

# Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria

Dolores González Pacanowska

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Parque Tecnológico Ciencias de la Salud

**Correspondencia:** Dolores González Pacanowska

Parque Tecnológico Ciencias de la Salud. Avda. del conocimiento, s/n. 18100 Armilla. Granada

## Resumen

La malaria es la enfermedad parasitaria de mayor impacto mundial desde el punto de vista del número de individuos enfermos y sus implicaciones socioeconómicas. El tratamiento ha sido posible durante muchos años gracias a la existencia de un número limitado de fármacos no exentos de limitaciones de tipo farmacológico aunque el problema más acuciante de carácter reciente es la aparición de resistencias. En los últimos tiempos se han producido una serie de avances que abren nuevas expectativas en el desarrollo de antimaláricos. La finalización del proyecto genoma de *Plasmodium falciparum* junto con el conocimiento cada vez mayor del mecanismo de acción de ciertos fármacos y de las bases moleculares de la resistencia constituyen el punto de partida para la identificación de nuevos compuestos. Por un lado se han desarrollado combinaciones nuevas de fármacos ya existentes o análogos y derivados de clases de compuestos de eficacia reconocida con el fin de generar nuevas combinaciones que sean activos incluso frente a cepas resistentes. Por otro lado, se han caracterizado toda una serie de potenciales dianas terapéuticas, esenciales para la viabilidad, que surgen como consecuencia del conocimiento del parásito y que, desde una perspectiva multidisciplinar, se estudian para desarrollar inhibidores específicos a partir de información funcional y estructural.

**Palabras clave:** Malaria. Fármacos. Resistencia. Nuevas dianas terapéuticas. *Plasmodium*.

## Summary

Malaria is the most important parasitic disease due to the number of people infected and its social and economical implications. Treatment has been feasible in the past relying on a few effective drugs which exhibited several pharmacological limitations being drug resistance the most severe problem encountered in recent years. Lately, significant advances have allowed for the development of new strategies in drug development. The completion of the *Plasmodium falciparum* genome together with the increasing understanding of mode of action of certain drugs and the molecular basis of drug resistance have set the starting point for new drug development initiatives. On the one hand new combinations of usual drugs or new derivatives of clinically active compounds emerge as a new strategy for treatment even against resistant cases. On the other hand, as a result of the understanding of the genome and the biology of the parasite, a set of novel drug targets, essential for viability, are being characterized in order to obtain functional and structural information exploitable in the drug design process.

**Key words:** Malaria. Drugs. Resistance. New drug targets. *Plasmodium*.

## Introducción

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante desde el punto de vista del número de individuos enfermos y su impacto socioeconómico. Afecta a individuos que habitan las regiones tropicales y subtropicales del planeta aparte de constituir un problema creciente en viajeros que visitan los países endémicos. Existen cuatