolic immune responses of host hepatocytes against *Plasmodium infection* and parasite escape mechanisms. *Autophagy* **11**, 1561-1579, doi:10.1080/15548627.2015.1067361 (2015).
- 10 Ocana-Morgner, C., Mota, M. M. & Rodriguez, A. Malaria blood stage suppression of liver stage immunity by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**, 143-151 (2003).
- 11 Hill, A. V. S. Vaccines against malaria. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**, 2806-2814, doi:10.1098/rstb.2011.0091 (2011).
- 12 Ebstie, Y. A., Abay, S. M., Tadesse, W. T. & Ejigu, D. A. Tafenoquine and its potential in the treatment and relapse prevention of *Plasmodium vivax* malaria: the evidence to date. *Drug Des. Devel. Ther.* **10**, 2387-2399, doi:10.2147/dddt.s61443 (2016).
- 13 Olliaro, P. L., Barnwell, J. W., Barry, A. *et al.* Implications of *Plasmodium vivax* Biology for Control, Elimination, and Research. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **95**, 4-14, doi:10.4269/ajtmh.16-0160 (2016).
- 14 Weiss, G. E., Gilson, P. R., Taechalertpaisarn, T. *et al.* Revealing the sequence and resulting cellular morphology of receptor-ligand interactions during *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes. *PLoS Pathog.* **11**, e1004670, doi:10.1371/journal.ppat.1004670 (2015).

- 15 Cowman, A. F., Berry, D. & Baum, J. The cellular and molecular basis for malaria parasite invasion of the human red blood cell. *J. Cell Biol.* **198**, 961-971, doi:10.1083/jcb.201206112 (2012).
- 16 Cowman, A. F. & Crabb, B. S. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell* **124**, 755-766, doi:10.1016/j.cell.2006.02.006 (2006).
- 17 Koch, M. & Baum, J. The mechanics of malaria parasite invasion of the human erythrocyte - towards a reassessment of the host cell contribution. *Cell Microbiol.* **18**, 319-329, doi:10.1111/cmi.12557 (2016).
- 18 Bannister, L. H., Hopkins, J. M., Fowler, R. E., Krishna, S. & Mitchell, G. H. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitol. Today* **16**, 427-433 (2000).
- 19 Goldberg, D. E. & Cowman, A. F. Moving in and renovating: exporting proteins from *Plasmodium* into host erythrocytes. *Nat. Rev. Micro.* **8**, 617-621 (2010).
- 20 Sinden, R. E. Sexual development of malarial parasites. *Adv. Parasitol.* **22**, 153-216 (1983).
- 21 Hawking, F., Wilson, M. E. & Gammage, K. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **65**, doi:10.1016/0035-9203(71)90036-8 (1971).
- 22 Tiburcio, M., Silvestrini, F., Bertuccini, L. *et al.* Early gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* specifically remodel the adhesive properties of infected erythrocyte surface. *Cell Microbiol.* **15**, doi:10.1111/cmi.12062 (2012).
- 23 Dixon, M. W., Thompson, J., Gardiner, D. L. & Trenholme, K. R. Sex in *Plasmodium*: a sign of commitment. *Trends Parasitol.* **24**, 168-175, doi:10.1016/j.pt.2008.01.004 (2008).
- 24 Josling, G. A. & Llinas, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat. Rev. Micro.* **13**, 573-587, doi:10.1038/nrmicro3519 (2015).
- 25 Baker, D. A. Malaria gametocytogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **172**, 57-65, doi:10.1016/j.molbiopara.2010.03.019 (2010).
- 26 Ménard, R. Medicine: Knockout malaria vaccine? *Nature* **433**, 113-114 (2005).
- 27 White, N. J., Chapman, D. & Watt, G. The effects of multiplication and synchronicity on the vascular distribution of parasites in *falciparum* malaria. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **86**, 590-597, doi:10.1016/0035-9203(92)90141-x (1992).
- 28 Saul, A. The Role of Variant Surface Antigens on Malaria-infected Red Blood Cells. *Parasitology Today* **15**, 455-457, doi:10.1016/S0169-4758(99)01534-3 (1999).
- 29 Su, X.-z., Heatwole, V. M., Wertheimer, S. P. *et al.* The large diverse gene family *var* encodes proteins involved in cytoadherence and antigenic variation of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Cell* **82**, 89-100, doi:10.1016/0092-8674(95)90055-1 (1995).

- 
- 30 Baruch, D. I., Pasloske, B. L., Singh, H. B. *et al.* Cloning the *P. falciparum* gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes. *Cell* **82**, 77-87, doi:10.1016/0092-8674(95)90054-3 (1995).
- 31 Smith, J. D., Chitnis, C. E., Craig, A. G. *et al.* Switches in expression of *Plasmodium falciparum* var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes. *Cell* **82**, 101-110, doi:10.1016/0092-8674(95)90056-X (1995).
- 32 Farfour, E., Charlotte, F., Settegrana, C., Miyara, M. & Buffet, P. The extravascular compartment of the bone marrow: a niche for *Plasmodium falciparum* gametocyte maturation? *Malar. J.* **11**, 285, doi:10.1186/1475-2875-11-285 (2012).
- 33 Aguilar, R., Magallon-Tejada, A., Achtman, A. H. *et al.* Molecular evidence for the localization of *Plasmodium falciparum* immature gametocytes in bone marrow. *Blood* **123**, doi:10.1182/blood-2013-08-520767 (2014).
- 34 Smalley, M. E. *Plasmodium falciparum* gametocytes: The effect of chloroquine on their development. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **71**, 526-529 (1977).
- 35 Lensen, A., Bril, A., van de Vegte, M. *et al.* *Plasmodium falciparum*: Infectivity of Cultured, Synchronized Gametocytes to Mosquitoes. *Exp. Par.* **91**, 101-103, doi:10.1006/expr.1998.4354 (1999).
- 36 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. *Malar. J.* **9**, 136, doi:10.1186/1475-2875-9-136 (2010).
- 37 Rogers, N. J., Hall, B. S., Obiero, J., Targett, G. A. T. & Sutherland, C. J. A Model for Sequestration of the Transmission Stages of *Plasmodium falciparum*: Adhesion of Gametocyte-Infected Erythrocytes to Human Bone Marrow Cells. *Infection and Immunity* **68**, 3455-3462, doi:10.1128/iai.68.6.3455-3462.2000 (2000).
- 38 Silvestrini, F., Tiburcio, M., Bertuccini, L. & Alano, P. Differential adhesive properties of sequestered asexual and sexual stages of *Plasmodium falciparum* on human endothelial cells are tissue independent. *PLoS ONE* **7**, doi:10.1371/journal.pone.0031567 (2012).
- 39 Nilsson, S. K., Childs, L. M., Buckee, C. & Marti, M. Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination. *PLoS Pathog.* **11**, e1004871, doi:10.1371/journal.ppat.1004871 (2015).
- 40 Glenister, F. K., Coppel, R. L., Cowman, A. F., Mohandas, N. & Cooke, B. M. Contribution of parasite proteins to altered mechanical properties of malaria-infected red blood cells. *Blood* **99**, 1060-1063, doi:10.1182/blood.V99.3.1060 (2002).
- 41 Rug, M., Prescott, S. W., Fernandez, K. M., Cooke, B. M. & Cowman, A. F. The role of KAHRP domains in knob formation and cytoadherence of *P. falciparum*-infected human erythrocytes. *Blood* **108**, 370-378, doi:10.1182/blood-2005-11-4624 (2006).
- 42 Sanyal, S., Egée, S., Bouyer, G. *et al.* *Plasmodium falciparum* STEVOR proteins impact erythrocyte mechanical properties. *Blood* **119**, e1-e8, doi:10.1182/blood-2011-08-370734 (2012).
-

- 43 Tibúrcio, M., Niang, M., Deplaine, G. *et al.* A switch in infected erythrocyte deformability at the maturation and blood circulation of *Plasmodium falciparum* transmission stages. *Blood* **119**, 172-180, doi: 10.1182/blood-2012-03-414557 (2012).
- 44 Aingaran, M., Zhang, R., Law, S. K. *et al.* Host cell deformability is linked to transmission in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cellular Microbiology* **14**, 983-993, doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01786.x (2012).
- 45 López-Barragán, M. J., Lemieux, J., Quiñones, M. *et al.* Directional gene expression and antisense transcripts in sexual and asexual stages of *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* **12**, 587, doi:10.1186/1471-2164-12-587 (2011).
- 46 Otto, T. D., Wilinski, D., Assefa, S. *et al.* New insights into the blood-stage transcriptome of *Plasmodium falciparum* using RNA-Seq. *Molecular Microbiology* **76**, 12-24, doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07026.x (2010).
- 47 Zhou, Y., Ramachandran, V., Kumar, K. A. *et al.* Evidence-Based Annotation of the Malaria Parasite's Genome Using Comparative Expression Profiling. *PLOS ONE* **3**, e1570, doi:10.1371/journal.pone.0001570 (2008).
- 48 Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M. & Aravind, L. Discovery of the principal specific transcription factors of Apicomplexa and their implication for the evolution of the AP2-integrase DNA binding domains. *Nucleic Acids Research* **33**, 3994-4006, doi:10.1093/nar/gki709 (2005).
- 49 Oberstaller, J., Pumpalova, Y., Schieler, A., Llinás, M. & Kissinger, J. C. The *Cryptosporidium parvum* ApiAP2 gene family: insights into the evolution of apicomplexan AP2 regulatory systems. *Nucleic Acids Research* **42**, 8271-8284, doi:10.1093/nar/gku500 (2014).
- 50 Campbell, T. L., De Silva, E. K., Olszewski, K. L., Elemento, O. & Llinás, M. Identification and Genome-Wide Prediction of DNA Binding Specificities for the ApiAP2 Family of Regulators from the Malaria Parasite. *PLOS Pathog.* **6**, e1001165, doi:10.1371/journal.ppat.1001165 (2010).
- 51 Smith, T. G., Lourenco, P., Carter, R., Walliker, D. & Ranford-Cartwright, L. C. Commitment to sexual differentiation in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* **121**, doi:10.1017/s0031182099006265 (2000).
- 52 Ikadai, H., Shaw Saliba, K., Kanzok, S. M. *et al.* Transposon mutagenesis identifies genes essential for *Plasmodium falciparum* gametocytogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **110**, E1676-1684, doi:10.1073/pnas.1217712110 (2013).
- 53 Eksi, S., Morahan, B. J., Haile, Y. *et al.* *Plasmodium falciparum* gametocyte development 1 (Pfgdv1) and gametocytogenesis early gene identification and commitment to sexual development. *PLoS Pathog.* **8**, doi:10.1371/journal.ppat.1002964 (2012).
- 54 Dyer, M. & Day, K. P. Regulation of the rate of asexual growth and commitment to sexual development by diffusible factors from *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **68** (2003).
- 55 Regev-Rudzki, N., Wilson, D. W., Carvalho, T. G. *et al.* Cell-cell communication between malaria-infected red blood cells via exosome-like vesicles. *Cell* **153**, 1120-1133, doi:10.1016/j.cell.2013.04.029 (2013).

- 56 Bruce, M. C., Carter, R. N., Nakamura, K., Aikawa, M. & Carter, R. Cellular location and temporal expression of the *Plasmodium falciparum* sexual stage antigen Pfs16. *Mol. Biochem. Parasitol.* **65**, 11-22 (1994).
- 57 Camarda, G., Bertuccini, L., Singh, S. K. *et al.* Regulated oligomerisation and molecular interactions of the early gametocyte protein Pfg27 in *Plasmodium falciparum* sexual differentiation. *Int. J. Parasitol.* **40**, 663-673, doi:10.1016/j.ijpara.2009.11.006 (2010).
- 58 Moreira, C. K., Marrelli, M. T. & Jacobs-Lorena, M. Gene expression in *Plasmodium*: from gametocytes to sporozoites. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1431-1440, doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.007 (2004).
- 59 Billker, O., Lindo, V., Panico, M. *et al.* Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* **392**, 289-292, doi:10.1038/32667 (1998).
- 60 Guttery, D. S., Roques, M., Holder, A. A. & Tewari, R. Commit and Transmit: Molecular Players in *Plasmodium* Sexual Development and Zygote Differentiation. *Trends Parasitol.* **31**, 676-685, doi:10.1016/j.pt.2015.08.002 (2015).
- 61 Billker, O., Dechamps, S., Tewari, R. *et al.* Calcium and a calcium-dependent protein kinase regulate gamete formation and mosquito transmission in a malaria parasite. *Cell* **117**, 503-514 (2004).
- 62 Olivieri, A., Bertuccini, L., Deligianni, E. *et al.* Distinct properties of the egress-related osmiophilic bodies in male and female gametocytes of the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Cell Microbiol.* **17**, 355-368, doi:10.1111/cmi.12370 (2015).
- 63 World Health Organization. *World Malaria Report 2016*. (Geneva, 2016).
- 64 Flannery, E. L., Chatterjee, A. K. & Winzeler, E. A. Antimalarial drug discovery - approaches and progress towards new medicines. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 849-862, doi:10.1038/nrmicro3138 (2013).
- 65 Alonso, P. L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M. *et al.* A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.* **8**, e1000406, doi:10.1371/journal.pmed.1000406 (2011).
- 66 Sinka, M. E., Bangs, M. J., Manguin, S. *et al.* A global map of dominant malaria vectors. *Parasites & Vectors* **5**, 69-69, doi:10.1186/1756-3305-5-69 (2012).
- 67 RTS, S. C. T. P. Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet* **386**, 31-45, doi:10.1016/s0140-6736(15)60721-8 (2015).
- 68 Lyke, K. E., Ishizuka, A. S., Berry, A. A. *et al.* Attenuated PfSPZ Vaccine induces strain-transcending T cells and durable protection against heterologous controlled human malaria infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **114**, 2711-2716, doi:10.1073/pnas.1615324114 (2017).
- 69 MacDonald, N. J., Nguyen, V., Shimp, R. *et al.* Structural and Immunological Characterization of Recombinant 6-Cysteine Domains of the *Plasmodium*

- falciparum* Sexual Stage Protein Pfs230. *J. Biol. Chem.* **291**, 19913-19922, doi:10.1074/jbc.M116.732305 (2016).
- 70 Li, Y., Leneghan, D. B., Miura, K. *et al.* Enhancing immunogenicity and transmission-blocking activity of malaria vaccines by fusing Pfs25 to IMX313 multimerization technology. *Sci. Rep.* **6**, 18848, doi:10.1038/srep18848 (2016).
- 71 Theisen, M., Jore, M. M. & Sauerwein, R. Towards clinical development of a Pfs48/45-based transmission blocking malaria vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **16**, 329-336, doi:10.1080/14760584.2017.1276833 (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**, e1001169, doi:10.1371/journal.pmed.1001169 (2012).
- 73 World Health Organization. *World Malaria Report 2015*. (Geneva, 2015).
- 74 World Health Organization. *Guidelines for the treatment of malaria*. (Geneva, 2015).
- 75 Sinden, R. E. & Smalley, M. E. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: the cell-cycle. *Parasitology* **79**, 277-296 (1979).
- 76 Plouffe, D., Brinker, A., McNamara, C. *et al.* *In silico* activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 9059-9064, doi:10.1073/pnas.0802982105 (2008).
- 77 Guiguemde, W. A., Shelat, A. A., Bouck, D. *et al.* Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **465**, 311-315, doi:10.1038/nature09099 (2010).
- 78 Gamo, F. J., Sanz, L. M., Vidal, J. *et al.* Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **465**, 305-310, doi:10.1038/nature09107 (2010).
- 79 Spangenberg, T., Burrows, J. N., Kowalczyk, P. *et al.* The open access malaria box: a drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS ONE* **8**, e62906, doi:10.1371/journal.pone.0062906 (2013).
- 80 Van Voorhis, W. C., Adams, J. H., Adelfio, R. *et al.* Open Source Drug Discovery with the Malaria Box Compound Collection for Neglected Diseases and Beyond. *PLoS Pathog.* **12**, e1005763, doi:10.1371/journal.ppat.1005763 (2016).
- 81 Avery, V. M., Bashyam, S., Burrows, J. N. *et al.* Screening and hit evaluation of a chemical library against blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Malar. J.* **13**, 190, doi:10.1186/1475-2875-13-190 (2014).
- 82 Butcher, G. A. Antimalarial drugs and the mosquito transmission of *Plasmodium*. *Int. J. Parasitol.* **27**, 975-987 (1997).
- 83 Lelievre, J., Almela, M. J., 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**, e35019, doi:10.1371/journal.pone.0035019 (2012).

- 84 Cevenini, L., Camarda, G., Michelini, E. *et al.* Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. *Anal. Chem.* **86**, 8814-8821, doi:10.1021/ac502098w (2014).
- 85 Duffy, S. & Avery, V. M. Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malar. J.* **12**, 408, doi:10.1186/1475-2875-12-408 (2013).
- 86 Tanaka, T. Q., Dehdashti, S. J., Nguyen, D. T. *et al.* A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. *Mol. Biochem. Parasitol.* **188**, 20-25, doi:10.1016/j.molbiopara.2013.02.005 (2013).
- 87 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**, 2048-2058, doi:10.1093/jac/dkt165 (2013).
- 88 Almela, M. J., Lozano, S., Lelievre, J. *et al.* A new set of chemical starting points with *Plasmodium falciparum* transmission-blocking potential for antimalarial drug discovery. *PLoS ONE* **10**, e0135139, doi:10.1371/journal.pone.0135139 (2015).
- 89 Plouffe, D. M., Wree, M., Du, A. Y. *et al.* High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. *Cell Host Microbe* **19**, 114-126, doi:10.1016/j.chom.2015.12.001 (2016).
- 90 Delves, M. J. *Plasmodium* cell biology should inform strategies used in the development of antimalarial transmission-blocking drugs. *Future Med. Chem.* **4**, 2251-2263, doi:10.4155/fmc.12.182 (2012).
- 91 Delves, M. J., Ruecker, A., Straschil, U. *et al.* Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3268-3274, doi:10.1128/aac.00325-13 (2013).
- 92 Ruecker, A., Mathias, D. K., Straschil, U. *et al.* A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 7292-7302, doi:10.1128/aac.03666-14 (2014).
- 93 Sanders, N. G., Sullivan, D. J., Mlambo, G., Dimopoulos, G. & Tripathi, A. K. Gametocytocidal screen identifies novel chemical classes with *Plasmodium falciparum* transmission blocking activity. *PLoS ONE* **9**, e105817, doi:10.1371/journal.pone.0105817 (2014).
- 94 Lucantoni, L., Silvestrini, F., Signore, M. *et al.* A simple and predictive phenotypic High Content Imaging assay for *Plasmodium falciparum* mature gametocytes to identify malaria transmission blocking compounds. *Sci. Rep.* **5**, 16414, doi:10.1038/srep16414 (2015).
- 95 Miguel-Blanco, C., Lelievre, J., Delves, M. J. *et al.* Imaging-based high-throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *Plasmodium falciparum* female gamete formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3298-3305, doi:10.1128/aac.04684-14 (2015).
- 96 Miguel-Blanco, C., Molina, I., Bardera, A. I. *et al.* Hundreds of dual-stage antimalarial molecules discovered by a functional gametocyte screen. *Nat. Commun.* **8**, 15160, doi:10.1038/ncomms15160 (2017).

- 97 Churcher, T. S., Blagborough, A. M., Delves, M. *et al.* Measuring the blockade of malaria transmission--an analysis of the Standard Membrane Feeding Assay. *Int. J. Parasitol.* **42**, 1037-1044, doi:10.1016/j.ijpara.2012.09.002 (2012).
- 98 Ashley, E. A., Recht, J. & White, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. *Malar. J.* **13**, 418, doi:10.1186/1475-2875-13-418 (2014).
- 99 St Laurent, B., Miller, B., Burton, T. A. *et al.* Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* clinical isolates can infect diverse mosquito vectors of Southeast Asia and Africa. *Nat. Commun.* **6**, 8614, doi:10.1038/ncomms9614 (2015).
- 100 Saunders, D. & Lon, C. Combination therapies for malaria are failing-what next? *Lancet Infect. Dis.* **16**, 274-275, doi:10.1016/s1473-3099(15)00525-3 (2016).
- 101 Amaratunga, C., Lim, P., Suon, S. *et al.* Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 357-365, doi:10.1016/s1473-3099(15)00487-9 (2016).
- 102 Trager, W. & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673-675 (1976).
- 103 Kaushal, D. C., Carter, R., Miller, L. H. & Krishna, G. Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture. *Nature* **286**, 490-492 (1980).
- 104 Barr, P. J., Green, K. M., Gibson, H. L. *et al.* Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J. Exp. Med.* **174**, 1203-1208 (1991).
- 105 Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **4**, 67-73 (1999).
- 106 Coma, I., Herranz, J. & Martin, J. Statistics and decision making in high-throughput screening. *Methods Mol. Biol.* **565**, 69-106, doi:10.1007/978-1-60327-258-2\_4 (2009).
- 107 Jiménez-Díaz, M. B., Viera, S., Ibáñez, J. *et al.* A New *In Vivo* Screening Paradigm to Accelerate Antimalarial Drug Discovery. *PLOS ONE* **8**, e66967, doi:10.1371/journal.pone.0066967 (2013).
- 108 Mair, G. R., Braks, J. A., Garver, L. S. *et al.* Regulation of sexual development of *Plasmodium* by translational repression. *Science* **313**, doi:10.1126/science.1125129 (2006).
- 109 Kaslow, D. C., Quakyi, I. A., Syin, C. *et al.* A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* **333**, 74-76, doi:10.1038/333074a0 (1988).
- 110 Hartigan, J. A. & Wong, M. A. Algorithm AS 136: A K-Means Clustering Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)* **28**, 100-108, doi:10.2307/2346830 (1979).
- 111 Sinden, R. E., Carter, R., Drakeley, C. & Leroy, D. The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar. J.* **11**, 70, doi:10.1186/1475-2875-11-70 (2012).

- 112 World Health Organization. *Global technical strategy for malaria 2016-2030*. (2015).
- 113 Leong, F. J., Li, R., Jain, J. P. *et al.* A First-in-Human Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single- and Multiple-Ascending Oral Dose Study of Novel Antimalarial Spiroindolone KAE609 (Cipargamin) To Assess Its Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics in Healthy Adult Volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 6209-6214, doi:10.1128/aac.03393-14 (2014).
- 114 Wang, X., Dong, Y., Wittlin, S. *et al.* Comparative antimalarial activities and ADME profiles of ozonides (1,2,4-trioxolanes) OZ277, OZ439, and their 1,2-dioxolane, 1,2,4-trioxane, and 1,2,4,5-tetraoxane isosteres. *J. Med. Chem.* **56**, 2547-2555, doi:10.1021/jm400004u (2013).
- 115 White, N. J., Ashley, E. A., Recht, J. *et al.* Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar. J.* **13**, doi:10.1186/1475-2875-13-483 (2014).
- 116 Adjalley, S. H., Johnston, G. L., Li, T. *et al.* Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **108**, E1214-1223, doi:10.1073/pnas.1112037108 (2011).
- 117 Aminake, M. N., 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**, 1338-1348, doi:10.1128/aac.01096-10 (2011).
- 118 Pfizer Worldwide Research & Development. *Emerging trends in antibacterial discovery: Answering the call to arms*. (Caister Academic Press, 2011).
- 119 Vivas, L., Rattray, L., Stewart, L. *et al.* Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination *in vitro* and *in vivo*. *Acta Trop.* **105**, 222-228, doi:10.1016/j.actatropica.2007.12.005 (2008).
- 120 Duparc, S., Borghini-Fuhrer, I., Craft, C. J. *et al.* Safety and efficacy of pyronaridine-artesunate in uncomplicated acute malaria: an integrated analysis of individual patient data from six randomized clinical trials. *Malar. J.* **12**, 70, doi:10.1186/1475-2875-12-70 (2013).
- 121 Leang, R., Canavati, S. E., Khim, N. *et al.* Efficacy and Safety of Pyronaridine-Artesunate for Treatment of Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Western Cambodia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 3884-3890, doi:10.1128/aac.00039-16 (2016).
- 122 Chavalitshe-winkoon-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. Int.* **48**, 275-280 (2000).
- 123 Dechy-Cabaret, O. & Benoit-Vical, F. Effects of antimalarial molecules on the gametocyte stage of *Plasmodium falciparum*: the debate. *J. Med. Chem.* **55**, 10328-10344, doi:10.1021/jm3005898 (2012).
- 124 Atamna, H., Krugliak, M., Shalmiev, G. *et al.* Mode of antimalarial effect of methylene blue and some of its analogues on *Plasmodium falciparum* in culture and

- their inhibition of *P. vinckei petteri* and *P. yoelii nigeriensis in vivo*. *Biochemical Pharmacology* **51**, 693-700, doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(95\)02258-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(95)02258-9) (1996).
- 125 Pascual, A., Henry, M., Briolant, S. *et al.* *In vitro* activity of Proveblue (methylene blue) on *Plasmodium falciparum* strains resistant to standard antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2472-2474, doi:10.1128/aac.01466-10 (2011).
- 126 Buchholz, K., Schirmer, R. H., Eubel, J. K. *et al.* Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 183-191, doi:10.1128/aac.00773-07 (2008).
- 127 Pastrana-Mena, R., Dinglasan, R. R., Franke-Fayard, B. *et al.* Glutathione reductase-null malaria parasites have normal blood stage growth but arrest during development in the mosquito. *J. Biol. Chem.* **285**, 27045-27056, doi:10.1074/jbc.M110.122275 (2010).
- 128 Zoungrana, A., Coulibaly, B., Sie, 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**, e1630, doi:10.1371/journal.pone.0001630 (2008).
- 129 Coulibaly, B., Zoungrana, A., Mockenhaupt, F. P. *et al.* Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against *Falciparum* Malaria: A Randomised Controlled Trial. *PLoS ONE* **4**, e5318, doi:10.1371/journal.pone.0005318 (2009).
- 130 Siciliano, G., Santha Kumar, T. R., 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**, 306-318, doi:10.1111/mmi.13626 (2017).
- 131 World Health Organization. *WHO briefing on malaria treatment guidelines and artemisinin monotherapies (2006)*, <[http://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting\\_briefing19april.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting_briefing19april.pdf)>
- 132 Anthony, M. P., Burrows, J. N., Duparc, S., Moehrle, J. J. & Wells, T. N. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar. J.* **11**, 316, doi:10.1186/1475-2875-11-316 (2012).
- 133 Chotivanich, K., Sattabongkot, J., Udomsangpetch, R. *et al.* Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1927-1930, doi:10.1128/aac.01472-05 (2006).
- 134 Peatey, C. L., Leroy, D., Gardiner, D. L. & Trenholme, K. R. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malar. J.* **11**, 34, doi:10.1186/1475-2875-11-34 (2012).
- 135 Price, R. N., Nosten, F., Luxemburger, C. *et al.* Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* **347**, 1654-1658 (1996).
- 136 Sutherland, C. J., Ord, R., Dunyo, S. *et al.* Reduction of malaria transmission to *Anopheles* mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. *PLoS Med.* **2**, e92, doi:10.1371/journal.pmed.0020092 (2005).

- 137 Price, R. N. Potential of artemisinin-based combination therapies to block malaria transmission. *J. Infect. Dis.* **207**, 1627-1629, doi:10.1093/infdis/jit079 (2013).
- 138 Karunajeewa, H. A. & Mueller, I. How important is gametocyte clearance after malaria therapy? *BMC Medicine* **14**, 93, doi:10.1186/s12916-016-0641-3 (2016).
- 139 White, N. J. Primaquine to prevent transmission of *falciparum* malaria. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 175-181, doi:10.1016/s1473-3099(12)70198-6 (2013).
- 140 John, C. C. Primaquine plus artemisinin combination therapy for reduction of malaria transmission: promise and risk. *BMC Med.* **14**, 65, doi:10.1186/s12916-016-0611-9 (2016).
- 141 Graves, P. M., Gelband, H. & Garner, P. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2**, Cd008152, doi:10.1002/14651858.CD008152.pub4 (2015).
- 142 Cabrera, M. & Cui, L. *In vitro* activities of primaquine-schizonticide combinations on asexual blood stages and gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7650-7656, doi:10.1128/aac.01948-15 (2015).
- 143 Constantino, L., Paixao, P., Moreira, R. *et al.* Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions: evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. *Exp. Toxic Pathol.* **51**, doi:10.1016/s0940-2993(99)80010-4 (1999).
- 144 Pybus, B. S., Marcsisin, S. R., Jin, X. *et al.* The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar. J.* **12**, 212, doi:10.1186/1475-2875-12-212 (2013).
- 145 Shiu, S. H. & Li, W. H. Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 828-840, doi:10.1093/molbev/msh077 (2004).
- 146 Drewry, D. H., Willson, T. M. & Zuercher, W. J. Seeding collaborations to advance kinase science with the GSK Published Kinase Inhibitor Set (PKIS). *Curr. Top Med. Chem* **14**, 340-342 (2014).
- 147 Solyakov, L., Halbert, J., Alam, M. M. *et al.* Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2**, 565, doi:10.1038/ncomms1558 (2011).
- 148 Fayolle, M., Ionita, M., Krishna, S., Morin, C. & Patel, A. P. Probing structure/affinity relationships for the *Plasmodium falciparum* hexose transporter with glucose derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 1267-1271, doi:10.1016/j.bmcl.2005.11.068 (2006).
- 149 Raabe, A. C., Wengelnik, K., Billker, O. & Vial, H. J. Multiple roles for *Plasmodium berghei* phosphoinositide-specific phospholipase C in regulating gametocyte activation and differentiation. *Cellular Microbiology* **13**, 955-966, doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01591.x (2011).
- 150 Raphemot, R., Lafuente-Monasterio, M. J., Gamo-Benito, F. J., Clardy, J. & Derbyshire, E. R. Discovery of Dual-Stage Malaria Inhibitors with New Targets. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1430-1437, doi:10.1128/aac.02110-15 (2015).



# Anexos

---



# Tablas suplementarias

---



**Tabla suplementaria 1.** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-123475	0,01	NA	NA	81,04	0,27
TCMDC-123493	0,29	1,8	6,24	63,83	0,17
TCMDC-123605	1,73	9,22	5,32	20,24	0,96
TCMDC-123657	1,35	1,72	1,27	8,99	0,16
TCMDC-123680	0,74	4,27	5,79	86,44	0,27
TCMDC-123691	1,48	23,45	15,84	95,66	0,93
TCMDC-123745	0,05	NA	NA	49,04	0,31
TCMDC-123754	1,16	2,32	2,01	-2,55	0,44
TCMDC-123767	0,16	>100	>625	-5,49	0,27
TCMDC-123786	1,54	14,14	9,15	104,88	1,05
TCMDC-123805	1,46	0,55	0,38	-0,54	0,78
TCMDC-123811	1,57	94,46	60,12	-1,98	0,46
TCMDC-123865	0,58	52,49	89,78	90,91	0,15
TCMDC-123868	1,16	37,44	32,14	29,36	1,06
TCMDC-123884	1,54	>100	>65	63,5	0,93
TCMDC-123899	0,94	>100	>106,38	-0,6	0,23
TCMDC-123915	3,34	5,43	1,63	2,56	0,04
TCMDC-123993	0,73	32,3	44,35	23,86	0,66
TCMDC-123997	1,91	45,69	23,97	90,58	1
TCMDC-124011	0,04	11,35	310,09	87,64	0,99
TCMDC-124083	1,08	0,93	0,86	6,94	0,51
TCMDC-124162	2,4	17,68	7,38	20,5	0,14
TCMDC-124172	0,88	21,7	24,74	65,5	0,71
TCMDC-124255	1	4,57	4,56	12,43	0,72
TCMDC-124262	0,36	60,26	169,7	60,69	1,05
TCMDC-124263	0,24	NA	NA	65,12	0,91
TCMDC-124286	1,8	4,9	2,73	51,9	0,3
TCMDC-124311	1,44	25,79	17,93	-39,73	0,32
TCMDC-124315	1,12	37,65	33,48	3,06	0,82
TCMDC-124316	1,1	41,96	38,14	0,5	0,98
TCMDC-124436	0,13	>100	>769,23	100,64	0,4
TCMDC-124453	0,1	>100	>1,000	81,87	0,68
TCMDC-124514	1,25	>100	>80	17,03	0,19
TCMDC-124533	1,16	6,24	5,4	-45,19	0,47
TCMDC-124542	0,77	36,31	47,05	30,31	0,4
TCMDC-124550	0,03	NA	NA	56,7	0,58
TCMDC-124559	0,34	50,12	146,27	8,95	1,32
TCMDC-124602	0,24	>100	>416,67	12,16	0,66
TCMDC-124617	0,72	4,37	6,08	-8,62	1,51

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-124677	1,47	4,9	3,34	-0,79	0,84
TCMDC-124787	2,12	28,85	13,6	-6,61	0,75
TCMDC-124799	0,96	3,63	3,77	25,78	0,37
TCMDC-124805	0,16	27,05	174,28	93,11	0,17
TCMDC-124811	7,05	25,73	3,65	42,91	1,24
TCMDC-124851	1,74	11,49	6,59	17,94	1,1
TCMDC-124940	1,3	>100	>76,92	0,06	0,62
TCMDC-124958	1,08	11,89	11,05	-9,01	0,14
TCMDC-125004	4,55	25,15	5,53	91,77	0,8
TCMDC-125142	1,11	4,07	3,66	39,31	1,19
TCMDC-125149	1,31	>100	>76,34	5,52	0,97
TCMDC-125237	1,87	10,6	5,68	-1,51	0,75
TCMDC-125247	0,49	89,13	181	22,13	0,26
TCMDC-125345	0,36	39,82	111,27	39,52	0,56
TCMDC-125420	0,21	6,18	29,8	86,62	0,45
TCMDC-125421	0,32	13,04	40,15	76,15	0,3
TCMDC-125432	1,07	29,22	27,41	-8,57	0,83
TCMDC-125487	0,03	>100	>3.333,33	74,71	0,6
TCMDC-125521	0,03	>100	>3.333,33	85,73	0,77
TCMDC-125522	0,08	3,47	41,7	64,79	0,77
TCMDC-125531	2,73	9,77	3,57	56,02	0,21
TCMDC-125539	0,14	>100	>714,29	69,68	0,73
TCMDC-125540	0,05	58,31	1073,05	71,05	0,56
TCMDC-125559	1,14	12,74	11,16	84,3	0,89
TCMDC-125565	3,03	NA	NA	91,61	0,65
TCMDC-125592	1,43	3,07	2,15	-6,96	0,24
TCMDC-125701	1,14	1,61	1,41	0,82	0,36
TCMDC-125752	0,02	NA	NA	74,38	0,72
TCMDC-125758	0,33	4,96	14,86	89,28	1,09
TCMDC-125825	0,16	48,99	307,8	85,03	0,73
TCMDC-125826	0,12	>100	>833,33	84,45	0,72
TCMDC-125835	0,67	1,57	2,32	101,44	0,17
TCMDC-125836	1,14	26,14	22,91	7,23	0,88
TCMDC-125849	1,82	2,24	1,23	60	0,15
TCMDC-125854	0,03	63,1	2310,86	82,15	0,75
TCMDC-131267	1,26	6,9	5,49	51,2	0,96
TCMDC-131268	10,92	13,18	1,21	64,17	0,6
TCMDC-131270	0,58	2,12	3,67	67,75	0,58
TCMDC-131271	2,38	11,22	4,72	14,57	0,72

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-131272	0,83	5,54	6,69	24,24	0,82
TCMDC-131277	9,66	10,97	1,14	53,83	1,2
TCMDC-131281	2,15	4,63	2,16	60,07	1,07
TCMDC-131456	1,25	0,07	0,05	36,19	0,31
TCMDC-131549	1,39	5,19	3,72	20,39	1,17
TCMDC-131551	2,05	4,27	2,08	51,33	0,94
TCMDC-131560	0,72	2,04	2,82	70,55	0,56
TCMDC-131563	0,96	2,11	2,2	21,4	0,19
TCMDC-131564	0,72	4,28	5,97	38,51	0,24
TCMDC-131811	7,87	44,23	5,62	49,82	0,26
TCMDC-131816	2,61	43,18	16,52	67,07	0,57
TCMDC-131819	4,75	36,73	7,73	65,32	0,22
TCMDC-131821	2,51	13,96	5,55	63,54	0,4
TCMDC-132012	0,9	6,84	7,62	19,39	1
TCMDC-132044	1,3	7,96	6,15	6,14	0,9
TCMDC-132052	0,48	2,46	5,11	35,74	0,87
TCMDC-132053	1,09	1,23	1,13	-3,89	0,15
TCMDC-132055	1,22	4,27	3,49	19,03	0,93
TCMDC-132061	2,56	4,68	1,82	13,62	0,97
TCMDC-132064	2,05	4,68	2,28	27,4	1,11
TCMDC-132066	1,46	4,57	3,13	24,7	0,73
TCMDC-132088	2,1	7,76	3,69	76,89	0,99
TCMDC-132093	1,02	3,89	3,81	10,41	0,61
TCMDC-132121	0,73	4,58	6,3	7,46	0,86
TCMDC-132174	2,1	13,04	6,21	47,8	1,12
TCMDC-132215	2,54	6,03	2,38	9,62	0,62
TCMDC-132217	1,29	5,5	4,26	18,03	0,75
TCMDC-132219	2,63	5,13	1,95	-1,59	0,32
TCMDC-132234	2,27	5,83	2,56	1,19	0,59
TCMDC-132241	3,1	6,46	2,08	3,92	0,66
TCMDC-132243	1,83	5,31	2,9	16,13	0,7
TCMDC-132248	1,99	5,89	2,95	20,6	0,58
TCMDC-132251	2,7	7,17	2,65	24,03	0,77
TCMDC-132253	1,75	5,5	3,13	-2,81	0,23
TCMDC-132258	1,39	5,31	3,82	59,91	0,19
TCMDC-132266	1,95	6,03	3,1	7,12	0,72
TCMDC-132301	0,44	3,76	8,5	70,53	1,28
TCMDC-132580	1,94	7,42	3,83	1,45	0,84
TCMDC-132598	1,36	20,42	15,04	51,32	0,89

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-132809	0,47	14,79	31,75	36,48	0,44
TCMDC-132811	0,83	14,65	17,69	-6,09	0,26
TCMDC-132813	2,16	18,09	8,37	13,49	0,72
TCMDC-132814	1,02	8,32	8,12	6,11	0,16
TCMDC-132838	1,28	6,1	4,75	-8,87	0,6
TCMDC-132862	3	12,88	4,3	-0,18	0,91
TCMDC-132864	1,71	12,31	7,18	10,3	1,03
TCMDC-132865	1,41	16,43	11,65	-10,3	1,12
TCMDC-132870	1,53	14,29	9,35	8,77	1,15
TCMDC-132871	1,22	6,61	5,42	0,88	0,94
TCMDC-132872	1,79	8,81	4,93	-15,41	0,86
TCMDC-133142	2,18	3,09	1,42	6,7	0,75
TCMDC-133143	1,36	2,88	2,13	11,85	0,87
TCMDC-133144	1,67	4,63	2,77	3,15	0,93
TCMDC-133229	1,4	3,43	2,46	-42,33	0,12
TCMDC-133343	0,39	41,69	106,15	57,73	0,1
TCMDC-133556	2,49	3,99	1,6	22,02	0,31
TCMDC-133842	1,09	2,44	2,23	4,02	0,14
TCMDC-133882	1,3	4,07	3,14	1,53	0,15
TCMDC-133919	2,11	6,04	2,87	3,62	0,14
TCMDC-133924	1,7	3,94	2,31	11,89	0,13
TCMDC-133940	1,88	4,79	2,54	-4,48	0,14
TCMDC-133941	1,26	4,45	3,54	-7,71	0,15
TCMDC-134083	NA	13,86	NA	-1,32	1,46
TCMDC-134085	0,75	7,17	9,58	-6,2	1,02
TCMDC-134098	1,19	8,13	6,83	17,18	0,53
TCMDC-134115	1,67	0,4	0,24	20,18	0,01
TCMDC-134292	0,66	11,89	18,11	19,42	0,84
TCMDC-134315	2,45	6,88	2,8	71,39	0,59
TCMDC-134435	1,3	5,13	3,93	-4,54	0,91
TCMDC-134436	1,08	9,14	8,46	-11,71	0,99
TCMDC-134437	1,37	6,24	4,56	7,5	1,66
TCMDC-134438	0,6	6,53	10,89	-9,36	0,75
TCMDC-134439	1,37	11,51	8,39	2,89	1,39
TCMDC-134440	0,71	5,85	8,27	-6,6	1,25
TCMDC-134441	0,69	9,77	14,18	-17,21	1,24
TCMDC-134442	0,95	6,39	6,75	-16,04	1,03
TCMDC-134443	0,83	9,3	11,22	-4,04	0,56
TCMDC-134444	1,32	6,61	5,01	0,99	0,9

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	%Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-134445	1,01	6,17	6,08	-16,96	0,86
TCMDC-134446	0,99	7,42	7,5	-13,17	1,16
TCMDC-134447	0,65	5,78	8,84	-7,16	1,18
TCMDC-134448	1,2	7,67	6,39	-14,62	1,15
TCMDC-134449	0,6	7,24	11,99	-20,17	0,99
TCMDC-134483	1,65	16,22	9,83	-4,13	0,61
TCMDC-134484	2,26	18,87	8,35	-3,56	1,18
TCMDC-134485	0,89	16,03	18,01	2,16	0,8
TCMDC-134486	1,56	8,18	5,26	-14,11	0,84
TCMDC-134563	1,26	6,17	4,88	-20,83	0,44
TCMDC-134683	1,46	0,67	0,46	-0,61	0,28
TCMDC-134684	2,26	1,93	0,85	22,14	0,46
TCMDC-134690	1,31	1,91	1,46	15,06	0,32
TCMDC-134835	1,85	3,25	1,76	-27,53	0,68
TCMDC-135052	0,74	4,79	6,49	-43,72	0,74
TCMDC-135056	1,6	9,3	5,83	-14,04	1,05
TCMDC-135110	5,22	83,45	15,99	44,31	0,9
TCMDC-135118	4,07	73,68	18,1	42,55	0,85
TCMDC-135229	3,14	21,43	6,82	-6,34	0,87
TCMDC-135234	1,34	18,8	13,98	46,72	0,87
TCMDC-135243	0,35	NA	NA	53,53	0,81
TCMDC-135244	0,06	>100	>1.666,67	87,21	0,9
TCMDC-135281	0,45	1	2,23	66,75	0,87
TCMDC-135458	2,41	10,98	4,56	-48,07	0,77
TCMDC-135462	13,3	>100	>7,52	51,34	0,02
TCMDC-135478	1,67	5,62	3,36	-9,54	0,2
TCMDC-135497	1,42	2,29	1,62	6,5	0,68
TCMDC-135499	1,41	4,32	3,06	-15,92	0,79
TCMDC-135853	2,26	11,79	5,22	76,41	0,13
TCMDC-135867	5,86	4,37	0,74	-0,41	0,76
TCMDC-135917	0,72	21,14	29,44	48,81	1
TCMDC-136152	1,7	10,96	6,43	-4,09	0,83
TCMDC-136179	0,91	5,62	6,15	-5,44	1,05
TCMDC-136191	1,03	7,42	7,2	-19,55	0,78
TCMDC-136193	1,18	80,36	68,35	-8,58	0,94
TCMDC-136244	1,15	5,15	4,48	-6,5	0,98
TCMDC-136246	1,36	6,1	4,47	-16,91	NA
TCMDC-136302	1,84	11,78	6,39	3,27	1,07
TCMDC-136456	1,54	3,85	2,5	0,56	0,89

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010 <sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-136642	1,51	14,29	9,46	21,11	0,75
TCMDC-136658	1,46	26,82	18,37	-1,42	0,45
TCMDC-136727	1,4	4,17	2,97	13,26	1,05
TCMDC-137239	1,85	5,01	2,71	-13,43	1,01
TCMDC-137259	1,32	1,64	1,24	81,19	0,09
TCMDC-137281	0,4	2,29	5,69	94,34	1,13
TCMDC-137282	0,2	1,66	8,19	91,27	0,65
TCMDC-137317	1,01	2,09	2,08	88,24	0,43
TCMDC-137319	0,89	1,86	2,1	88,42	1
TCMDC-137324	0,64	1,68	2,62	95,49	0,38
TCMDC-137340	0,7	1,93	2,75	58,99	0,86
TCMDC-137354	1,04	3,85	3,69	-29,34	0,16
TCMDC-137355	NA	5,59	NA	-18,54	0,28
TCMDC-137442	1,3	18,29	14,1	30,75	0,91
TCMDC-137452	1,05	1,82	1,73	95,86	0,4
TCMDC-137455	1,27	2,16	1,7	92,56	0,92
TCMDC-137456	1,89	6,21	3,28	24,65	1,76
TCMDC-137460	1,97	4,73	2,41	11,49	0,18
TCMDC-137502	1,67	3,67	2,2	1,18	0,7
TCMDC-137529	0,58	2	3,42	15,83	0,32
TCMDC-137631	0,72	1,82	2,52	16,64	0,58
TCMDC-137723	3,49	5,07	1,45	67,71	0,61
TCMDC-137734	5,6	70,79	12,64	2,17	0,12
TCMDC-137750	0,85	1,5	1,77	35,04	0,12
TCMDC-137751	1,02	1,15	1,13	39,31	0,16
TCMDC-137752	4,42	7,33	1,66	71,86	0,72
TCMDC-137763	1,01	1,82	1,8	93,38	0,41
TCMDC-137771	7,25	14,62	2,02	38,73	0,95
TCMDC-137772	1,91	7,86	4,11	27,62	0,13
TCMDC-137783	0,04	NA	NA	84,85	0,16
TCMDC-137795	0,67	4,62	6,95	13,94	1,11
TCMDC-137796	1,21	3,31	2,73	68,84	0,7
TCMDC-137797	0,59	1,55	2,64	35,46	0,62
TCMDC-137801	1,46	>100	>68,49	-14,95	0,79
TCMDC-137803	11,5	38,02	3,31	57,55	0,73
TCMDC-137810	1,42	0,06	0,04	0,71	0
TCMDC-137813	2,01	1,16	0,57	26,93	0,05
TCMDC-137816	1,09	1,84	1,7	27,96	0,35
TCMDC-137820	1,06	<0,0017	<0,0016	-6,11	0

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	%Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-137825	0,97	2,76	2,85	10,43	1
TCMDC-137827	1,67	2,95	1,77	-6,57	0,76
TCMDC-137832	0,92	4,79	5,19	12,79	0,81
TCMDC-137837	3,69	4,42	1,2	18,68	0,96
TCMDC-137838	1,05	2,92	2,78	77,84	0,78
TCMDC-137840	4,42	2,32	0,52	22,85	0,23
TCMDC-137842	1,24	4,17	3,36	60,27	0,89
TCMDC-137845	0,76	1,97	2,59	95,21	1,05
TCMDC-137848	0,61	1,97	3,22	84,96	0,93
TCMDC-137853	0,63	2,46	3,93	94,02	0,4
TCMDC-137869	0,33	1,78	5,33	96,85	0,17
TCMDC-137906	0,02	NA	NA	77,01	0,25
TCMDC-137908	0,09	5,01	57,08	72,34	0,39
TCMDC-137915	0,7	4,22	5,99	20,95	0,71
TCMDC-137935	1,47	5,62	3,82	1,4	1,3
TCMDC-137939	1,78	2	1,12	5,51	0,28
TCMDC-137940	1,29	6,06	4,71	2,59	0,98
TCMDC-137944	0,62	1,66	2,69	84,05	0,4
TCMDC-137945	1,82	4,9	2,69	-15,51	0,82
TCMDC-137950	0,64	1,72	2,69	95,44	0,48
TCMDC-137952	0,61	2,16	3,53	94,33	0,92
TCMDC-137953	1	2,11	2,12	2,77	0,92
TCMDC-137958	1,18	4,62	3,92	-6,18	0,94
TCMDC-137961	0,48	2,14	4,44	90,63	0,45
TCMDC-137963	1,5	2,4	1,6	77,54	1,06
TCMDC-137965	0,95	1,91	2,01	37,88	0,61
TCMDC-137966	1,03	2	1,93	42,35	0,79
TCMDC-137972	0,81	2,19	2,69	92,14	0,69
TCMDC-137975	1,49	2,21	1,48	37,85	0,87
TCMDC-137976	1,13	2,87	2,53	85,21	0,18
TCMDC-137977	0,77	1,86	2,42	65,65	0,11
TCMDC-137984	0,26	2,12	8,21	79,78	0,16
TCMDC-138006	0,99	3,43	3,48	-22,37	0,21
TCMDC-138015	0,64	3,35	5,26	57,24	0,16
TCMDC-138022	1,14	44,67	39,21	32,02	0,77
TCMDC-138075	0,7	4,57	6,57	-3,08	0,37
TCMDC-138079	3,89	NA	NA	44,6	0,27
TCMDC-138155	1,68	7,62	4,54	5,13	0,22
TCMDC-138172	0,98	6,24	6,38	67,05	0,72

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-138177	4,73	6,82	1,44	-19,05	0,12
TCMDC-138186	0,99	5,89	5,94	69,9	0,53
TCMDC-138205	0,54	1,27	2,35	46,13	0,11
TCMDC-138226	3,11	4,42	1,42	17,07	0,25
TCMDC-138237	1,58	14,13	8,95	12,64	0,65
TCMDC-138391	1,71	0,89	0,52	2,24	0,21
TCMDC-138393	0,64	5,62	8,82	87,52	0,64
TCMDC-138394	1,91	12,05	6,32	1,31	0,28
TCMDC-138399	1,56	5,69	3,66	14,3	0,28
TCMDC-138416	7,02	6,1	0,87	39,96	0,11
TCMDC-138426	2,05	5,37	2,62	16,13	0,42
TCMDC-138493	0,82	3,98	4,88	38,43	0,23
TCMDC-138494	6,86	18,51	2,7	35,38	0,76
TCMDC-138546	1,96	13,18	6,73	-1,96	0,87
TCMDC-138557	0,26	13,96	53,35	35,72	0,78
TCMDC-138616	0,98	4,68	4,77	13,07	0,76
TCMDC-138645	1,49	3,8	2,55	-0,21	0,24
TCMDC-138667	0,62	5,96	9,58	-11,45	0,14
TCMDC-138677	0,36	2,29	6,36	95,5	0,34
TCMDC-138703	2,25	5,37	2,38	-4,57	1,39
TCMDC-138716	0,85	4,92	5,79	21,96	0,13
TCMDC-138718	0,89	4,22	4,74	12,29	0,15
TCMDC-138721	0,91	6,1	6,71	31,66	0,19
TCMDC-138754	1,05	4,9	4,67	90,89	0,14
TCMDC-138757	0,1	1,43	14,62	99,68	0,09
TCMDC-138768	1,98	5,39	2,72	-10,59	0,45
TCMDC-138818	1,38	4,95	3,6	1,63	0,78
TCMDC-138845	1,8	4,68	2,59	-6,33	0,21
TCMDC-138849	1,03	4,79	4,67	8,4	0,79
TCMDC-138852	0,88	4,8	5,47	30,37	0,75
TCMDC-138856	1,47	2,69	1,83	5,55	0,44
TCMDC-138859	1,46	3,43	2,35	3,05	0,46
TCMDC-138913	1,17	5,5	4,71	75,13	1,07
TCMDC-138933	0,76	4,95	6,53	0,89	0,17
TCMDC-138958	1,23	2,75	2,23	38,17	0,83
TCMDC-138967	0,52	1,64	3,17	95,79	0,62
TCMDC-138968	1,43	33,25	23,25	21,53	0,35
TCMDC-139007	1,41	4,43	3,14	-8,09	0,6
TCMDC-139020	1,06	6,03	5,68	-4,19	0,18

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-139047	1,44	5,62	3,91	-20,32	0,73
TCMDC-139056	2,38	5,42	2,28	-10,66	0,25
TCMDC-139074	0,59	3,63	6,2	88,85	0,66
TCMDC-139082	0,14	58,9	411,98	65,26	0,28
TCMDC-139087	0,09	40,74	437,61	64,05	0,16
TCMDC-139089	0,15	42,76	284,85	71,66	0,52
TCMDC-139099	0,58	10,98	18,85	51,9	0,62
TCMDC-139105	5,34	35,91	6,73	33,6	0,68
TCMDC-139204	1,8	2,24	1,24	31,13	0,06
TCMDC-139270	0,69	3,99	5,75	1,67	0,51
TCMDC-139334	1	2,63	2,63	41,15	0,4
TCMDC-139335	2,69	5,37	2	-7,69	0,67
TCMDC-139377	0,86	2,6	3,01	0,87	0,09
TCMDC-139548	1,09	3,09	2,84	18,16	0,51
TCMDC-139607	1,6	NA	NA	90,02	0,6
TCMDC-139610	3,63	NA	NA	83,54	1,09
TCMDC-139611	1,82	NA	NA	88,95	0,94
TCMDC-139632	0,12	62,72	529,58	67,82	0,2
TCMDC-139648	NA	3,94	NA	12,15	0,69
TCMDC-139659	0,86	2,26	2,62	-0,7	0,7
TCMDC-139678	0,81	2,85	3,52	14,97	0,78
TCMDC-139725	0,03	2,26	77,95	93,92	0,12
TCMDC-139790	1,01	4,13	4,1	57,11	0,57
TCMDC-139797	1,84	4,37	2,37	-2,49	0,77
TCMDC-139800	1,39	2,55	1,83	20,09	0,95
TCMDC-139805	1,39	3,24	2,33	17,68	0,54
TCMDC-139810	0,86	4,03	4,67	-5,12	0,45
TCMDC-139817	1,86	4,9	2,63	8,71	0,77
TCMDC-139866	1,12	1,97	1,76	18,31	0,33
TCMDC-139867	2,07	4,17	2,02	10,73	0,35
TCMDC-139875	0,73	5,89	8,04	9,45	0,21
TCMDC-140009	1,83	3,31	1,8	-9,24	0,45
TCMDC-140011	1,68	4,9	2,92	1,03	0,87
TCMDC-140017	0,2	1,12	5,62	85,16	0,04
TCMDC-140020	1,51	1,46	0,97	8,01	0,74
TCMDC-140061	1,77	5,89	3,33	-11,62	0,7
TCMDC-140062	1,29	8,13	6,29	-11,87	0,74
TCMDC-140064	0,69	12,59	18,13	-8,6	0,73
TCMDC-140074	0,87	5,32	6,11	-2,94	0,73

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010 <sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-140112	1,38	12,59	9,15	8,03	0,16
TCMDC-140114	1,74	13,49	7,76	-7,41	0,26
TCMDC-140123	1,58	3,55	2,25	17,75	0,88
TCMDC-140133	1,97	6,24	3,16	-6,84	0,98
TCMDC-140182	1,65	5,5	3,33	21,09	0,65
TCMDC-140369	0,94	2,16	2,31	-0,49	0,76
TCMDC-140406	1,38	6,61	4,77	-10,77	0,75
TCMDC-140476	1,64	1,51	0,92	-1,87	0,79
TCMDC-140544	1,36	7,7	5,67	0,64	0,75
TCMDC-140549	1,01	11,63	11,51	-11,46	0,6
TCMDC-140568	1,71	5,98	3,5	-8,58	0,72
TCMDC-140643	1,91	7,92	4,15	22,5	0,78
TCMDC-140677	0,86	3,94	4,58	11,13	0,19
TCMDC-140680	0,84	45,82	54,47	-3,29	0,96
TCMDC-140699	0,9	4,79	5,34	23,62	0,31
TCMDC-140700	1,91	13,36	6,98	-6,01	1
TCMDC-140737	0,56	5,48	9,76	-13,51	0,68
TCMDC-140741	1,21	13,81	11,45	46,8	1,06
TCMDC-140744	0,73	14,3	19,59	-0,88	0,11
TCMDC-140762	0,88	13,52	15,32	-1,34	0,74
TCMDC-140773	1,92	9,47	4,94	8,96	1,09
TCMDC-140775	2	13,96	6,99	-11,19	0,71
TCMDC-140777	2,44	8,95	3,67	10,64	0,53
TCMDC-140964	0,87	9,69	11,15	69,6	0,96
TCMDC-141060	1,21	32,74	27,1	-7,24	1,27
TCMDC-141070	0,53	28,96	54,3	-0,73	0,73
TCMDC-141079	1,58	38,91	24,69	-6,33	0,84
TCMDC-141154	0,21	11,9	56,01	-10,5	0,74
TCMDC-141171	1,73	5,25	3,03	10,47	0,19
TCMDC-141334	0,42	9,98	23,95	-5	1,14
TCMDC-141372	2,01	1,82	0,91	-21,03	0,72
TCMDC-141381	0,2	5,01	25,16	40,68	0,16
TCMDC-141444	1,98	5,19	2,62	26,17	1,22
TCMDC-141586	1,7	2,82	1,66	39,06	0,13
TCMDC-141610	1,47	4,62	3,14	-9,33	0,29
TCMDC-141611	0,87	4,9	5,61	-15,14	0,86
TCMDC-141697	0,99	7,25	7,3	-13,94	0,67
TCMDC-141698	0,44	4,79	10,79	-7,4	0,68
TCMDC-141699	4,91	4,22	0,86	-8,75	1,38

**Tabla suplementaria 1 (cont.).** Parámetros biológicos de los 405 hits del TCAMS confirmados tras el cribado de la colección con el ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) gametocitos <i>Pf</i> FGAA	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Índice de selectividad	% Inhibición ATP (2μM) gametocitos	*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales
TCMDC-141753	2	4,37	2,18	-0,04	1,01
TCMDC-141754	0,97	2,23	2,3	6,66	0,96
TCMDC-141804	3,61	12,59	3,49	82,21	0,19
TCMDC-141924	1,73	7,86	4,53	-4,47	0,63
TCMDC-141931	1,09	22,9	20,98	22,47	0,7
TCMDC-141973	0,04	19,05	487,84	100,49	0,81
TCMDC-141982	1,59	2,14	1,35	1,96	0,15
TCMDC-141987	0,9	4,27	4,74	0,38	0,92
TCMDC-141992	11,88	0,52	0,04	55,55	1,05
TCMDC-142186	4,15	5,82	1,4	36,65	0,31
TCMDC-142207	1,22	12,17	9,97	-8,55	1
TCMDC-142233	1,17	1,78	1,51	-7,78	0,77
TCMDC-142257	5,25	77,62	14,77	23,41	0,76
TCMDC-142289	0,78	4,52	5,83	70,94	0,14
TCMDC-142311	0,36	>100	>277,78	58,25	0,06

**Tabla suplementaria 2.** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
2	19	TCMDC-134435	486,6	6,8
		TCMDC-134436	436,6	6,1
		TCMDC-134437	436,6	6,1
		TCMDC-134438	453	6,6
		TCMDC-134439	448,6	5,9
		TCMDC-134440	461,7	6,1
		TCMDC-134441	500,6	7,2
		TCMDC-134442	500,6	7,2
		TCMDC-134443	450,6	6,5
		TCMDC-134444	450,6	6,5
		TCMDC-134445	467,1	6,8
		TCMDC-134446	467,1	7
		TCMDC-134447	462,7	6,3
		TCMDC-134448	460,7	7
		TCMDC-134449	475,7	6,5
		TCMDC-134483	512,5	6,3
		TCMDC-134484	462,5	5,5
		TCMDC-134485	479	6,1
		TCMDC-134486	487,6	5,6
3	22	TCMDC-132811	486,5	6
		TCMDC-132813	432,6	5,5
		TCMDC-132864	479,5	5,9
		TCMDC-132865	479,5	5,9
		TCMDC-132871	479,5	5,9
		TCMDC-132872	479,5	5,9
		TCMDC-133842	533,6	6,8
		TCMDC-133882	547,7	7,6
		TCMDC-133924	496,7	8
		TCMDC-133940	496,7	8
		TCMDC-133941	546,7	8,8
		TCMDC-132809	438,6	5,6
		TCMDC-132814	492,6	6,1
		TCMDC-132838	430,5	5,8
		TCMDC-132862	485,6	6
		TCMDC-132870	431,6	5,5
		TCMDC-133919	484,7	7,5
		TCMDC-132174	489	6,8
		TCMDC-133229	526,4	7,7
TCMDC-133556	522,7	6,2		

**Tabla suplementaria 2 (cont.).** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
3	22	TCMDC-125758	277,3	3,4
		TCMDC-141586	374,1	5,1
4	12	TCMDC-140369	342,8	2,2
		TCMDC-140549	413	4,2
		TCMDC-140680	387,3	2,4
		TCMDC-140700	466	2,8
		TCMDC-140744	535	3,9
		TCMDC-140762	356,9	2,3
		TCMDC-141060	439,9	2,2
		TCMDC-141070	454	2,8
		TCMDC-141079	454	2,8
		TCMDC-141154	382,9	3,5
5	8	TCMDC-141334	342,8	3,3
		TCMDC-141381	465,5	4,9
		TCMDC-124811	422,6	3,7
		TCMDC-135281	474,5	3,2
		TCMDC-123680	413,5	2,6
		TCMDC-136152	548	5,5
		TCMDC-136179	581,6	5,9
6	8	TCMDC-136191	553,6	5,6
		TCMDC-136193	548	5,5
		TCMDC-136246	571,7	5,3
		TCMDC-138155	593,7	5
		TCMDC-138177	561,6	5,9
		TCMDC-138186	545,4	5,1
		TCMDC-138716	565,6	6,1
		TCMDC-138718	532	5,9
7	18	TCMDC-138721	555,6	5,2
		TCMDC-138754	579,7	4,8
		TCMDC-138757	551,6	6,6
		TCMDC-124255	382,5	6,3
		TCMDC-123915	398,5	4,9
		TCMDC-137460	442	8,5
		TCMDC-138079	428,5	4,5
		TCMDC-139204	409,6	7,8
		TCMDC-137354	552,7	11,4
TCMDC-137355	642,7	11,1		
TCMDC-137734	540,7	10,1		

**Tabla suplementaria 2 (cont.).** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
7	18	TCMDC-138933	359,2	4,9
		TCMDC-139056	401,5	7
		TCMDC-142289	584,2	5,9
		TCMDC-139335	348,4	4,1
		TCMDC-139377	413,3	5,3
		TCMDC-142186	378,5	7,2
		TCMDC-142207	395,5	5
		TCMDC-125004	347,4	4,2
		TCMDC-134315	357,5	3,1
		TCMDC-125835	258,7	4,2
8	16	TCMDC-140061	512,5	5
		TCMDC-140062	526,5	5,6
		TCMDC-140064	526,5	6
		TCMDC-140074	497,5	5,3
		TCMDC-140112	554,5	5,2
		TCMDC-140114	568,5	6,1
		TCMDC-140133	512,5	4,8
		TCMDC-138845	574,7	5,7
		TCMDC-138849	601,8	6,8
		TCMDC-138852	644,8	8,2
		TCMDC-138856	632,8	5,9
		TCMDC-139047	439,6	5,8
		TCMDC-136244	471,7	6,3
		TCMDC-140182	552,8	7
TCMDC-140737	502,7	7,1		
		TCMDC-141171	480,4	6,1
9	6	TCMDC-131549	497,1	4,6
		TCMDC-131551	605,6	7,7
		TCMDC-131560	593,6	7,4
		TCMDC-131563	679,7	8,1
		TCMDC-131564	643,3	9,2
		TCMDC-139334	693,7	8,7
10	13	TCMDC-132215	475,7	5,2
		TCMDC-132241	475,7	5,2
		TCMDC-132243	489,7	5,7
		TCMDC-132248	505,7	4,6
		TCMDC-132251	535,7	4,4
		TCMDC-132266	523,7	5,1

**Tabla suplementaria 2 (cont.).** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
10	13	TCMDC-132217	481,7	5,3
		TCMDC-132234	481,7	5,3
		TCMDC-132253	485,7	3,3
		TCMDC-132258	511,7	4,7
		TCMDC-133142	407,6	5
		TCMDC-133143	429,6	5,2
		TCMDC-133144	407,6	4,8
11	6	TCMDC-132580	494,6	3,7
		TCMDC-141697	543,1	4,5
		TCMDC-141698	529	4,4
		TCMDC-141699	529	4,4
		TCMDC-141924	543,1	4,5
		TCMDC-141931	543,1	3,8
12	5	TCMDC-125421	339,4	3,8
		TCMDC-125420	353,4	4,1
		TCMDC-123786	333,4	1
		TCMDC-125826	268,4	3,9
		TCMDC-125825	294,4	4,4
		TCMDC-124453	268,4	3,6
13	6	TCMDC-125247	394,5	4,3
		TCMDC-124602	284,4	3,6
		TCMDC-124542	295,4	2,3
		TCMDC-124514	298,4	3,7
		TCMDC-125539	301,4	4,2
		TCMDC-123993	295,4	2,4
14	6	TCMDC-125565	383,5	5,3
		TCMDC-125559	396,3	5,2
		TCMDC-123691	420,9	4,6
		TCMDC-123884	362,5	4,7
		TCMDC-123605	334,4	3,7
		TCMDC-123997	410,3	5,6
15	6	TCMDC-139790	622,2	7,6
		TCMDC-139800	568,6	7,6
		TCMDC-139805	598,2	7,2
		TCMDC-139810	574,6	7,5
		TCMDC-139866	554,2	7,4
		TCMDC-139867	526,1	6,5
17	5	TCMDC-132012	435,6	6,3

**Tabla suplementaria 2 (cont.).** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
17	5	TCMDC-138494	504,7	5,7
		TCMDC-137771	389,5	6,2
		TCMDC-135110	384,8	5,2
		TCMDC-135118	380,4	4,4
18	5	TCMDC-125432	462,5	3,8
		TCMDC-125345	341,4	2,9
		TCMDC-123868	366,3	3,4
		TCMDC-124559	476,6	4,3
		TCMDC-124436	399,9	4,1
19	6	TCMDC-134083	408	3,4
		TCMDC-134085	435,6	3,6
		TCMDC-139797	624,7	7,4
		TCMDC-141753	554,1	6,7
		TCMDC-141754	568,2	7,2
		TCMDC-132219	467,6	4,4
20	5	TCMDC-134563	633,8	4,5
		TCMDC-138645	560,1	6,1
		TCMDC-138703	578,1	5,1
		TCMDC-138768	647,8	8,7
		TCMDC-138859	590,8	6
21	5	TCMDC-138391	438,9	6,3
		TCMDC-138393	437,9	6,3
		TCMDC-138394	436,9	6,3
		TCMDC-138399	478,6	7,4
		TCMDC-138426	493,6	6,5
23	8	TCMDC-125149	394,4	2,7
		TCMDC-124316	392,8	3,1
		TCMDC-124315	386,4	3,4
		TCMDC-124311	406,8	3,6
		TCMDC-124805	382,3	3,7
		TCMDC-124787	367,4	3,2
		TCMDC-124799	445,4	4,3
		TCMDC-123657	397,8	4,9
24	4	TCMDC-136456	409,4	3,7
		TCMDC-139607	587,5	8,3
		TCMDC-139610	612,6	9,5
		TCMDC-139611	594,7	8,6
25	8	TCMDC-137840	310,7	3,3

**Tabla suplementaria 2 (cont.).** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
25	8	TCMDC-137976	306,3	2,3
		TCMDC-137977	331,4	5,2
		TCMDC-137984	332,4	4,7
		TCMDC-141982	348,2	3,734
		TCMDC-137810	307,3	3,2
		TCMDC-137813	365,4	5
		TCMDC-137820	314,3	2,5
26	9	TCMDC-125522	325,2	4
		TCMDC-125521	274,3	2,8
		TCMDC-125487	304,8	3,9
		TCMDC-123475	208,3	1,2
		TCMDC-137783	250,4	2,4
		TCMDC-137906	274,3	2
		TCMDC-124263	290,3	1,6
		TCMDC-124262	248,3	1,3
		TCMDC-125752	272,4	2,4
27	3	TCMDC-134115	442,5	4
		TCMDC-138616	523,7	6,1
		TCMDC-141372	421,5	4,3
28	3	TCMDC-134835	350,4	3,6
		TCMDC-135052	391,3	4
		TCMDC-135056	396,3	3,6
29	3	TCMDC-135497	544,8	6,6
		TCMDC-135499	544,8	6,1
		TCMDC-135867	475,6	5,3
30	5	TCMDC-125540	328,4	4,1
		TCMDC-124550	354,4	4,5
		TCMDC-125854	268,3	3,1
		TCMDC-123767	358,7	2,7
		TCMDC-135234	385,8	3,8
32	3	TCMDC-138205	446,5	5,5
		TCMDC-138416	463	7,5
		TCMDC-138493	489,6	6,6
34	3	TCMDC-140406	650,3	7
		TCMDC-140741	700,8	8
		TCMDC-140964	718,8	8,1
35	3	TCMDC-141610	574,6	5,4
		TCMDC-141611	603,6	3,8

**Tabla suplementaria 2 (cont.).** Clasificación química de los 308 compuestos del TCAMS priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
35	3	TCMDC-141804	543,6	6,9
36	2	TCMDC-132121	420,5	3
		TCMDC-132301	427,5	4
37	3	TCMDC-123811	281,2	4,2
		TCMDC-123805	276,7	3,4
		TCMDC-137801	278,1	3,5
38	2	TCMDC-125237	296,8	3,7
		TCMDC-124617	383,7	4,3
39	2	TCMDC-124958	418,5	4,8
		TCMDC-138006	611,7	11,1
40	2	TCMDC-134683	368,9	4,1
		TCMDC-136642	414,5	4,2
41	2	TCMDC-135229	635,6	6,8
		TCMDC-138667	558,7	7,8
42	2	TCMDC-135243	337,4	2,4
		TCMDC-135244	336,4	3
43	3	TCMDC-135458	563,1	7,2
		TCMDC-135478	535	4,9
		TCMDC-138913	499,6	5,2
44	2	TCMDC-123865	492,5	3,8
		TCMDC-138237	630,7	10,8
45	2	TCMDC-137239	766,5	8
		TCMDC-137259	684,4	7,9
48	2	TCMDC-139548	569,4	9,1
		TCMDC-142233	391,8	5,4
49	2	TCMDC-139725	428,5	5,4
		TCMDC-140699	568,7	4,2
50	2	TCMDC-139817	508,8	8,5
		TCMDC-139875	425,7	6,5
51	2	TCMDC-140011	336,4	4,9
		TCMDC-140123	302,8	4,3
52	2	TCMDC-140017	410,6	5,4
		TCMDC-140020	433,6	6,1
53	3	TCMDC-140777	399,6	3,9
		TCMDC-140773	405,6	4,4
		TCMDC-140775	395,5	4,3
54	4	TCMDC-140568	566,8	5,7
		TCMDC-140643	456,7	4,5

Tabla suplementaria 2 (cont.). Clasificación química de los 308 compuestos priorizados.

<i>Cluster</i>	Nº compuestos	Compuesto	Peso molecular	clogP
54	4	TCMDC-141444	523,8	7,6
		TCMDC-140544	550,8	6
55	2	TCMDC-138022	410,5	4,6
		TCMDC-125836	271,4	1,4
56	2	TCMDC-125592	417,1	6,8
		TCMDC-124533	453,3	5
57	2	TCMDC-138546	493	4,7
		TCMDC-138557	430,9	6,1
58	1	TCMDC-134098	603,7	5,8
59	1	TCMDC-132598	440,3	2,9
60	1	TCMDC-133343	370,4	1,9
61	1	TCMDC-123899	426,9	6,8
62	1	TCMDC-134292	420	5
63	1	TCMDC-124940	441,5	3,9
64	1	TCMDC-124851	402,5	4
65	1	TCMDC-124677	427,6	4,2
66	1	TCMDC-135462	373,8	4,5
67	1	TCMDC-135853	331,4	3,2
68	1	TCMDC-123754	460,2	4,4
69	1	TCMDC-123745	358,8	3,4
70	1	TCMDC-135917	380,4	0,9
71	1	TCMDC-136302	405,9	4,4
72	1	TCMDC-136658	466,5	3
73	1	TCMDC-136727	531	4,9
74	1	TCMDC-137442	255,4	4,8
75	1	TCMDC-138172	188,2	0,1
76	1	TCMDC-124172	347,4	4,9
77	1	TCMDC-138677	234,3	2,1
78	1	TCMDC-138818	512	6,4
79	1	TCMDC-124011	329,6	4,5
80	1	TCMDC-138968	448,6	6,8
81	1	TCMDC-139074	303,4	4,6
82	1	TCMDC-139099	351,4	5,6
83	1	TCMDC-139270	558	6
84	1	TCMDC-140476	486,7	3,3
85	1	TCMDC-140677	608,4	8,5
86	1	TCMDC-141973	231,3	-0,4
87	1	TCMDC-141992	172,2	1,2
88	1	TCMDC-142257	464,6	5,3
89	1	TCMDC-142311	445,5	2,5
90	1	TCMDC-123493	471,5	1,1

**Tabla suplementaria 3.** Parámetros biológicos de los 90 compuestos caracterizados con los diferentes formatos del ensayo *PfFGAA*. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	Cluster	IC <sub>50</sub> (μM) en el <i>PfFGAA</i>			*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales <i>Pf</i>	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Clasificación
		0h	24h	48h			
TCMDC-134486	2	>20	2,56	1,56	0,84	8,18	LENTO
TCMDC-134483	2	>20	2,45	1,65	0,61	16,22	LENTO
TCMDC-134484	2	>20	2,82	2,26	1,18	18,87	LENTO
TCMDC-134485	2	>20	12,02	0,89	0,8	16,03	LENTO
TCMDC-134439	2	>20	3,22	1,37	1,39	11,51	LENTO
TCMDC-132809	3	5,14	1,17	0,47	0,44	14,79	RÁPIDO
TCMDC-132870	3	>20	18,84	1,53	1,15	14,29	LENTO
TCMDC-132813	3	4,35	0,21	2,16	0,72	18,09	RÁPIDO
TCMDC-132865	3	>20	>20	1,41	1,12	16,43	LENTO
TCMDC-140744	4	10,64	0,23	0,73	0,11	14,3	RÁPIDO
TCMDC-141154	4	0,25	0,41	0,21	0,53	11,9	GAMETO
TCMDC-141070	4	1,77	1,68	0,53	0,73	28,96	GAMETO
TCMDC-141079	4	2,06	2,48	1,58	0,84	38,91	GAMETO
TCMDC-140549	4	0,51	3,56	1,01	0,6	11,63	GAMETO
TCMDC-140680	4	0,49	0,79	0,84	0,39	45,82	GAMETO
TCMDC-140700	4	1,61	4,68	1,91	1	13,36	GAMETO
TCMDC-140762	4	0,61	1,06	0,88	0,74	13,52	GAMETO
TCMDC-136152	5	>20	6,65	1,7	0,83	10,96	LENTO
TCMDC-136191	5	>20	6,46	1,03	0,78	7,42	LENTO
TCMDC-138721	6	13,49	1,88	0,91	0,19	6,1	RÁPIDO
TCMDC-138933	7	8,17	3,91	0,76	0,17	4,95	LENTO
TCMDC-142207	7	6,42	4,97	1,22	0,17	12,17	LENTO
TCMDC-140064	8	>20	6,18	0,69	0,73	12,59	LENTO
TCMDC-140112	8	13,13	14,19	1,38	0,16	12,59	LENTO
TCMDC-140114	8	>20	15,53	1,74	0,26	13,49	LENTO
TCMDC-131564	9	>20	2,89	0,72	0,24	4,28	LENTO
TCMDC-132217	10	>20	5,37	1,29	0,75	5,5	LENTO
TCMDC-141698	11	1,93	0,44	0,44	0,67	4,79	GAMETO
TCMDC-125247	13	>20	>20	0,49	0,26	89,13	LENTO
TCMDC-124602	13	14,37	>20	0,24	0,66	>100	LENTO
TCMDC-123993	13	>20	0,77	0,73	0,66	32,3	RÁPIDO
TCMDC-123605	14	3,99	1	1,73	0,96	9,22	RÁPIDO
TCMDC-139810	15	>20	9,9	0,86	0,45	4,03	LENTO
TCMDC-123868	18	2,14	0,14	1,16	1,06	37,44	GAMETO
TCMDC-124559	18	NA	0,5	0,34	1,32	50,12	RÁPIDO
TCMDC-125345	18	4,95	0,96	0,36	0,56	39,82	RÁPIDO
TCMDC-125432	18	>20	0,7	1,07	0,83	29,22	RÁPIDO

**Tabla suplementaria 3 (cont.).** Parámetros biológicos de los 90 compuestos caracterizados con los diferentes formatos del ensayo PpFGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	Cluster	IC <sub>50</sub> (μM) en el PpFGAA			*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales <i>Pf</i>	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Clasificación
		0h	24h	48h			
TCMDC-134085	19	>20	1,98	0,75	1,02	7,17	RÁPIDO
TCMDC-132219	19	>20	12,19	2,63	0,32	5,13	LENTO
TCMDC-134563	20	>20	5,88	1,26	0,44	6,17	LENTO
TCMDC-138394	21	>20	10,01	1,91	0,28	12,05	LENTO
TCMDC-125149	23	>20	1,25	1,31	0,97	>100	RÁPIDO
TCMDC-124787	23	>20	0,88	2,12	0,75	28,85	RÁPIDO
TCMDC-124316	23	>20	1,38	1,1	0,98	41,96	RÁPIDO
TCMDC-124315	23	>20	2,82	1,12	0,82	37,65	LENTO
TCMDC-124311	23	>20	1,5	1,44	0,32	25,79	RÁPIDO
TCMDC-136456	24	>20	3,33	1,54	0,89	3,85	LENTO
TCMDC-137820	25	8,15	1,91	1,06	0	<0.0017	RÁPIDO
TCMDC-124263	26	0,85	0,49	0,24	0,91	NA	GAMETO
TCMDC-135052	28	15,14	2,57	0,74	0,74	4,79	LENTO
TCMDC-135499	29	12,3	5,74	1,41	0,79	4,32	LENTO
TCMDC-123767	30	>20	>20	0,16	0,27	>100	LENTO
TCMDC-138493	32	2,27	2,58	0,82	0,23	3,98	GAMETO
TCMDC-140406	34	>20	9,4	1,38	0,75	6,61	LENTO
TCMDC-141611	35	11,35	11,14	0,87	0,86	4,9	LENTO
TCMDC-132121	36	7,08	7,16	0,73	0,86	4,58	LENTO
TCMDC-137801	37	>20	2,29	1,46	0,79	>100	RÁPIDO
TCMDC-123811	37	>20	3,25	1,57	0,46	94,46	LENTO
TCMDC-125237	38	>20	1,57	1,87	0,75	10,6	RÁPIDO
TCMDC-124617	38	>20	>20	0,72	1,51	4,37	LENTO
TCMDC-124958	39	10,12	2,16	1,08	0,14	11,89	RÁPIDO
TCMDC-135229	41	>20	2,41	3,14	0,87	21,43	LENTO
TCMDC-138667	41	13,16	3,03	0,62	0,14	5,96	LENTO
TCMDC-135458	43	>20	NA	2,41	0,77	10,98	LENTO
TCMDC-138237	44	>20	5,44	1,58	0,65	14,13	LENTO
TCMDC-137239	45	15,14	6,48	1,85	1,01	5,01	LENTO
TCMDC-139548	48	>20	2,22	1,09	0,51	3,09	RÁPIDO
TCMDC-140699	49	0,89	0,14	0,9	0,31	4,79	GAMETO
TCMDC-139875	50	14,37	1,86	0,73	0,21	5,89	RÁPIDO
TCMDC-140011	51	>20	1,87	1,68	0,87	4,9	RÁPIDO
TCMDC-140020	52	>20	3,72	1,51	0,74	1,46	LENTO
TCMDC-141444	54	15,31	6,85	1,98	1,22	5,19	LENTO
TCMDC-138022	55	>20	>20	1,14	0,77	44,67	LENTO
TCMDC-125836	55	3,56	0,3	1,14	0,88	26,14	RÁPIDO

**Tabla suplementaria 3 (cont.).** Parámetros biológicos de los 90 compuestos caracterizados con los diferentes formatos del ensayo *Pf*FGAA. \*Gamo *et al.* 2010<sup>78</sup>.

Compuesto	Cluster	IC <sub>50</sub> (μM) en el <i>Pf</i> FGAA			*IC <sub>50</sub> (μM) estadios asexuales <i>Pf</i>	TOX <sub>50</sub> (μM) células HepG2	Clasificación
		0h	24h	48h			
TCMDC-124533	56	5,64	2,32	1,16	0,47	6,24	LENTO
TCMDC-138546	57	>20	11,22	1,96	0,87	13,18	LENTO
TCMDC-138557	57	2,98	0,4	0,26	0,78	13,96	RÁPIDO
TCMDC-138968	ST	>20	>20	1,43	0,79	33,25	LENTO
TCMDC-136658	ST	>20	12,45	1,46	0,45	26,82	LENTO
TCMDC-142257	ST	>20	1,58	5,25	0,76	77,62	RÁPIDO
TCMDC-138818	ST	>20	1,75	1,38	0,84	4,95	RÁPIDO
TCMDC-134292	ST	>20	17	0,66	0,84	11,89	LENTO
TCMDC-139270	ST	>20	1,54	0,69	1,1	3,99	RÁPIDO
TCMDC-136302	ST	>20	0,51	1,84	0,35	11,78	RÁPIDO
TCMDC-140476	ST	>20	5,7	1,64	1,07	1,51	LENTO
TCMDC-123754	ST	>20	>20	1,16	0,44	2,32	LENTO
TCMDC-123899	ST	>20	>20	0,94	0,31	>100	LENTO
TCMDC-124940	ST	>20	0,41	1,3	0,51	>100	RÁPIDO
TCMDC-124851	ST	2,42	0,71	1,74	1	11,49	RÁPIDO
TCMDC-124677	ST	>20	3,87	1,47	0,23	4,9	LENTO

# Artículos publicados en relación con la tesis

---



# Imaging-Based High-Throughput Screening Assay To Identify New Molecules with Transmission-Blocking Potential against *Plasmodium falciparum* Female Gamete Formation

Celia Miguel-Blanco,<sup>a</sup> Joël Lelièvre,<sup>a</sup> Michael J. Delves,<sup>b</sup> Ana I. Bardera,<sup>c</sup> Jesús L. Presa,<sup>c</sup> María José López-Barragán,<sup>a\*</sup> Andrea Ruecker,<sup>b</sup> Sara Marques,<sup>b</sup> Robert E. Sinden,<sup>b</sup> Esperanza Herreros<sup>a</sup>

Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Madrid, Spain<sup>a</sup>; Department of Life Sciences, Imperial College, London, United Kingdom<sup>b</sup>; Screening and Compound Profiling, Centro de Investigación Básica, GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Madrid, Spain<sup>c</sup>

In response to a call for the global eradication of malaria, drug discovery has recently been extended to identify compounds that prevent the onward transmission of the parasite, which is mediated by *Plasmodium falciparum* stage V gametocytes. Lately, metabolic activity has been used *in vitro* as a surrogate for gametocyte viability; however, as gametocytes remain relatively quiescent at this stage, their ability to undergo onward development (gamete formation) may be a better measure of their functional viability. During gamete formation, female gametocytes undergo profound morphological changes and express translationally repressed mRNA. By assessing female gamete cell surface expression of one such repressed protein, Pfs25, as the readout for female gametocyte functional viability, we developed an imaging-based high-throughput screening (HTS) assay to identify transmission-blocking compounds. This assay, designated the *P. falciparum* female gametocyte activation assay (FGAA), was scaled up to a high-throughput format (*Z'* factor,  $0.7 \pm 0.1$ ) and subsequently validated using a selection of 50 known antimalarials from diverse chemical families. Only a few of these agents showed submicromolar 50% inhibitory concentrations in the assay: thio-strepton, methylene blue, and some endoperoxides. To determine the best conditions for HTS, a robustness test was performed with a selection of the GlaxoSmithKline Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) and the final screening conditions for this library were determined to be a 2  $\mu\text{M}$  concentration and 48 h of incubation with gametocytes. The *P. falciparum* FGAA has been proven to be a robust HTS assay faithful to *Plasmodium* transmission-stage cell biology, and it is an innovative useful tool for antimalarial drug discovery which aims to identify new molecules with transmission-blocking potential.

Despite the efforts made over decades of scientific research, malaria still remains a major health problem in tropical and subtropical areas, with more than 220 million cases and 600,000 deaths being registered per year (1). This parasitic disease is caused by *Plasmodium* infection through the bite of infected *Anopheles* female mosquitoes, with *Plasmodium falciparum* being responsible for the highest mortality rates (2).

Traditionally, pharmacological antimalarial treatments have targeted parasite asexual reproduction inside erythrocytes, which leads to the clinical symptoms of malaria. However, a small proportion of these asexual blood stages (0.2 to 1%) are committed to develop into sexual stages: male and female gametocytes (3, 4). Their differentiation process inside erythrocytes takes 8 to 12 days for *P. falciparum*, and inside erythrocytes they undergo a series of morphological and metabolic changes classically categorized into five stages of maturation (5, 6). While most schizonticides, such as chloroquine, affect young gametocytes (stages I, II, and III), gametocytes at late stages of maturation are not sensitive to them (7). These insensitive stage V gametocytes, which are responsible for malaria parasite transmission, remain quiescent but infectious in the peripheral bloodstream for approximately 22 days (8).

Currently administered pharmacological antimalarial treatments are highly effective against asexual blood stages, but only the 8-aminoquinoline (8-AQ) primaquine and methylene blue have been shown to be active against mature gametocytes in the field (9, 10). As these forms of the parasite are solely responsible for transmitting the disease, the discovery and development of new drugs targeting gametocytes will contribute to achieving the ultimate goal of malaria elimination. The challenge of global erad-

ication was recently renewed by the malaria scientific community (11), highlighting that both asexual and sexual stages have to be targeted in order to control the disease and block its transmission. Therefore, dual-activity antimalarial drugs killing both asexual and sexual parasite stages in human blood are urgently required.

In the past few years, different groups have made a huge effort toward the development of bioassays to identify compounds with gametocytocidal activity. Diverse approaches have been followed to assess the viability of gametocytes, such as the development of green fluorescent protein and luciferase reporter lines controlled by gametocyte-specific promoters (12, 13) or the use of different indicators as a general measure of metabolic activity, such as ATP (14), alamarBlue (15), or parasite lactate dehydrogenase activity (16). Despite the number of assays developed, only a few com-

Received 31 October 2014 Returned for modification 2 December 2014

Accepted 16 March 2015

Accepted manuscript posted online 23 March 2015

Citation Miguel-Blanco C, Lelièvre J, Delves MJ, Bardera AI, Presa JL, López-Barragán MJ, Ruecker A, Marques S, Sinden RE, Herreros E. 2015. Imaging-based high-throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *Plasmodium falciparum* female gamete formation. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3298–3305. doi:10.1128/AAC.04684-14.

Address correspondence to Esperanza Herreros, esperanza.a.herreros@gsk.com.

\* Present address: María José López-Barragán, Molecular Genetics, GeneDx, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.04684-14

pounds active against *P. falciparum* gametocytes have been identified so far; thus, further studies are still required.

With the aim of accelerating the discovery of new transmission-blocking drugs, it is essential to have the capacity to test several thousand compounds, and therefore, it is critical to develop fast, nonexpensive, and highly reproducible assays in a high-throughput screening (HTS) format. Although phenotypic screening has been widely used to identify compounds active against *P. falciparum* asexual stages (17–20), it is more laborious to scale up gametocyte-based assays because of the tedious, time-demanding, and expensive production of such stages. As of now, the production of gametocytes is one of the main impediments in the development of large-scale *in vitro* transmission-blocking assays. Furthermore, HTS of asexual stages has been based on asexual blood stage replication, but this approach is not translatable to sexual stage-based assays, as those stages do not divide during their maturation process. For all the reasons mentioned above, the development of gametocyte-based HTS assays constitutes a real challenge.

While the latest assays focused on early- and late-stage gametocytes as endpoints (12–14, 16), we have focused our attention on gamete formation as a key indicator of the functional viability of stage V mature female gametocytes after pharmacological treatment (21, 22). By using this readout, the biological content of the assay is increased to assess not only the effects of drugs on mature gametocytes (by targeting metabolic pathways) but also the possible inhibition of the gamete formation process (by gametocyte sterilization). Since both male and female gametes are required for zygote formation, the elimination of one of them would interrupt *Plasmodium* transmission. Here we present the *P. falciparum* female gametocyte activation assay (FGAA) scaled up for a high-throughput screening format, validated using 50 known antimalarial compounds, and currently being used for HTS campaigns.

## MATERIALS AND METHODS

**Asexual-stage culture.** *P. falciparum* 3D7 asexual-stage culture was performed as first described by Trager and Jensen (23). The culture medium composition was RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES (Invitrogen), 50 µg/ml hypoxanthine (Gibco), 2 g/liter NaHCO<sub>3</sub> (Sigma), 2 g/liter glucose (Sigma), and 10% pooled human male type A-positive (A<sup>+</sup>) serum (Interstate Blood Bank, TN). Asexual stages were maintained in culture at 0.5 to 5% parasitemia and 4% hematocrit, with a new vial of parasites being thawed every month. The human type A<sup>+</sup> red blood cells used for culturing were obtained from the Spanish Red Cross. Parasites were constantly kept at 37°C in the presence of a fixed gas composition (3% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>).

**Gametocyte culture.** Gametocyte induction was performed as previously described (24). *P. falciparum* 3D7 asexual-stage cultures synchronized at the ring stage were used to start gametocyte cultures (day 0) at 1% parasitemia and 4% hematocrit in a 200-ml final volume. Complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES, 50 µg/ml hypoxanthine, 2 g/liter NaHCO<sub>3</sub>, and 10% pooled human male type A<sup>+</sup> serum) was totally replaced daily for 14 days without fresh erythrocyte addition. To ensure maintenance of the temperature at 37°C, which is crucial for gametocyte production and maturation, prewarmed medium and a slide warmer (Premium) were used. Under these conditions, parasitemia reaches a peak of asexual stages on days 4 to 5, and the first gametocytes are differentiated in culture on day 6. Sexual-stage development was monitored microscopically by Giemsa-stained thin blood smears at day 7 (mainly asexual stages and stage I to III gametocytes) and day 14 (stage IV and V gametocytes).

**Female gametocyte activation assay.** Cultures showing mainly stage V gametocytes were purified by differential sedimentation using Nycoprep 1.077 solution (Axis-Shield). After 20 min of centrifugation at 800 × g and 37°C, the collected interface band was washed in prewarmed RPMI 1640 (Sigma) and gametocytes were counted using a Neubauer chamber. The concentration was adjusted to plate 8,000 gametocytes per well (100 µl/well) in 384-well black plates with clear bottoms (CellCarrier; PerkinElmer). Gametocytes were then incubated with drugs (0.5 µl/well) for either 24 or 48 h at 37°C (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>). Female gametocyte activation was then performed as previously described (21) by a temperature drop and addition of xanthurenic acid (Sigma). A volume of 10 µl/well of complete ookinete medium (RPMI 1640 with 25 mM HEPES, 50 µg/ml hypoxanthine, 2 g/liter NaHCO<sub>3</sub>, 100 µM xanthurenic acid, and 20% pooled human male type A<sup>+</sup> serum) was added to each plate. For female gamete detection, the medium was supplemented with anti-Pfs25 antibody (final concentration, 0.5 µg/ml), produced from monoclonal hybridomas (25) and provided by the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center (MR4), conjugated to the Cy3 fluorochrome (GE Healthcare). Activated cultures were then incubated at 26°C for 24 h (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>) and protected from light. The plates were analyzed using an Opera high-content screening system (PerkinElmer).

**Compounds and controls.** Compounds were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 2-fold serial dilutions (starting at a 25 µM concentration) were used for the dose-response analysis. Each compound was tested in duplicate in at least 3 independent experiments. As a negative control (female gametocyte activation in the presence of the vehicle only), a minimum of 10 wells per plate containing 0.5% DMSO were analyzed. As a positive control (background, residual activation in the presence of a confirmed gametocytocidal drug), a minimum of 10 wells per plate containing the proteasome inhibitor thioestrepiton at a 50 µM concentration were analyzed. The MMV50 set of 50 compounds tested for assay validation was kindly provided by the Medicines for Malaria Venture (MMV; Geneva, Switzerland).

**Image acquisition and analysis.** Image acquisition and analysis were performed on the Opera high-content screening system (PerkinElmer). For statistical analysis purposes, five images per well were taken from the bottom of the PerkinElmer microplate using a 10× air objective. The intensity of the Cy3 fluorochrome was measured with a laser with excitation at 532 nm, and the distribution was determined with an exposure time of 80 ms. All images were analyzed with a Columbus image data storage and analysis system (PerkinElmer) using a script specifically designed for this assay. Once the number of activated female gametocytes per well was determined, positive and negative controls were used to define the percent inhibition and calculate the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of each compound.

**Data analysis.** IC<sub>50</sub> calculation was performed with GraphPad Prism software using a nonlinear regression analysis and a normalized 4-parameter log dose with variable slope curve. A graphical representation of the dose-response curve for the thioestrepiton positive control is shown in Fig. 1. The signal-to-noise ratio (S/N), signal-to-background ratio (S/B), and Z' factor were calculated as previously reported (26). All formulae contain the mean and standard deviation (SD) for the positive-control (C<sup>+</sup>; thioestrepiton) and negative-control (C<sup>-</sup>; DMSO) signals. Values of the Z' factor higher than 0.4 are required for HTS quality and robustness (27). The formulae are as follows: S/N = (mean for C<sup>-</sup> - mean for C<sup>+</sup>)/SD for C<sup>+</sup>, S/B = mean for C<sup>-</sup>/mean for C<sup>+</sup>, and Z' factor = 1 - (3 SDs for C<sup>-</sup> + 3 SDs for C<sup>+</sup>)/(mean for C<sup>-</sup> - mean for C<sup>+</sup>).

## RESULTS

***P. falciparum* FGAA in high-throughput format.** The *P. falciparum* female gametocyte activation assay (FGAA) previously described by Delves et al. (21) was modified and scaled up to a 384-well format by achieving the large-scale production of gametocytes in culture and imaging detection in an automated Opera high-content screening system. Female gamete formation

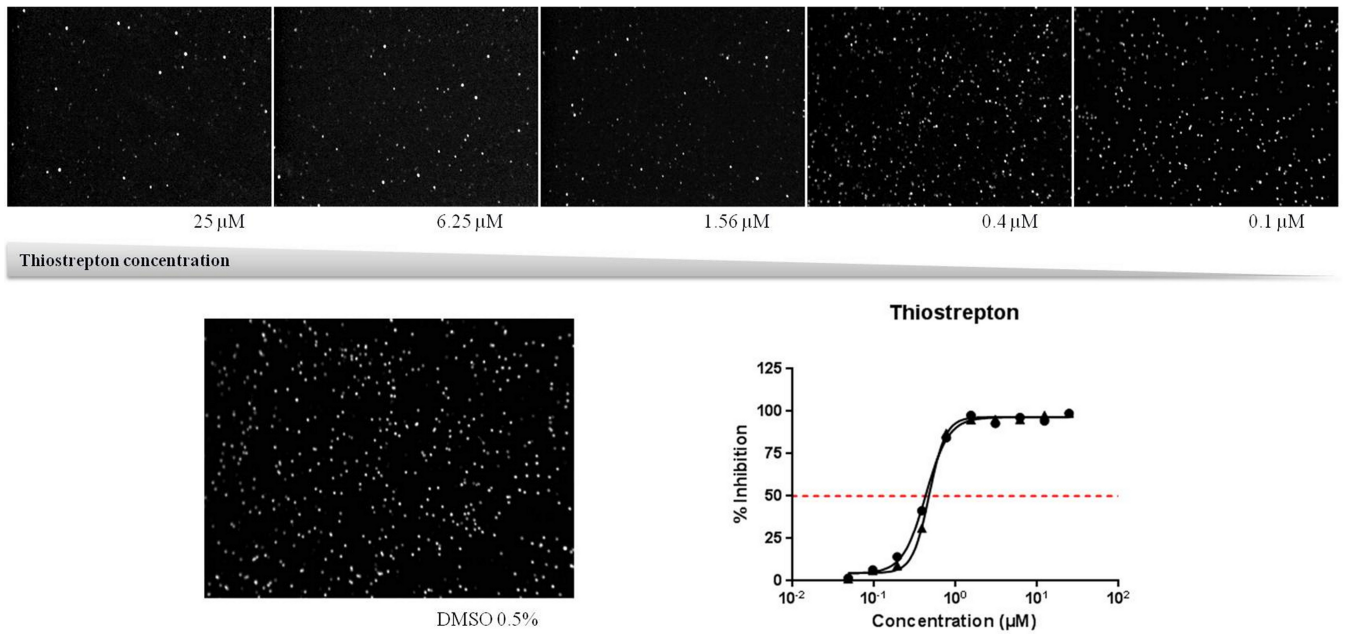


FIG 1 HTS pharmacology validation. (Bottom right) Graphical representation of thiostrepton dose-response curve; (top and bottom left) Cy3 signal of activated female gametocytes after 48 h treatment with thiostrepton (top) or DMSO (bottom left) control. A 10× objective was used to obtain the images.

was used as the indicator of stage V gametocyte viability and functionality. Detection of female gametocyte activation was based on the specific expression of the Pfs25 protein at the surface of the female gametes that had egressed.

The large-scale production of viable gametocytes is the main bottleneck to developing *in vitro* high-throughput screenings for gametocytocidal compounds. This problem was addressed by performing gametocytogenesis in 200-ml bottles and including an enrichment step using Nycoprep. By this procedure, up to  $2.5 \times 10^7$  stage V gametocytes per culture were obtained. Using 8,000 gametocytes per well, a 200-fold S/B ratio and 20-fold S/N ratio were obtained. The culture enrichment step was essential to achieving the optimal assay sensitivity and reproducibility in the 384-well format. Applying those conditions, more than 20,000 compounds could be tested per week. The average  $Z'$  factor obtained in the *P. falciparum* FGAA high-throughput format was  $0.7 \pm 0.1$  (SD) (Fig. 2).

The process of gametogenesis, which naturally occurs inside the mosquito midgut shortly after an infected-blood meal, can be mimicked *in vitro* to obtain both male gamete exflagellation and female gametocyte activation. This process was triggered by a temperature drop of at least 5°C and supplementation of the medium with low concentrations of xanthurenic acid (28). To induce female gamete formation, medium supplemented with xanthurenic acid was added to stage V gametocyte cultures, followed by incubation at 26°C.

The expression of the Pfs25 protein on the plasma membrane surface has been demonstrated to be a suitable biomarker for female gamete formation (21, 29). A specific anti-Pfs25 antibody labeled with Cy3 enabled the detection of fluorescent round forms only 30 min after activation; however, the highest fluorescence signal was obtained at 24 h postactivation, because Pfs25 protein expression increases over time. Therefore, we decided to incubate the gametocytes for 48 h at 37°C with the corresponding com-

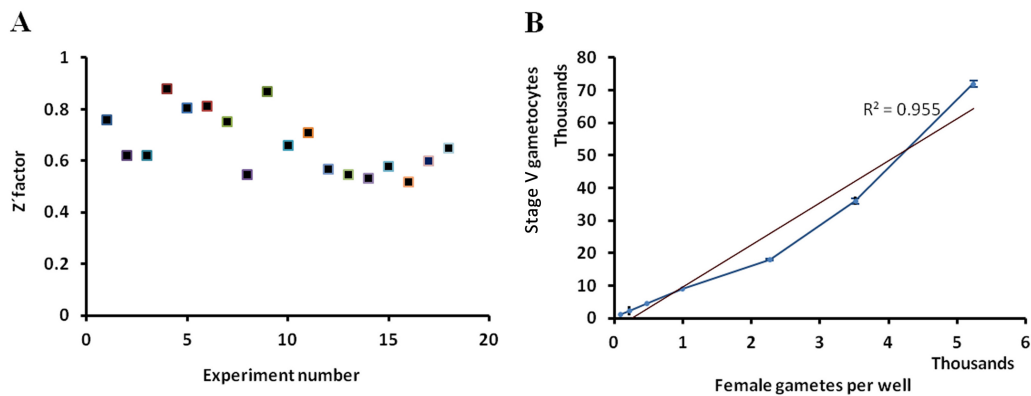


FIG 2 Quality and sensitivity of the *P. falciparum* FGAA for HTS. (A) Graphical representation of the  $Z'$  factors obtained in 18 independent plates during assay validation for HTS. (B) Linearity of the number of stage V gametocytes plotted against the number of female gametes detected per well.

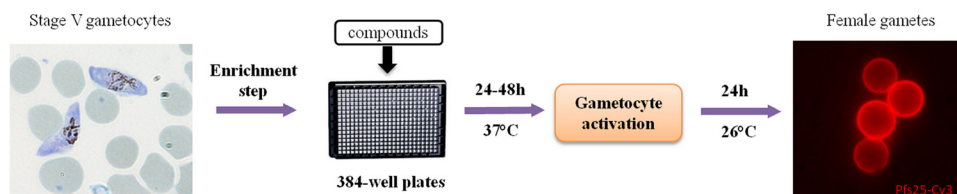


FIG 3 Diagram of *P. falciparum* female gametocyte activation assay protocol for HTS. The gametocyte culture was purified using a Nycoprep cushion, and stage V gametocytes (8,000 per well) were plated onto 384-well plates into which compounds had been predispensed. After 24 to 48 h of incubation at 37°C, the gametocytes were activated, followed by 24 h of incubation at 26°C with antibody against Pfs25 labeled with Cy3. Activated female gametocytes were detected by the Cy3 fluorescence signal in the Opera high-content screening system.

pond and then trigger gamete formation, add Pfs25-Cy3 antibody, and incubate the mixture for 24 h at 26°C postactivation (Fig. 3).

In the *P. falciparum* FGAA low-throughput format, the fluorescence signal from Pfs25-Cy3-positive cells was used as the final assay readout, based on a simple particle count ImageJ algorithm (21). For the high-throughput format, detection of viable activated female gametocytes was improved by using the automated Opera high-content screening system. Images were analyzed with an algorithm which calculates the number of events (activated female gametocytes) detected on the basis of the Pfs25-Cy3 antibody signal. In order to select the most appropriate discrimination parameters and discard any fluorescent background object or dead gametocyte/gamete, a cluster analysis using a K-means clustering algorithm (30) with morphology, texture, and fluorescence intensity properties was performed. As a result of this analysis, a reduced set of parameters, such as roundness, area, intensity, and second angular moment, was selected to be discriminant variables on the Columbus script in order to separate the spots associated with activated female gametocytes.

**Comparison of *P. falciparum* FGAA high- and low-throughput formats.** A set of 20 known antimalarial drugs was tested by exposing stage V gametocytes to the drugs at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  for 24 h in order to compare the data obtained by the high-throughput format with those obtained by the previously described low-throughput format (Table 1). Four compounds, cycloheximide, mefloquine, pyronaridine, and thiostrepton, showed inhibition values higher than 50%. These results were comparable to those observed in the low-throughput format, confirming that few antimalarial drugs exerted activity against *P. falciparum* sexual stages. Methylene blue showed less potency in the high-throughput format than in the low-throughput format (42.0% and 95.82% inhibition, respectively). However, incubation of gametocytes for an additional 24 h increased the potency of methylene blue, with the inhibition value reaching 90%. Dose-response assays were performed for those compounds with an inhibitory effect greater than 50% after 24 h of exposure to mature gametocytes (Table 2). Among all the compounds tested, thiostrepton was the most potent against female gamete formation, showing submicromolar  $\text{IC}_{50}$ s (0.27  $\mu\text{M}$ ) (Table 2).

**Validation of the *P. falciparum* FGAA in high-throughput format using a test set of 50 antimalarial agents.** The new assay was further validated using a panel of 50 antimalarial compounds from diverse chemical families (the MMV50 set), which included those previously tested in the 20 antimalarials. Given the results obtained with methylene blue and in order to identify slow-acting molecules, the activities of these compounds were evaluated after

48 h of exposure in a dose-response manner;  $\text{IC}_{50}$ s are summarized in Table 3. Similar to the data obtained previously with the set of 20 compounds, the MMV50 set contained only a few drugs with submicromolar  $\text{IC}_{50}$ s against female gametocyte activation: endoperoxides (dihydroartemisinin [ $\text{IC}_{50}$ , 0.99  $\mu\text{M}$ ], artesunate [ $\text{IC}_{50}$ , 0.64  $\mu\text{M}$ ], artemisone [ $\text{IC}_{50}$ , 0.94  $\mu\text{M}$ ]), thiostrepton ( $\text{IC}_{50}$ , 0.12  $\mu\text{M}$ ), and methylene blue ( $\text{IC}_{50}$ , 0.92  $\mu\text{M}$ ) were the most potent compounds.

**Establishment of the best conditions for HTS.** Once the assay was validated, the next step was to investigate the optimum screening conditions for the *P. falciparum* FGAA. The Glaxo-SmithKline (GSK) Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) is a collection of 13,533 compounds with activities against *P. falciparum* asexual stages at concentrations lower than 2  $\mu\text{M}$  (17). A randomly selected subset of 356 compounds was used to perform

TABLE 1 Activity of a set of 20 antimalarial drugs in the *P. falciparum* FGAA for comparison of high- and low-throughput formats

Drug	% inhibition of female gametocyte activation <sup>a</sup>			
	High-throughput format		Low-throughput format <sup>b</sup>	
	Mean	SD	Mean	SEM
Amodiaquine	34.6	5.3	27.25	4.5
Artemether	28.2	8.7	9.97	11.48
Artemisinin	27.9	13.7	11.44	8.23
Artesunate	38.9	14.7	10.3	2.3
Azithromycin	19.4	5.2	12.95	6.92
Chloroquine	13.7	10.3	ND <sup>c</sup>	ND
Cycloguanil	11.9	9.1	17.63	5.27
Cycloheximide	86.9	11.5	ND	ND
Dihydroartemisinin	43.3	15.1	9.36	4.26
Doxycycline	9.0	10.4	45.41	3.18
Halofantrine	15.6	10.9	-0.89	9.63
Lumefantrine	14.1	11.2	ND	ND
Mefloquine	64.3	12.0	34.2	9.21
Methylene blue	42.0	17.6	95.82	1.99
Primaquine	21.7	13.2	17.77	11.22
Pyrimethamine	16.9	12.2	7.43	6.52
Pyronaridine	100.0	2.7	95.56	1.17
Quinine	11.2	8.8	ND	ND
Sulfadoxine	10.4	11.7	ND	ND
Thiostrepton	97.4	1.2	97.85	0.46

<sup>a</sup> Data are mean percent inhibition values with respect to the level of inhibition for the DMSO carrier controls ( $n = 6$ )  $\pm$  SD when each of the drugs was used at a concentration of 10  $\mu\text{M}$ .

<sup>b</sup> Data are from Delves et al. (21).

<sup>c</sup> ND, not determined.

**TABLE 2** Dose-response evaluation of selected compounds with inhibition potential in the *P. falciparum* FGAA

Drug	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	
	Mean	SD
Thiostrepton	0.27	0.08
Methylene blue	11.9	2.24
Pyronaridine	2.42	0.72
Cycloheximide	1	0.34
Mefloquine	4.51	3.85

<sup>a</sup> Data are the mean IC<sub>50</sub>s after 24 h of incubation with respect to the level of inhibition for the DMSO carrier controls ( $n = 4$ ) ± SD.

a robustness test in order to determine the optimum assay concentration and incubation time. This test was performed with two different concentrations (2 and 5 μM) as well as two distinct incubation times (24 and 48 h). The definition of a hit was established on the basis of the mean cutoff, which was defined as the mean inhibition value for all tested compounds plus 3 times the standard deviation. We performed a pairwise comparison of compound activities obtained under each condition of concentration and incubation time (Fig. 4).

As expected, more compounds were active when both concentration and incubation time were increased: 33 and 44 hits at 24 and 48 h, respectively, at 2 μM and 69 and 81 hits at 24 and 48 h, respectively, at 5 μM. Hit rates obtained at 2 μM were considered acceptable for HTS after either 24 or 48 h of incubation: 9.27% and 12.36%, respectively. These hit rates are higher than expected in a regular screening campaign (1 to 2%) because these compounds were preselected against asexual stages. In order to include the possibility of detecting slow-acting compounds, it was decided to use the longer drug exposure time. Final screening conditions were then defined to be a 48-h incubation time and a 2 μM concentration.

## DISCUSSION

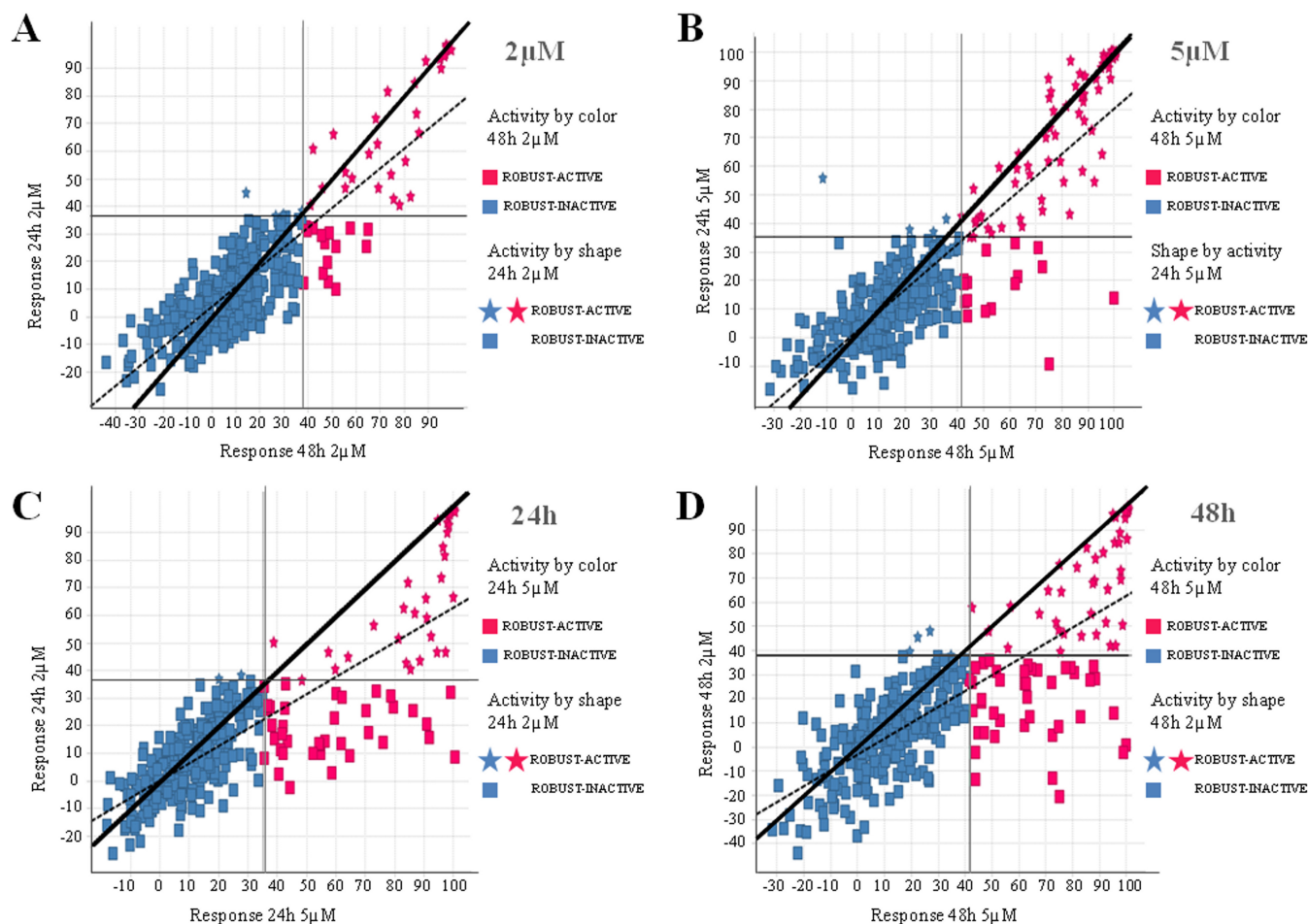
Malaria control and eradication are essential to reduce the disease burden in countries where malaria is endemic. This goal is strongly supported by the World Health Organization and institutions supporting research on diseases of the developing world (1, 11). Once clinical symptoms are controlled by pharmacological elimination of circulating asexual stages, gametocyte clearance from infected carriers is crucial to reduce the spread of malaria in affected areas. In this context, here we describe a robust imaging-based HTS assay using female gamete formation as a reporter of gametocyte viability. This new method enables the identification of molecules with gametocytocidal activity and dual-acting agents (drugs with both gametocytocidal and blood schizonticidal activities) capable of simultaneously relieving clinical symptoms and blocking parasite transmission.

Gametocyte-based assays determine gametocyte death or metabolic inhibition (13–16), but they lack the ability to measure the effects of those drugs that provoke delayed death or inhibition of onward development. Since gamete formation requires the activation of many transcriptional pathways initiated in the gametocyte, these could also be considered possible druggable targets to block malaria parasite transmission. Using the gamete formation as endpoint, the number of targets is therefore increased. Gametocytes are sexually dimorphic, and both male and female are required for parasite transmission. Detection of fluorescent female

**TABLE 3** Gametocytocidal activity of the MMV50 set of antimalarials in the high-throughput format of the *P. falciparum* FGAA

Drug	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μM)	
	Avg	SD
Endoperoxides		
Artemether	9.96	2.06
Dihydroartemisinin	0.99	0.74
Artesunate	0.64	0.47
Artemisinin	7.59	5.96
OZ277 (RBX-11160)	3.59	0.81
Artemisone	0.94	0.25
8-AQs		
Pamaquine	2.37	1.02
Primaquine	11.04	2.94
Tafenoquine	7.60	0.80
NPC-1161B	6.07	2.54
Antifolates		
Pyrimethamine	>25	
Chlorproguanil	4.68	0.28
Proguanil	11.94	1.32
P218	>25	
Antibiotics		
Azithromycin	13.02	0.00
Dapsone	>25	
Doxycycline	>25	
Trimethoprim	>25	
Thiostrepton	0.12	0.01
Clindamycin	>25	
cis-Myrincamycin	16.69	1.94
trans-Myrincamycin	17.45	1.85
Fosmidomycin	>25	
Pentamidine	7.41	1.40
Tetracycline	>25	
4-AQs		
Amodiaquine	9.01	0.86
AQ-13	15.89	1.33
Chloroquine	>25	
Hydroxychloroquine	>25	
Naphthoquine	1.98	1.12
Piperaquine	>25	
Pyronaridine	1.57	0.10
Amino alcohols		
Halofantrine	>25	
Lumefantrine	>25	
Mefloquine (racemic)	7.48	1.41
Mefloquine (+RS)	4.87	0.99
Quinine sulfate dihydrate	9.80	8.28
Sulfonamides		
Sulfadiazine	16.54	0.00
Sulfamethoxazole	>25	
Sulfadoxine	>25	
Miscellaneous		
Dehydroepiandrosterone	>25	
Cycloheximide	5.36	0.55
Riboflavin	>25	
N-Acetyl-D-penicillamine	>25	
Deferoxamine mesylate	>25	
Atovaquone	5.31	2.74
Methylene blue	0.92	0.24
Quinidine	>25	

<sup>a</sup> Data are the IC<sub>50</sub>s with respect to the level of inhibition for the DMSO carrier controls ( $n = 3$ ) ± SD.



**FIG 4** Determination of the best screening conditions: graphical representations of the robustness of test results. Pairwise comparisons of incubation times (24 and 48 h) and compound concentrations (2 and 5  $\mu\text{M}$ ) are provided. (A and B) Response of increasing incubation time; (C and D) response of increasing concentration. Blue squares, compounds inactive under both conditions; pink stars, compounds active under both conditions; pink squares and blue stars, compounds active when the incubation time or concentration was increased.

gametes was considered to be more suitable for HTS than detection of exflagellation, as they can be detected over a longer time window. Interestingly, it has recently been reported that exflagellation can be quantified in 96- and 384-well formats (22).

The *P. falciparum* FGAA in the high-throughput format was validated with 50 known antimalarial drugs, and we have established the optimum conditions for the testing of large libraries of compounds. On the basis of the  $Z'$  factor, linearity, signal-to-noise ratio, and signal-to-background ratio obtained (Fig. 4), the reproducibility and reliability of this assay for HTS are ensured. Moreover, the test performed with a selection of TCAM set compounds provided valuable information about the *P. falciparum* FGAA robustness and demonstrated that this assay is reliable for the screening of large libraries of compounds. On the basis of data obtained from this robustness test, the hit rate expected in the screening of the TCAM set will be higher than that obtained in a regular screening campaign (9% versus 1%). This is a consequence of screening of a collection of compounds with activity against *P. falciparum* asexual stages.

The evaluation of the MMV50 set identified five compounds with activities against *P. falciparum* female gamete formation at submicromolar concentrations, which highlights the infrequent

activity of most current antimalarial agents against sexual stages. Compounds with activity at submicromolar concentrations in the *P. falciparum* FGAA were the antibiotic thiostrepton, the 4-aminoquinoline (4-AQ) pyronaridine, some endoperoxides, and methylene blue. The ribosome-targeting antibiotic thiostrepton has been described to be a potent inhibitor of apicoplast protein synthesis and parasite proteasome activity (31). Although its activity against asexual blood stages is not remarkable ( $\text{IC}_{50} = 8.9 \mu\text{M}$ ) (31), it has been reported to be highly active against mature gametocytes ( $\text{IC}_{50} = 0.56 \mu\text{M}$ ) (13), inhibiting both male gamete exflagellation (32) and female gamete formation ( $\text{IC}_{50} = 0.12 \mu\text{M}$ ). The recently developed 4-AQ pyronaridine is an inhibitor of *P. falciparum* topoisomerase II, which is in phase II-III clinical trials in a combined treatment with artesunate (33, 34). The *in vitro* gametocytocidal activity of pyronaridine has been previously reported (35), although recently developed assays revealed that it has high  $\text{IC}_{50}$ s against late-stage gametocytes: 4.26  $\mu\text{M}$  (13) and 3.25  $\mu\text{M}$  (14). Interestingly, pyronaridine inhibits *P. falciparum* exflagellation as well as oocyst production (36). These data correlate well with our results for pyronaridine in the *P. falciparum* female gamete formation assay ( $\text{IC}_{50} = 1.57 \mu\text{M}$ ). Methylene blue has been shown to interfere with the parasite heme detoxification

process and both human and *Plasmodium* disulfide reductases (37). Many studies have characterized methylene blue to be a potent inhibitor of young and mature gametocytes (12), but its IC<sub>50</sub> is variable, probably because of the different assay conditions used for testing (different culture treatments, times of exposure, and assay sensitivities or readouts). This difference in potency observed between the *P. falciparum* FGAA low- and high-throughput formats may be explained by the methylene blue redox mode of action and how it is modulated depending on the erythrocyte density in the assay.

Artemisinin combination therapies (ACTs) constitute the first line of treatment for *P. falciparum* malaria (38). Endoperoxides, such as artemisinin and its derivatives, have demonstrated potent antimalarial activity against asexual blood stages (39) and young gametocytes (40) but exert little or no effect against stage IV and V gametocytes *in vitro* (14, 41). However, endoperoxides have been shown to be effective antigamete drugs, causing exflagellation inhibition (80% at 1 μM) (21) and interrupting female gamete formation at submicromolar concentrations (Table 2). Furthermore, the transmission-blocking activity of ACTs in the field is still controversial, as only a few clinical trials showed moderate activity in the standard membrane feeding assay (SMFA) (42–44). The 8-AQ primaquine is the only drug with activity against mature gametocytes used in the field (9). However, it has been described that the efficacy of primaquine is mainly due to its metabolites, since there is no significant evidence of its *in vitro* activity (IC<sub>50</sub> in the *P. falciparum* FGAA, 11.04 μM).

The *P. falciparum* FGAA provides highly valuable information on potential transmission-blocking compounds. However, the measure of female gametocyte activation has not been proven to be a direct measure of mosquito infectivity, as no female-specific compounds have been described so far. Thus, being conscious of this limitation and the fact that this assay may miss compounds that specifically exert activity against the male gametocyte, work is under way to develop dual male–female gametocyte HTS assays (22). An assay that could assess the effects of drugs on both male and female gamete formation would be the closest *in vitro* approach to the “gold standard” SMFA.

During the past decade, HTS assays have been successfully applied to *P. falciparum* asexual stages to screen millions of compounds (17, 19, 20). These phenotypic screenings have identified new active compounds, and some of them (KAE609 [45], OZ439 [46]) are currently in clinical development. To achieve the goal of malaria eradication proposed by the scientific community, the same approach should be applied to parasite stages, responsible for transmission.

Here we validated a new HTS assay based on imaging technologies to screen large libraries and select thousands of molecules with activity against stage V gametocytes. Our current strategy aims to test collections with known activity against asexual stages to discover molecules with dual activity targeting both asexual stages of the parasite and mature gametocytes. Compounds identified during the validation of the *P. falciparum* FGAA, such as methylene blue and thiostrepton, will be used as positive controls. This extensive screening will enable not only the discovery of new antimalarials for malaria elimination and eradication but also the identification of tool compounds to describe new molecular targets involved in malaria transmission.

## ACKNOWLEDGMENTS

The following reagent was obtained through MR4 as part of the BEI Resources Repository, NIAID, NIH: *Plasmodium falciparum* anti-Pfs25 monoclonal antibody 4B7, MRA-28, deposited by D. C. Kaslow.

This work was supported by Bill and Melinda Gates Foundation grant OPP1043501.

We thank Richard Priest from Biological Sciences at GSK, Stevenage, United Kingdom, for the production and conjugation of anti-Pfs25 antibody. We also thank the GSK Sample Management Technologies facilities for the preparation of 384-well plates into which compounds had been predispensed.

## REFERENCES

- World Health Organization. 2013. World malaria report 2013. World Health Organization, Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2013/report/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/).
- Flannery EL, Chatterjee AK, Winzeler EA. 2013. Antimalarial drug discovery—approaches and progress towards new medicines. *Nat Rev Microbiol* 11:849–862. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3138>.
- Sinden RE. 1983. Sexual development of malarial parasites. *Adv Parasitol* 22:153–216. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60462-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60462-5).
- Kafsack BF, Rovira-Graells N, Clark TG, Bancells C, Crowley VM, Campino SG, Williams AE, Drought LG, Kwiatkowski DP, Baker DA, Cortes A, Llinas M. 2014. A transcriptional switch underlies commitment to sexual development in malaria parasites. *Nature* 507:248–252. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12920>.
- Hawking F, Wilson ME, Gammage K. 1971. Evidence for cyclic development and short-lived maturity in the gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65:549–559. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(71\)90036-8](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(71)90036-8).
- Baker DA. 2010. Malaria gametocytogenesis. *Mol Biochem Parasitol* 172:57–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.03.019>.
- Smalley ME. 1977. *Plasmodium falciparum* gametocytes: the effect of chloroquine on their development. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:526–529. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90149-3](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(77)90149-3).
- Sinden RE, Smalley ME. 1979. Gametocytogenesis of *Plasmodium falciparum* in vitro: the cell-cycle. *Parasitology* 79:277–296. <http://dx.doi.org/10.1017/S003118200005335X>.
- White NJ. 2013. Primaquine to prevent transmission of falciparum malaria. *Lancet Infect Dis* 13:175–181. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70198-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70198-6).
- Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt FP, Schirmer RH, Klose C, Mansmann U, Meissner PE, Muller O. 2009. Strong gametocytocidal effect of methylene blue-based combination therapy against falciparum malaria: a randomised controlled trial. *PLoS One* 4:e5318. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005318>.
- Sinden RE, Carter R, Drakeley C, Leroy D. 2012. The biology of sexual development of *Plasmodium*: the design and implementation of transmission-blocking strategies. *Malar J* 11:70. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-70>.
- Adjalley SH, Johnston GL, Li T, Eastman RT, Ekland EH, Eappen AG, Richman A, Sim BK, Lee MC, Hoffman SL, Fidock DA. 2011. Quantitative assessment of *Plasmodium falciparum* sexual development reveals potent transmission-blocking activity by methylene blue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1214–E1223. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1112037108>.
- Duffy S, Avery VM. 2013. Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malar J* 12:408. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-408>.
- Lelievre J, Almela MJ, Lozano S, Miguel C, Franco V, Leroy D, Herreros E. 2012. Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence “transmission blocking” assay. *PLoS One* 7:e35019. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035019>.
- Tanaka TQ, Dehdashti SJ, Nguyen DT, McKew JC, Zheng W, Williamson KC. 2013. A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. *Mol Biochem Parasitol* 188:20–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.02.005>.
- D'Alessandro S, Silvestrini F, Decherer K, Corbett Y, Parapini S, Timmerman M, Galastri L, Basilico N, Sauerwein R, Alano P, Taramelli D. 2013. A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte

- drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J Antimicrob Chemother* 68:2048–2058. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt165>.
17. Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, de Cozar C, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DV, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, Garcia-Bustos JF. 2010. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* 465:305–310. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09107>.
  18. Avery VM, Bashyam S, Burrows JN, Duffy S, Papadatos G, Puthukkuti S, Sambandan Y, Singh S, Spangenberg T, Waterson D, Willis P. 2014. Screening and hit evaluation of a chemical library against blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Malar J* 13:190. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-190>.
  19. Guiguemde WA, Shelat AA, Bouck D, Duffy S, Crowther GJ, Davis PH, Smithson DC, Connelly M, Clark J, Zhu F, Jimenez-Diaz MB, Martinez MS, Wilson EB, Tripathi AK, Gut J, Sharlow ER, Bathurst I, El Mazouni F, Fowle JW, Forquer I, McGinley PL, Castro S, Angulo-Barturen I, Ferrer S, Rosenthal PJ, Derisi JL, Sullivan DJ, Lazo JS, Roos DS, Riscoe MK, Phillips MA, Rathod PK, Van Voorhis WC, Avery VM, Guy RK. 2010. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 465:311–315. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09099>.
  20. Plouffe D, Brinker A, McNamara C, Henson K, Kato N, Kuhen K, Nagle A, Adrian F, Matzen JT, Anderson P, Nam TG, Gray NS, Chatterjee A, Janes J, Yan SF, Trager R, Caldwell JS, Schultz PG, Zhou Y, Winzeler EA. 2008. *In silico* activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9059–9064. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802982105>.
  21. Delves MJ, Ruecker A, Straschil U, Lelievre J, Marques S, Lopez-Barragan MJ, Herreros E, Sinden RE. 2013. Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3268–3274. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00325-13>.
  22. Ruecker A, Mathias DK, Straschil U, Churcher TS, Dinglasan RR, Leroy D, Sinden RE, Delves MJ. 2014. A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 58:7292–7302. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03666-14>.
  23. Trager W, Jensen JB. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673–675. <http://dx.doi.org/10.1126/science.781840>.
  24. Kaushal DC, Carter R, Miller LH, Krishna G. 1980. Gametocytogenesis by malaria parasites in continuous culture. *Nature* 286:490–492. <http://dx.doi.org/10.1038/286490a0>.
  25. Barr PJ, Green KM, Gibson HL, Bathurst IC, Quakyi IA, Kaslow DC. 1991. Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J Exp Med* 174:1203–1208. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.174.5.1203>.
  26. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 4:67–73. <http://dx.doi.org/10.1177/10870571990400206>.
  27. Coma I, Herranz J, Martin J. 2009. Statistics and decision making in high-throughput screening. *Methods Mol Biol* 565:69–106. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-258-2\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-258-2_4).
  28. Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. 1998. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature* 392:289–292. <http://dx.doi.org/10.1038/32667>.
  29. Kaslow DC, Quakyi IA, Syin C, Raum MG, Keister DB, Coligan JE, McCutchan TF, Miller LH. 1988. A vaccine candidate from the sexual stage of human malaria that contains EGF-like domains. *Nature* 333:74–76. <http://dx.doi.org/10.1038/333074a0>.
  30. Hartigan JA, Wong MJ. 1979. Algorithm AS 136: a K-means clustering algorithm. *Appl Stat* 28:100–108. <http://dx.doi.org/10.2307/2346830>.
  31. Aminake MN, Schoof S, Sologub L, Leubner M, Kirschner M, Arndt HD, Pradel G. 2011. Thioesteron and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1338–1348. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01096-10>.
  32. Delves MJ, Ramakrishnan C, Blagborough AM, Leroy D, Wells TN, Sinden RE. 2012. A high-throughput assay for the identification of malarial transmission-blocking drugs and vaccines. *Int J Parasitol* 42:999–1006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.009>.
  33. Vivas L, Rattray L, Stewart L, Bongard E, Robinson BL, Peters W, Croft SL. 2008. Anti-malarial efficacy of pyronaridine and artesunate in combination *in vitro* and *in vivo*. *Acta Trop* 105:222–228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.12.005>.
  34. Duparc S, Borghini-Fuhrer I, Craft CJ, Arbe-Barnes S, Miller RM, Shin CS, Fleckenstein L. 2013. Safety and efficacy of pyronaridine-artesunate in uncomplicated acute malaria: an integrated analysis of individual patient data from six randomized clinical trials. *Malar J* 12:70. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-12-70>.
  35. Chavalitshewinkoon-Petmitr P, Pongvilairat G, Auparakkitanon S, Wilairat P. 2000. Gametocytocidal activity of pyronaridine and DNA topoisomerase II inhibitors against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Parasitol Int* 48:275–280. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5769\(99\)00028-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5769(99)00028-8).
  36. Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler EA, Sinden RE, Leroy D. 2012. The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS Med* 9:e1001169. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001169>.
  37. Buchholz K, Schirmer RH, Eubel JK, Akoachere MB, Dandekar T, Becker K, Gromer S. 2008. Interactions of methylene blue with human disulfide reductases and their orthologues from *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:183–191. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00773-07>.
  38. Anthony MP, Burrows JN, Duparc S, Moehrle JJ, Wells TN. 2012. The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria. *Malar J* 11:316. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-316>.
  39. Dechy-Cabaret O, Benoit-Vical F. 2012. Effects of antimalarial molecules on the gametocyte stage of *Plasmodium falciparum*: the debate. *J Med Chem* 55:10328–10344. <http://dx.doi.org/10.1021/jm3005898>.
  40. Chotivanich K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Looareesuwan S, Day NP, Coleman RE, White NJ. 2006. Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1927–1930. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01472-05>.
  41. Peatey CL, Leroy D, Gardiner DL, Trenholme KR. 2012. Anti-malarial drugs: how effective are they against *Plasmodium falciparum* gametocytes? *Malar J* 11:34. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-11-34>.
  42. Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, White NJ. 1996. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* 347:1654–1658. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)91488-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91488-9).
  43. Price RN. 2013. Potential of artemisinin-based combination therapies to block malaria transmission. *J Infect Dis* 207:1627–1629. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit079>.
  44. Sutherland CJ, Ord R, Dunyo S, Jawara M, Drakeley CJ, Alexander N, Coleman R, Pinder M, Walraven G, Targett GA. 2005. Reduction of malaria transmission to *Anopheles* mosquitoes with a six-dose regimen of co-artemether. *PLoS Med* 2:e92. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020092>.
  45. Leong FJ, Li R, Jain JP, Lefevre G, Magnusson B, Diagana TT, Pertel P. 2014. A first-in-human randomized, double-blind, placebo-controlled, single- and multiple-ascending oral dose study of novel antimalarial spiroindolone KAE609 (cipargamin) to assess its safety, tolerability, and pharmacokinetics in healthy adult volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 58:6209–6214. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03393-14>.
  46. Wang X, Dong Y, Wittlin S, Charman SA, Chiu FC, Chollet J, Katneni K, Mannila J, Morizzi J, Ryan E, Scheurer C, Steuten J, Santo Tomas J, Snyder C, Vennerstrom JL. 2013. Comparative antimalarial activities and ADME profiles of ozonides (1,2,4-trioxolanes) OZ277, OZ439, and their 1,2-dioxolane, 1,2,4-trioxane, and 1,2,4,5-tetraoxane isosteres. *J Med Chem* 56:2547–2555. <http://dx.doi.org/10.1021/jm400004u>.

ARTICLE

Received 9 Sep 2016 | Accepted 3 Mar 2017 | Published 17 May 2017

DOI: 10.1038/ncomms15160

OPEN

# Hundreds of dual-stage antimalarial molecules discovered by a functional gametocyte screen

Celia Miguel-Blanco<sup>1,2</sup>, Irene Molina<sup>1</sup>, Ana I. Bardera<sup>3</sup>, Beatriz Díaz<sup>1</sup>, Laura de las Heras<sup>1</sup>, Sonia Lozano<sup>1</sup>, Carolina González<sup>1</sup>, Janneth Rodrigues<sup>1</sup>, Michael J. Delves<sup>2</sup>, Andrea Ruecker<sup>2,†</sup>, Gonzalo Colmenarejo<sup>3</sup>, Sara Viera<sup>1</sup>, María S. Martínez-Martínez<sup>1</sup>, Esther Fernández<sup>1</sup>, Jake Baum<sup>2</sup>, Robert E. Sinden<sup>2</sup> & Esperanza Herreros<sup>1</sup>

*Plasmodium falciparum* stage V gametocytes are responsible for parasite transmission, and drugs targeting this stage are needed to support malaria elimination. We here screen the Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) using the previously developed *P. falciparum* female gametocyte activation assay (Pf FGAA), which assesses stage V female gametocyte viability and functionality using *Pfs25* expression. We identify over 400 compounds with activities <2 μM, chemically classified into 57 clusters and 33 singletons. Up to 68% of the hits are chemotypes described for the first time as late-stage gametocyte-targeting molecules. In addition, the biological profile of 90 compounds representing the chemical diversity is assessed. We confirm *in vitro* transmission-blocking activity of four of the six selected molecules belonging to three distinct scaffold clusters. Overall, this TCAMS gametocyte screen provides 276 promising antimalarial molecules with dual asexual/sexual activity, representing starting points for target identification and candidate selection.

<sup>1</sup>Diseases of the Developing World (DDW), GlaxoSmithKline, Madrid, Tres Cantos 28760, Spain. <sup>2</sup>Department of Life Sciences, Imperial College of London, London SW7 2AZ, UK. <sup>3</sup>Molecular Discovery Research (MDR), GlaxoSmithKline, Madrid, Tres Cantos 28760, Spain. † Present address: Mahidol-Oxford Tropical Medicine Research Unit, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand and Centre for Tropical Medicine and Global Health, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford OX3 7FZ, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.H. (email: eherreros.a@gmail.com).

During the last 10 years, there has been a substantial intensification of malaria control and prevention with the implementation of both new vector control strategies and chemotherapies. Nevertheless, the disease still remains a worldwide public health challenge with *Plasmodium falciparum* causing more than 214 million cases and 438,000 deaths per year<sup>1</sup>. Malaria elimination is now being discussed as a realistic goal, but new tools will be needed to achieve this aim, particularly in areas of high transmission<sup>2</sup>. It is unlikely that malaria elimination can be achieved in all contexts unless drugs and/or vaccines that interrupt malaria transmission can be discovered, developed and deployed<sup>3</sup>. *Plasmodium* stage V gametocytes are solely responsible for malaria transmission. Thus, they constitute an important target to block the parasite lifecycle through drug administration to infected patients or asymptomatic carriers.

Since 2001, artemisinin-based combination therapies (ACTs) have been recommended as first-line treatment for uncomplicated *falciparum* malaria<sup>4</sup>. Although ACTs rapidly remove asexual blood stages and early gametocytes from the patient, their effectiveness against transmissible stage V gametocytes remains unclear<sup>5–7</sup>. The only chemotherapeutic intervention available for transmission interruption is low-dose (0.25 mg kg<sup>-1</sup>) primaquine<sup>8–11</sup>, recommended for use in areas of low transmission as a single administration following ACT in patients with *P. falciparum* malaria<sup>12</sup>. Higher doses may be more efficacious, but the use of primaquine for transmission reduction is limited because of the potential for haemolysis in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency, a relatively common genetic variation found in malaria endemic areas<sup>13</sup>. When considered with the recently reported cases of artemisinin resistance in the Greater Mekong subregion that are threatening the effectiveness of ACTs<sup>14–16</sup>, the discovery of safer drugs with new modes of action for malaria treatment, prevention and transmission interruption is more urgent than ever.

Several assays have been developed in recent years with the objective of identifying drugs with transmission-blocking potential. Drugs with gametocytocidal activity have been detected using diverse readouts, such as metabolic parameters (ATP, pLDH, oxidoreduction)<sup>17–19</sup> or mitochondrial damage and luciferase reporters to track different gametocyte stages<sup>20,21</sup>. Most of these assays are amenable to high throughput screening (HTS) of large compound libraries<sup>20,22,23</sup>. Alternatively, a new generation of gametocyte assays assess male and/or female gamete formation as a broader metabolic framework within which to determine drug activities modulating stage V

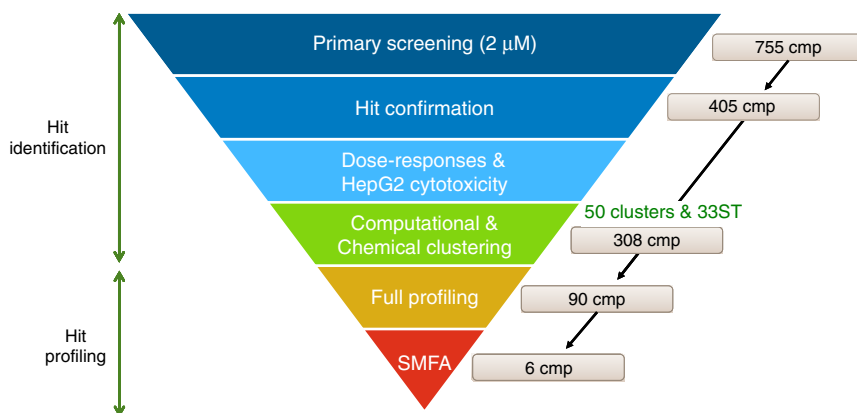
gametocyte functionality and viability. The idea was first reported by Delves and colleagues<sup>24</sup>, and subsequently developed into a single assay, the *P. falciparum* Dual Gamete Formation Assay (*Pf* DGFA)<sup>25</sup>. To date, a limited but diverse group of studies<sup>24–27</sup> suggest that results obtained in the *Pf* DGFA usefully correlate with those of the *ex vivo* standard membrane feeding assay (SMFA), but we remain alert to the need to confirm *in vitro* activities with those *in vivo*. The *P. falciparum* female gametocyte activation assay (*Pf* FGAA) was the first to be scaled to 384-well format and validated for HTS<sup>28</sup>.

The Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) is the largest published collection of compounds active against *P. falciparum* asexual blood stages<sup>29</sup>. In this study, the 13.5 K compounds in the TCAMS are screened against stage V gametocytes in the *Pf* FGAA<sup>28</sup> to identify molecules effective against female gamete formation. As both female and male gametes are required for the development of mosquito stages, the parasite lifecycle may be interrupted by solely targeting one of them. The objective of this study is the discovery of new chemical diversity with activity against both asexual blood stages and stage V (female) gametocytes that may not only treat clinical symptoms but also block malaria transmission.

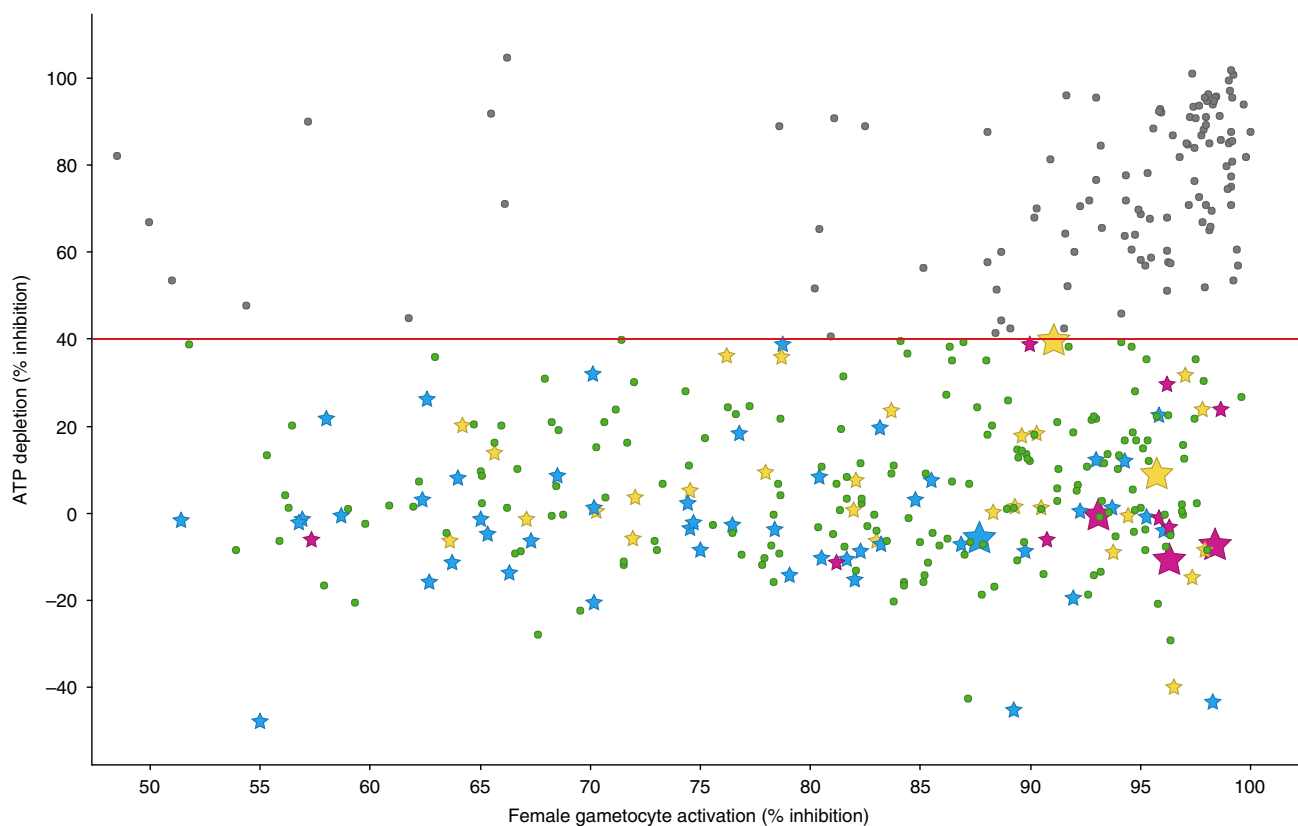
## Results

**Hit identification.** The TCAMS was screened in the *Pf* FGAA following the progression cascade described in Fig. 1. The 13,533 compounds were tested once at 2  $\mu$ M single concentration using 48 h exposure, and 755 hits were identified using a mean plus 3 s.d.'s statistical cut-off, corresponding to 53% inhibition for this screen. The hits were then re-tested in triplicate at the same concentration resulting in 405 compounds with confirmed activity (3% final hit rate). These compounds were then evaluated in dose-response to determine their 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) (Supplementary Data 1). A good correlation was found between the confirmed hits and dose-response assay with more than 80% of compounds possessing an IC<sub>50</sub> < 2  $\mu$ M. Additionally, the cytotoxicity of these molecules was evaluated in mammalian cells (HepG2) to determine their specificity for the parasite. Up to 120 compounds showed 50% inhibitory concentration (Tox<sub>50</sub>) values above 10  $\mu$ M (Supplementary Data 1).

In parallel, the set of confirmed hits from the *Pf* FGAA screen was cross-compared in the gametocyte ATP-depletion assay<sup>17</sup>, at 2  $\mu$ M single concentration (Supplementary Data 1). This assay monitors ATP levels as surrogate of gametocyte viability. We observed that of the 405 compounds which were identified by the



**Figure 1 | Progression cascade of the TCAMS screen in the *Pf* FGAA.** The different steps followed during the TCAMS screen as well as the number of compounds identified in the first phases and those selected for further profiling are shown. The first four steps can be defined as ‘hit identification’. After clustering, compounds are progressed to characterize their biological profiles and finally tested in the gold standard SMFA.



**Figure 2 | Correlation graph of hits identified in the *Pf* FGAA screen compared to their activities in the ATP-depletion assay.** 276 compounds (green circles and all stars) out of the 405 hits were exclusively identified in the *Pf* FGAA while 129 compounds (grey circles) were active in both assays. Stars represent those compounds further profiled: slow-acting (blue stars), fast-acting (yellow stars) and gamete-targeting (magenta stars). Compounds tested in the SMFA are marked as big stars.

*Pf* FGAA, only 129 compounds were also identified in the ATP-depletion assay (40% inhibition cut-off) (Fig. 2).

To assess the chemical diversity provided by the *Pf* FGAA screen, all confirmed hits (405 compounds) were subjected to computational analysis by applying a complete-linkage clustering algorithm<sup>30</sup>, using a Tanimoto similarity threshold of 0.55. This analysis identified 82 compound clusters and 63 singletons. After chemical reviewing, they were reorganized based on structure similarity into 57 clusters and 33 singletons. Initial triage was based on simple and relaxed physicochemical properties (molecular weight, lipophilicity, number of aromatic rings) and selectivity index. Seven clusters comprising 97 compounds with molecular weights above  $600 \text{ g mol}^{-1}$ , clogP above 6 and HepG2 cytotoxicity  $< 10 \mu\text{M}$  were flagged and deprioritized from further biological profiling. This left a total of 308 compounds classified in 50 clusters, plus 33 singletons for consideration (Supplementary Data 2). Clusters with three or less representatives comprised more than 70% of the set, which is indicative of the large chemical diversity identified in this screen.

A subset of 90 compounds representative of the new chemical diversity was selected for further characterization of the parasitological profile (Supplementary Data 3). Some of these chemical series are depicted in Fig. 3 and Supplementary Fig. 1. Compound selection was performed taking into consideration the top potency ( $\text{IC}_{50}$ ) and cytotoxicity ( $\text{Tox}_{50}$ ) values of compounds in each cluster.

**Hit profiling.** The parasitological properties of the selected molecules were further investigated to assess their speed of action

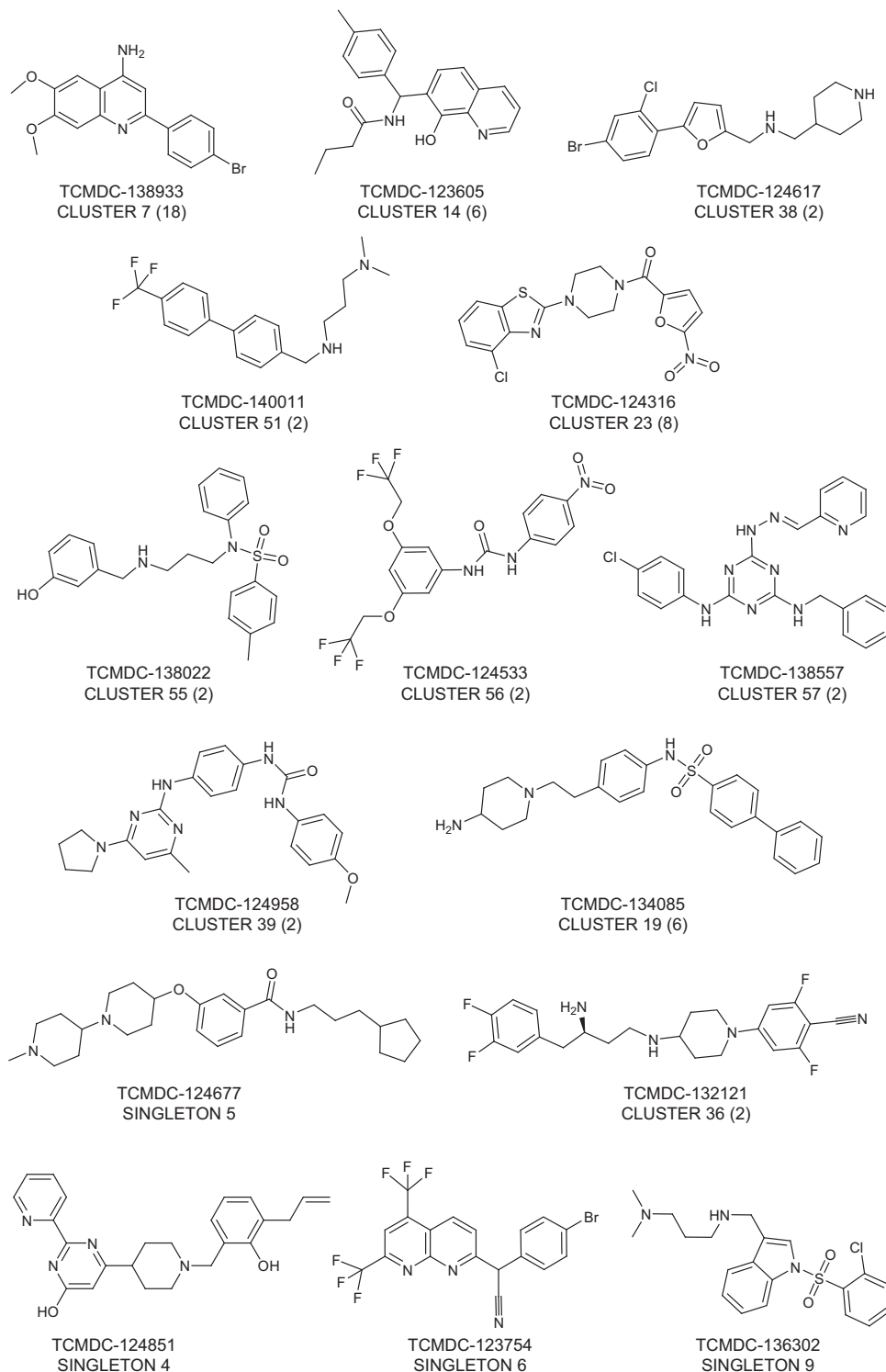
and activity against female gametocytes or gametes (Fig. 4 and Supplementary Data 3).

To determine their speed of action, gametocytes were preincubated with the compounds for only 24 h before inducing gamete formation and their  $\text{IC}_{50}$  values compared to the ones obtained in the 48 h preincubation described above (Supplementary Data 3). There were 49 compounds that were only active with a 48 h exposure (designated as slow-acting), while 29 compounds additionally showed activity with only 24 h exposure (designated as fast-acting) (Fig. 4).

Moreover, when the compounds were added 30 min after triggering gametocyte activation, 12 compounds prevented cell surface expression of *Pfs25* (designated as gamete-targeting; Fig. 4). This suggests that these molecules target female gametes directly, although this does not discount the possibility that they are also active against stage V gametocytes.

#### Validation of the *in vitro* transmission-blocking activity.

To validate the transmission-blocking potential of the TCAMS hits and assess the predictive value of the *Pf* FGAA as an *in vitro* high throughput surrogate of full mosquito feeding, the 'gold-standard' SMFA was performed. Six compounds showing different biological profiles, belonging to four distinct chemical clusters, were selected based on their potencies in the *Pf* FGAA (Supplementary Data 1, Table 1). For each compound, inhibition of exflagellation of male gametocytes was measured. Five compounds showed more than 50% inhibition while TCMD-124559 displayed 30% inhibition (Fig. 5, Table 1). SMFAs were then performed with a single dose at a concentration equivalent to the respective *Pf* FGAA 90% inhibitory concentration ( $\text{IC}_{90}$ ) at the

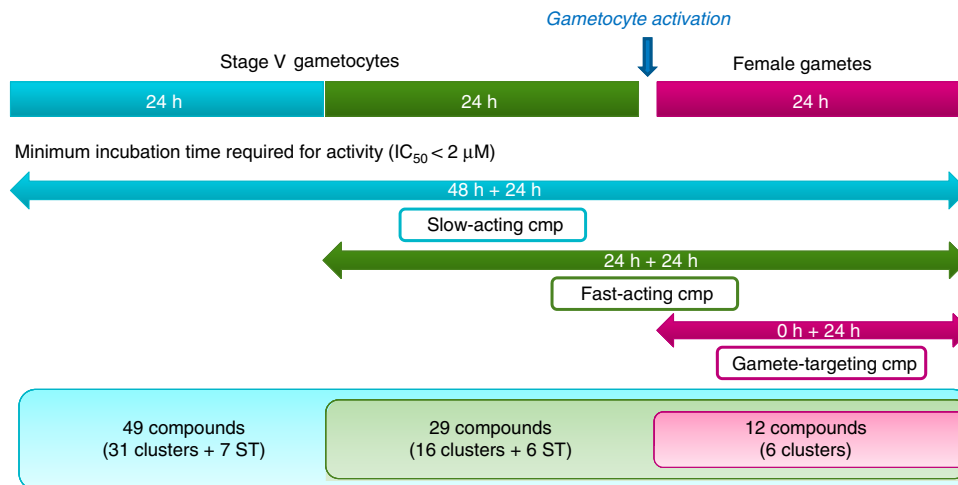


**Figure 3 | TCAMS chemical series representatives of the compound set further progressed.** Scaffolds of 15 chemotypes, belonging to 24 of the 90 compounds profiled, that are within an appropriate physicochemical space ( $\text{clogP} < 5$ , number of aromatic rings  $< 3$ ).

48 h incubation time (Table 1). Compounds were tested in duplicate in 2–3 independent experiments in the indirect format of the assay, that is, gametocytes were exposed to the drug for 48 h before mosquito feeding to replicate a drug exposure time equivalent to that used in the *Pf* FGAA. Five of these selected compounds showed a reduction in oocyst prevalence of 58–100% (Fig. 6a), and a reduction in oocyst intensity of  $> 80\%$  (Fig. 6b).

By contrast, TCMDC-124559 reduced prevalence and intensity by  $< 20\%$  (Fig. 6a,b, respectively).

***In vivo* efficacy and pharmacokinetics of selected molecules.** Two out of the six compounds progressed to SMFA, TCMDC-123767 (cluster 30) and TCMDC-141154 (cluster 4), were



**Figure 4 | Diversity of biological profiles determined by use of different incubation times in the *Pf* FGAA.** Stage V gametocytes were exposed to the 90 selected compounds for 24 or 48 h to determine the drug inhibitory speed of action. In addition, compounds were added after triggering gametocyte activation to evaluate their activity in female gametes. The figure shows the number of compounds and chemical diversity classified under each category, that is, slow-acting, fast-acting or gamete-targeting compounds.

evaluated *in vivo* in the *Plasmodium berghei* murine model<sup>31</sup>. Selection criteria was based on the compound potencies in both asexual stages and gametocytes in the *Pf* FGAA, as well as on their transmission-blocking activity observed in the SMFA (Table 1). Owing to compound availability, TCMDC-141154 had to be replaced by a close analogue from cluster 4: TCMDC-140549 (Supplementary Data 3). Compounds were tested at 50 mg kg<sup>-1</sup> single dose 2-day oral treatment and efficacy was measured as a reduction of asexual blood stages parasitaemia greater than 40% compared with the vehicle-treated mice. *P. berghei* growth was not reduced above the threshold after mice treatment with any of the two compounds (Fig. 7).

Additional *in vitro* ADME and *in vivo* pharmacokinetic studies were then performed to explain the lack of activity of these two compounds. TCMDC-123767 was rapidly eliminated *in vivo* and was last detected in blood above the lower limit of quantification (LLOQ, 2.5 ng ml<sup>-1</sup>) only 1 h post-administration. Supporting this, it also showed high *in vitro* microsome clearance (7.9 ml min<sup>-1</sup> per g liver). TCMDC-140549 was estimated to possess moderate permeability through artificial membranes (170 nm s<sup>-1</sup>), which may drive a low oral bioavailability.

## Discussion

To the best of our knowledge, this paper reports the largest screening effort performed to date using an assay that utilizes *P. falciparum* gamete formation as the endpoint. The TCAMS library was screened in the *Pf* FGAA and 405 chemical-starting-points for antimalarial transmission-blocking drug discovery were identified. Further analysis of these molecules revealed that 276 compounds (25% with selectivity index >10) belonged to chemotypes never described before as gametocyte-targeting molecules.

Regarding the chemical diversity identified, a few of these compounds showed similarity with classical antimalarial scaffolds, for example, 4-aminoquinoline (TCMDC-138933, cluster 7, IC<sub>50</sub> = 0.76 μM) and diaminopyrimidine (TCMDC-137820, cluster 25, IC<sub>50</sub> = 1.06 μM) (Supplementary Data 3). The majority comprises novel chemotypes with good physicochemical properties. This TCAMS set of hits includes several scaffolds that have

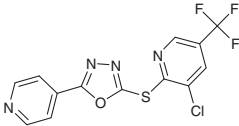
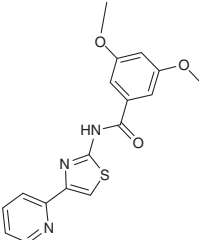
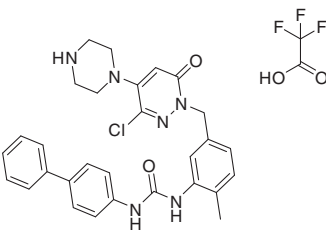
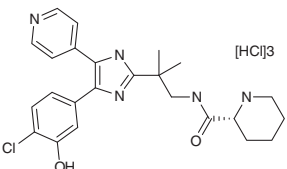
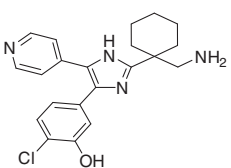
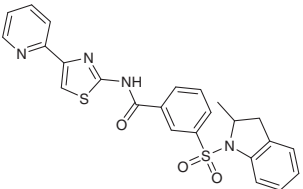
been previously identified by GSK as promising antimalarial starting points for drugs against parasite asexual stages<sup>32</sup>, and that are or have been part of internal medicinal chemistry programmes (Supplementary Fig. 1). These potential drugs can now be prioritized with the added value of being gametocyte-targeting. Interestingly, a preliminary analysis of hit structure revealed that some of the compounds are closely related to the GSK Published Kinase Inhibitor Set (PKIS)<sup>33</sup> (Supplementary Fig. 1), suggesting *Plasmodium* kinases as potential targets for these molecules.

The original literature annotation for TCAMS was also investigated. TCMDC-141611 is a compound patented by SmithKline Beecham as an inhibitor of the Tie-2 tyrosine kinase receptor, which is involved in angiogenesis. Despite the lack of a classical tyrosine kinase family in the *P. falciparum* kinome<sup>34</sup>, there is evidence for tyrosine phosphorylation being involved in regulatory functions in the parasite<sup>35</sup>. TCMDC-142257 is an antagonist of the Dopamine 2 receptor, a kind of G-protein-coupled receptor, for which there is some bioinformatic evidence in the *P. falciparum* genome<sup>36</sup>. Further investigations will be necessary to understand the mechanisms of action of these compounds and by publishing these structures we intend to stimulate research in this area.

From the point of view of malaria drug discovery, the most practical way to interrupt the *Plasmodium* lifecycle would be through the clearance of transmissible stages present in the peripheral bloodstream of infected patients. In this context, those compounds with a fast-acting profile would be preferred to those requiring longer exposure times. Overall, almost 90% of the compounds tested in this study exerted their effect in stage V gametocytes (and asexual blood stages) but not in female gametes, which revealed their potential utility for transmission-blocking strategies. Further research would be required to determine if the 12 compounds active against female gametes also target stage V gametocytes and so might have an added value as multi-stage antimalarial drugs.

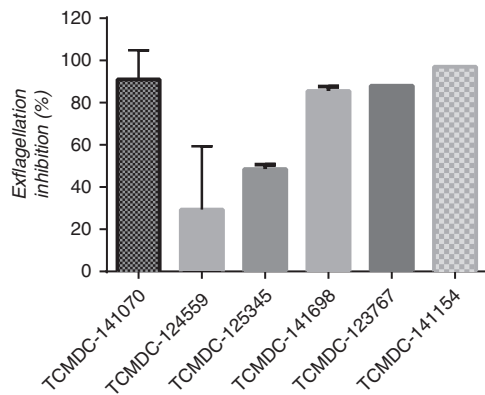
Six selected compounds with diverse biological and chemical profiles were tested in the SMFA (Table 1). Four out of the six tested compounds showed more than 80% block in transmission (Fig. 6, Table 1), while TCMDC-124559 and TCMDC-125345 had

**Table 1 | Biological and chemical profile of the six compounds tested in the SMFA.**

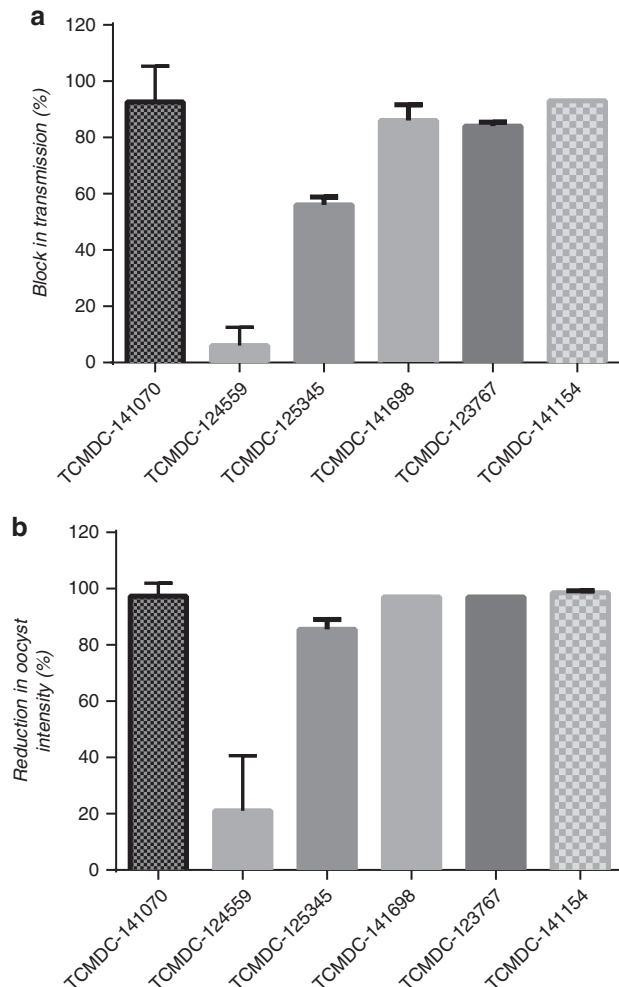
TCAMS ID	Chemical structure	Cluster number	PfFGAA IC <sub>50</sub> (μM)	SMFA concentration (μM)	Inhibition of exflagellation (%)	Block in transmission (%)	Tox <sub>50</sub> (μM)	Biological profile
TCMDC-123767		30	0.16	1	88	83	100	Slow-acting
TCMDC-125345		18	0.36	1	50	60	39.82	Fast-acting
TCMDC-141698		11	0.44	1	84	82	4.79	Gamete-targeting
TCMDC-141070		4	0.53	2	99	88	28.96	Gamete-targeting
TCMDC-141154		4	0.21	1	97	93	11.9	Gamete-targeting
TCMDC-124559		18	0.5	1	30	15	>100	Fast-acting

lower efficacy, even though all compounds had IC<sub>50</sub> values between 0.16 and 0.5 μM in the *Pf* FGAA. However, there was a good correlation between inhibition of exflagellation, reduction in oocyst intensity and block in transmission (Figs 5 and 6). This suggests that compounds affecting both male and female gamete formation may lead to a more efficacious blockade of malaria transmission.

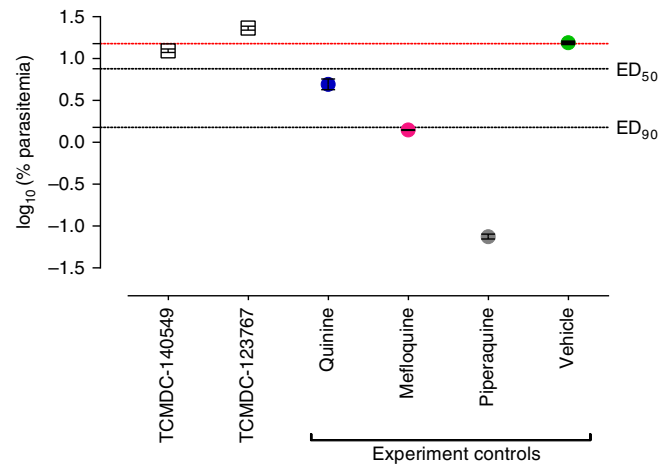
Further *in vivo* evaluation of two selected molecules, TCMDC-123767 and TCMDC-140549, in the *P. berghei* murine model<sup>31</sup> showed an ED<sub>50</sub> > 50 mg kg<sup>-1</sup> after a single dose 2-day treatment (Fig. 7). Subsequent pharmacokinetic analysis revealed very low exposure levels in blood for TCMDC-123767, which might explain the lack of effect of this molecule in the *in vivo* model. Given that both compounds showed a good



**Figure 5 | Exflagellation inhibition by six TCAMS compounds.** Stage V gametocyte cultures were exposed to 2  $\mu$ M of TCMDC-141070 and 1  $\mu$ M of the five remaining compounds for 48 h. The percentage inhibition was determined compared to DMSO-treated controls. Compounds were then progressed into SMFA to further determine the transmission blocking in mosquitoes. Each bar represents mean value of two (TCMDC-125345, TCMDC-141698, TCMDC-123767, TCMDC-141154) or three (TCMDC-141070, TCMDC-124559) independent replicates with s.d.



**Figure 6 | Effect of selected TCAMS compounds in the SMFA.** The following parameters were measured: (a) Transmission-blocking activity (prevalence reduction) and (b) reduction in mean *P. falciparum* oocyst intensity. Each bar represents mean value of two (TCMDC-125345, TCMDC-141698, TCMDC-123767, TCMDC-141154) or three (TCMDC-141070, TCMDC-124559) independent replicates with s.d.



**Figure 7 | Effect of two TCAMS hits in the *P. berghei* *in vivo* mouse model.**

Each experiment included a control group treated with vehicle (green circle) used as a reference to calculate the percentage of inhibition of parasitaemia in peripheral blood (dotted red line). The response of standard antimalarials in the same assay is also presented (blue, magenta and grey circles). Represented data are the mean  $\pm$  s.e.m. log<sub>10</sub> [% asexual blood stages at day 4] of two mice per point.

parasitological profile *in vitro*, further studies to improve stability and bioavailability will be performed to address their potential use as antimalarial drugs. Clearance of TCMDC-123767 and TCMDC-140549 may be reduced by blockade of labile positions, whereas solubility of TCMDC-123767 may be increased by incorporation of polar and/or ionizable groups.

In conclusion, the *Pf* FGAA can identify potential transmission-blocking chemotypes which, due to the biological content covered in this assay, were undetected by previous gametocyte-based assays. The TCAMS library screen yielded 276 new gametocyte-targeting molecules belonging to 57 diverse chemical entities and 3 biological profiles. Nearly 25% of the hits identified are within the appropriate physicochemical space ( $\text{clogP} < 5$ , number of aromatic rings  $< 3$ ) and will therefore be considered for further progression, while other hits represent valuable starting points as tool compounds to identify new modes of action involved in the biology of *Plasmodium* transmission.

## Methods

**Gametocyte production.** *P. falciparum* NF54 (originally isolated from an imported malaria case in the Netherlands in the 1980s; BEI Resources, cat. no. MRA-1000) asexual-stage culture was performed as described by Trager and Jensen<sup>37</sup>. Cultures synchronized at the ring stage were used to start gametocyte cultures (day 0) at 1% parasitaemia and 4% haematocrit in 200 ml final volume using culture bottles (Nalgene 3110-42, Thermo Scientific). Complete culture medium (RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  hypoxanthine, 2  $\text{g l}^{-1}$  NaHCO<sub>3</sub> and 10% pooled human male type A + serum) was totally replaced daily for 14 days without fresh erythrocyte addition. Human serum was obtained from Interstate Blood Bank, A<sup>+</sup> serotype; no aspirin 2 h before drawing and no antimalarials 2 weeks before drawing. To ensure a stable temperature at 37  $^{\circ}\text{C}$ , which is crucial for gametocyte production and maturation, pre-warmed medium and a slide warmer (XH-2001, Premiere) were used. Under these conditions, parasitaemia reaches a peak of asexual stages on days 4–5, and the first gametocytes are differentiated in culture on day 6. Sexual-stage development was monitored microscopically by Giemsa-stained thin blood smears at day 7 (mainly asexual stages and stages I to III gametocytes) and day 14 (stages IV and V gametocytes).

**Female gametocyte activation assay (*Pf* FGAA).** Cultures showing mainly stage V gametocytes were purified by differential sedimentation as previously reported<sup>28</sup>. The gametocyte concentration was adjusted to plate 8,000 gametocytes per well (100  $\mu\text{l}$  per well) in 384-well poly-D-lysine coated plates (781946, Greiner Bio-One) containing the compounds to test. Gametocytes were incubated with drugs for

either 24 h or 48 h at 37 °C (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 92% N<sub>2</sub>). Female gametocyte activation was then triggered by temperature drop and addition of xanthurenic acid (D120804, Sigma) as previously described<sup>24</sup>. To detect female gametes, monoclonal anti-Pfs25 antibody<sup>38</sup> 4B7 (BEI Resources (formerly MR4), cat. no. MRA-315) conjugated to the Cy3 fluorochrome (GE Healthcare) was added to ookinete medium (RPMI 1640 supplemented with 25 mM HEPES, 50 µg ml<sup>-1</sup> hypoxanthine, 2 g l<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, 100 µM xanthurenic acid and 20% human serum) at a final concentration of 0.5 µg ml<sup>-1</sup>. Activated cultures were then kept at 26 °C for 24 h protected from light, and image acquisition was performed in the Opera High-Content Screening System (PerkinElmer). Using ×10 air objective, five images per well were taken using 532 nm excitation. Images were analysed with a Columbus image data storage and analysis system (PerkinElmer) based on a script specifically designed for this assay that considers size, roundness and intensity of fluorescence of the female activated gametocytes.

**Gametocytocidal ATP-depletion assay.** ‘Viability’ of mature gametocytes was determined using the gametocyte ATP bioluminescence assay<sup>22</sup>. Briefly, stages IV–V gametocyte cultures were double-purified by differential sedimentation followed by magnetic isolation<sup>17</sup>. Then, parasites (50 µl per well containing 12,500 gametocytes) were added to compound pre-dispensed 384-well plates (781091, Greiner Bio-One) and incubated at 37 °C for 48 h (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 92% N<sub>2</sub>). BacTiter-Glo kit (G8231, Promega) was used to determine the ATP levels of ‘live’ parasites according to the manufacturer’s instructions. After reagent addition (50 µl per well), luminescence of the plates was measured using a microplate reader (HTS counter Victor, Wallac).

**Exflagellation assay.** Exflagellation was measured as previously reported<sup>24</sup> with minor modifications. Using 5 ml of day-14 gametocyte cultures, parasites were incubated with the corresponding concentration for each compound in six-well plates at 37 °C (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 92% N<sub>2</sub>). After 48 h incubation, a 200 µl sample was spun down in a microfuge, the supernatant was carefully removed and the pellet resuspended in 15 µl of pre-warmed ookinete medium. Parasites were placed in Fast-Read disposable haemocytometer slides and, after 15 min at room temperature (22 °C), exflagellation centres per field were counted under ×10 objective.

**Standard membrane feeding assay (SMFA).** Day-14 gametocyte cultures were plated in pre-warmed six-well-plates (5 ml per well) and were exposed to the compounds (1 µM or 2 µM final concentration) for 48 h at 37 °C (3% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 92% N<sub>2</sub>). Within this incubation time, 3 ml of media were removed after the first 24 h and replenished with the same volume of fresh media with compound added to obtain the required final concentration. After 48 h of total exposure, cultures were centrifuged at 2,500 g for 3 min at 37 °C, diluted 1:1 with 100% packed volume of fresh erythrocytes and finally formulated as artificial mosquito blood meals at 50% haematocrit with pre-warmed human serum. All steps were performed at 37 °C to avoid gametocyte activation. Four- to six-day old female *Anopheles stephensi* mosquitoes (GlaxoSmithKline Insectary) were fed for 30 min via Parafilm membrane attached to glass feeders (12831283, Fisher Scientific) connected to a 37 °C circulating water bath. Fed mosquitoes were maintained in an incubator at 27 °C and 75% relative humidity with 12 h light/dark cycles. Seven to eight days post-feeding, mosquitoes with fully developed ovaries were dissected for midguts, which were rinsed in a 0.2% mercury-dibromofluorescein (63869, Fluka) in water solution for 10 min. Total number of oocysts in individual midguts were counted using a light microscope (DM2000, Leica) under a ×10 objective. The percentage of block in transmission (reduction in prevalence) and the percentage of reduction in mean oocyst intensity were calculated after normalizing to the control DMSO-treated sample. Two to three independent SMFA experiments were performed and two internal duplicates of 40 mosquitoes each were used per compound. Mean oocyst intensities were not less than two oocysts per mosquito and the prevalence of infection ranged from 70 to 90% in the fed mosquito control groups. See complete experimental data set in Supplementary Table 1 and Supplementary Note 1.

**HepG2 cytotoxicity assay.** Actively growing HepG2 cells (HB-8065, ATCC) were detached from the culture surface and dispersed with 5 ml of Eagle’s Minimum Essential Media (supplemented with 10% FBS/1% NEAA solution/1% penicillin + streptomycin) by repeated pipetting. Cell suspension was added to 500 ml of the same medium at a final density of  $1.2 \times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup> and 25 µl per well were seeded in 384-well-plates with pre-dispensed compounds (250 nl per well) using a Multidrop combi dispenser (Thermo Scientific); this number of cells (typically 3,000 cells per well) ensures that new monolayers were not more than ~50% confluent at the time of seeding. Cells were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator for 48 h. After incubation, plates and CellTiter-Glo Reagent (G7571, Promega) were equilibrated at room temperature for 30 min before proceeding to develop the luminescent signal. Using a Multidrop combi dispenser, 25 µl per well of the signal developer were added to the plates and after 10 min at room temperature for stabilization, plates were read on the ViewLux system (Perkin Elmer).

**Evaluation of *in vivo* antimalarial therapeutic efficacy.** Pathogen-free CD1 mice (Hsd:ICR) were obtained from Harlan Interfauna Iberica (Barcelona, Spain). Eight weeks old female CD-1 mice were infected intravenously with 10<sup>7</sup> infected erythrocytes (day 0). Dosing solutions were prepared in water containing 5% DMSO/20% Captisol, at a target dose of 50 mg kg<sup>-1</sup>. Mice received two oral doses once a day according to their body weight (20 ml kg<sup>-1</sup>) starting at day 2 after infection. Control mice received the same treatment schedule with the vehicle used for the compound preparation. Samples from mice peripheral blood were taken before starting treatment and 24 h after finishing the dosing, to measure parasitaemia by flow cytometry, using the YOYO-1 staining<sup>39</sup>, to assess the reduction of parasitaemia compared with the vehicle-treated mice.

***In vivo* pharmacokinetic studies.** Female CD-1 mice (Harlan Interfauna Iberica) at 8 weeks of age were used for single oral dose pharmacokinetic studies ( $n = 2$ ). Dosing solutions were prepared in 20% (v:v) Captisol in water, at a target dose of 50 mg kg<sup>-1</sup> (dose volume of 20 ml kg<sup>-1</sup>). After oral dosing, blood samples (25 µl) were collected at 30 min, 1 h, 6 h and 8 h post dose for TCMDC-123767. All the blood samples were diluted with 25 µl of an aqueous solution of saponine 1% (w:w), and stored at -80 °C until analysis. Mice blood samples were analysed for each compound using a method upon protein precipitation followed by LC-MS/MS analysis (Applied Biosystems). Data analysis of the concentration time profiles was performed by noncompartmental methods by using WinNonLin Phoenix Version 6.3.

**Intrinsic clearance assay.** Intrinsic clearance (CL<sub>i</sub>) values were determined in mouse liver microsomes (M1000, XenoTech). Test compounds (final concentration 0.5 µM) were incubated at 37 °C for 45 min in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 mg microsomal protein per ml. The reaction was started by addition of cofactor NADPH (N1630, Sigma) at 1 mM final concentration. The final concentration of organic solvent (DMSO) was limited to 0.25% of the final volume. At 0, 5, 15, 30, and 45 min, an aliquot (100 µl) was taken, quenched with acetonitrile containing an appropriate internal standard, and analysed by HPLC-MS/MS (Applied Biosystems). CL<sub>i</sub> was determined from the first-order elimination constant by nonlinear regression, corrected for the volume of the incubation and assuming 48 microsomal mouse protein per g liver. Values for CL<sub>i</sub> were expressed as ml min<sup>-1</sup> per g liver.

**Artificial membrane permeability assay (AMPA).** It is a 96-well plate-based assay that measures the speed of permeation of a compound (at 10 µM concentration) through a phospholipid membrane, consisting in 1.8% egg 1-*a*-phosphatidylcholine (830051, Avanti Polar Lipids) and 1% cholesterol (C8667, Sigma) dissolved in *n*-decane (D0011, TCI American). Phosphate buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with 0.5% 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin), pH 7.05, is added to the top and bottom of the plate (SSEJ046I08, MilliPore Corp.). The lipids are allowed to form bilayers across the small holes in the filter and compound concentration is measured 3 h later in both donor and the acceptor compartments by HPLC (Agilent 1100 LC). Permeability ( $P$ ) (nm s<sup>-1</sup>) is calculated using the following formulas:

$$P = -10^7 \ln \left( 1 - \frac{C_R}{C_{EQ}} \right) \frac{V_D}{1 - X} \frac{1}{At},$$

$$C_{EQ} = \frac{(C_R V_R) + (C_D V_D)}{V_R + V_D},$$

where  $X = V_D/V_R$ ;  $C_R$  and  $C_D$  are final concentrations in receiver and donor side, respectively;  $V_R$  and  $V_D$  are volumes in receiver and donor compartment, respectively;  $A$  is the area (cm<sup>2</sup>) and  $t$  is the incubation time (s). The considered cut-off values are as follows: High:  $P > 200$  nm s<sup>-1</sup>; Medium:  $10$  nm s<sup>-1</sup> <  $P < 200$  nm s<sup>-1</sup>; Low:  $P < 10$  nm s<sup>-1</sup>.

**Ethics statement.** All the experiments were ethically reviewed and approved by the GlaxoSmithKline Diseases of the Developing World (DDW) Group Ethical Committee on Animal Research and were conducted according to Spanish legislation, European Directive 2010/63/EU and GlaxoSmithKline policy on the Care, Welfare and Treatment of Laboratory animals.

**Compounds and controls.** Compounds were dissolved in 100% DMSO and dispensed in the 384-well plates using an Echo-CRS liquid handler. Compounds were tested in 2–3 independent experiments. For each assay, both positive (a drug highly effective against the biological process) and negative (the vehicle consisting in 0.5% DMSO) controls were added and a minimum of ten wells per plate were analysed. Based on that,  $Z'$  factor was calculated for each plate and only those ones with values higher than 0.4 were considered acceptable for data analysis.

**Data analysis.** Data were normalized to percentage of inhibition of the biological response by using positive (that is, highest inhibition achieved by a drug, ICtrl2) or negative (that is, lowest inhibition achieved in the absence of drug but in presence

of the vehicle 0.5% DMSO, ICtrl1) controls following the equation described below:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left[ \frac{X - \text{Ctrl2}}{\text{Ctrl1} - \text{Ctrl2}} \times 100 \right],$$

where  $X$  is the inhibition of measured process for the compound  $X$ . Ctrl1 and Ctrl2 are calculated as the average of replicates in the same microtiter plate where compound  $X$  is tested.

Assay performance statistics, such as signal to background ratio,  $Z'$  and robust 3 s.d. activity cut-off were calculated using templates in ActivityBase XE (IDBS, Guilford, Surrey, UK). Hit population analysis and visualization were conducted using Spotfire DecisionSite (Spotfire, Inc., Somerville, MA, USA). The  $\text{pIC}_{50}$  ( $-\log \text{IC}_{50}$ ) values were obtained using the ActivityBase XE nonlinear regression function in the full curve analysis bundle.

**Data availability.** The GSK TCAMS dataset for *P. falciparum* whole cell screening was deposited in ChEMBL-NTD, [www.ebi.ac.uk/chemblntd](http://www.ebi.ac.uk/chemblntd). Additional chemical structures of compounds described in this study can be found in <https://www.ebi.ac.uk/chembl/index.php/>

The authors declare that all relevant data supporting the findings of this study are available within the article and its Supplementary Information files or are available from the authors on request.

## References

- World Health Organization. World Malaria Report 2015 <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/> (2015).
- World Health Organization. Global technical strategy for malaria 2016–2030 [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/176712/1/9789241564991_eng.pdf) (2015).
- Alonso, P. L. *et al.* A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.* **8**, e1000406 (2011).
- World Health Organization. WHO briefing on malaria treatment guidelines and artemisinin monotherapies [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting\\_briefing19april.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting_briefing19april.pdf) (2006).
- Shekalaghe, S. *et al.* Primaquine clears submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocytes that persist after treatment with sulphadoxine-pyrimethamine and artesunate. *PLoS ONE* **2**, e1023 (2007).
- Okell, L. C., Drakeley, C. J., Ghani, A. C., Bousema, T. & Sutherland, C. J. Reduction of transmission from malaria patients by artemisinin combination therapies: a pooled analysis of six randomized trials. *Malar. J.* **7**, 125 (2008).
- White, N. J. *et al.* Assessment of therapeutic responses to gametocytocidal drugs in *Plasmodium falciparum* malaria. *Malar. J.* **13**, 483 (2014).
- El-Sayed, B. *et al.* A randomized open-label trial of artesunate- sulfadoxine-pyrimethamine with or without primaquine for elimination of sub-microscopic *P. falciparum* parasitaemia and gametocyte carriage in eastern Sudan. *PLoS ONE* **2**, e1311 (2007).
- Graves, P. M., Gelband, H. & Garner, P. Primaquine or other 8-aminoquinoline for reducing *Plasmodium falciparum* transmission. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2**, Cd008152 (2015).
- Cabrera, M. & Cui, L. *In vitro* activities of primaquine-schizonticide combinations on asexual blood stages and gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 7650–7656 (2015).
- White, N. J. Primaquine to prevent transmission of *falciparum* malaria. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 175–181 (2013).
- World Health Organization. Policy brief on single-dose primaquine as a gametocytocidal in *Plasmodium falciparum* malaria [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who\\_htm\\_gmp\\_2015.1.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/who_htm_gmp_2015.1.pdf) (2015).
- Ashley, E. A., Rejt, J. & White, N. J. Primaquine: the risks and the benefits. *Malar. J.* **13**, 418 (2014).
- St Laurent, B. *et al.* Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* clinical isolates can infect diverse mosquito vectors of Southeast Asia and Africa. *Nat. Commun.* **6**, 8614 (2015).
- Saunders, D. & Lon, C. Combination therapies for malaria are failing—what next? *Lancet Infect. Dis.* **16**, 274–275 (2016).
- Amaratunga, C. *et al.* Dihydroartemisinin-piperazine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 357–365 (2016).
- Lelievre, J. *et al.* Activity of clinically relevant antimalarial drugs on *Plasmodium falciparum* mature gametocytes in an ATP bioluminescence ‘transmission blocking’ assay. *PLoS ONE* **7**, e35019 (2012).
- D’Alessandro, S. *et al.* A *Plasmodium falciparum* screening assay for anti-gametocyte drugs based on parasite lactate dehydrogenase detection. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2048–2058 (2013).
- Tanaka, T. Q. *et al.* A quantitative high throughput assay for identifying gametocytocidal compounds. *Mol. Biochem. Parasitol.* **188**, 20–25 (2013).
- Duffy, S. & Avery, V. M. Identification of inhibitors of *Plasmodium falciparum* gametocyte development. *Malar. J.* **12**, 408 (2013).
- Cevenini, L. *et al.* Multicolor bioluminescence boosts malaria research: quantitative dual-color assay and single-cell imaging in *Plasmodium falciparum* parasites. *Anal. Chem.* **86**, 8814–8821 (2014).
- Almela, M. J. *et al.* A new set of chemical starting points with *Plasmodium falciparum* transmission-blocking potential for antimalarial drug discovery. *PLoS ONE* **10**, e0135139 (2015).
- Plouffe, D. M. *et al.* High-throughput assay and discovery of small molecules that interrupt malaria transmission. *Cell Host Microbe* **19**, 114–126 (2016).
- Delves, M. J. *et al.* Male and female *Plasmodium falciparum* mature gametocytes show different responses to antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3268–3274 (2013).
- Ruecker, A. *et al.* A male and female gametocyte functional viability assay to identify biologically relevant malaria transmission-blocking drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 7292–7302 (2014).
- Baragaña, B. *et al.* A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* **522**, 315–320 (2015).
- Le Bihan, A. *et al.* Characterization of novel antimalarial compound ACT-451840: preclinical assessment of activity and dose-efficacy modeling. *PLoS Med.* **13**, e1002138 (2016).
- Miguel-Blanco, C. *et al.* Imaging-based high-throughput screening assay to identify new molecules with transmission-blocking potential against *Plasmodium falciparum* female gamete formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3298–3305 (2015).
- Gamo, F. J. *et al.* Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **465**, 305–310 (2010).
- Leach, A. R. & Gillet, V. J. *An Introduction to Chemoinformatics* 21–24 (Springer, 2007).
- Jiménez-Díaz, M. B. *et al.* A new *in vivo* screening paradigm to accelerate antimalarial drug discovery. *PLoS ONE* **8**, e66967 (2013).
- Calderon, F. *et al.* An invitation to open innovation in malaria drug discovery: 47 quality starting points from the TCAMS. *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 741–746 (2011).
- Drewry, D. H., Willson, T. M. & Zuercher, W. J. Seeding collaborations to advance kinase science with the GSK Published Kinase Inhibitor Set (PKIS). *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 340–342 (2014).
- Shiu, S. H. & Li, W. H. Origins, lineage-specific expansions, and multiple losses of tyrosine kinases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 828–840 (2004).
- Solyakov, L. *et al.* Global kinomic and phospho-proteomic analyses of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.* **2**, 565 (2011).
- Madeira, L. *et al.* Genome-wide detection of serpentine receptor-like proteins in malaria parasites. *PLoS ONE* **3**, e1889 (2008).
- Trager, W. & Jensen, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**, 673–675 (1976).
- Barr, P. J. *et al.* Recombinant Pfs25 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in experimental animals. *J. Exp. Med.* **174**, 1203–1208 (1991).
- Angulo-Barturen, I. *et al.* A murine model of *falciparum*-malaria by *in vivo* selection of competent strains in non-myelodepleted mice engrafted with human erythrocytes. *PLoS ONE* **3**, e2252 (2008).

## Acknowledgements

This work was supported by Bill and Melinda Gates Foundation grant OPP1043501.

We thank Richard Priest from Biological Sciences at GSK (Stevenage, UK) for the production and conjugation of anti-Pfs25 antibody. We also thank the GSK Sample Management Technologies team for the preparation of compound pre-dispensed 384-well plates. Likewise, we are grateful to Dr David Calvo and Juliana Sanchez for the culture and maintenance of *An. stephensi* colonies used to perform SMFA experiments. Naomi Richardson of Magenta Communications Ltd provided editorial assistance with the manuscript, funded by GlaxoSmithKline. Dr Jake Baum is supported by an Investigator Award from the Wellcome Trust (100993/Z/13/Z).

## Author contributions

C.M.-B., I.M. and E.H. planned, designed and supervised the work. C.M.-B. and I.M. performed the screening assays, biological profiling and contributed to data analysis. A.I.B. performed data analysis of primary screening, dose-responses and further profiling. G.C. performed the cheminformatic analysis after each screening step. B.D., L.d.l.H. and E.F. performed the computational and chemical clustering. S.L., C.G. and J.R. performed the SMFA experiments and data analysis. A.R. and M.J.D. contributed to define the different biological profiles of hits. S.V. performed the *in vivo* experiments. M.S.M.-M. performed pharmacokinetic studies. E.H., R.E.S. and J.B. managed the project. C.M.-B., I.M., B.D., L.d.l.H., J.R., S.V., M.S.M.-M. and G.C. wrote different sections of the manuscript and/or prepared figures and tables. C.M.-B. integrated individual contributions and issued the final manuscript. All authors reviewed the manuscript and accept responsibility for its publication.

**Additional information**

**Supplementary Information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

**Competing interests:** The authors declare no competing financial interests.

**Reprints and permission** information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

**How to cite this article:** Miguel-Blanco, C. *et al.* Hundreds of dual-stage antimalarial molecules discovered by a functional gametocyte screen. *Nat. Commun.* **8**, 15160 doi: 10.1038/ncomms15160 (2017).

**Publisher's note:** Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017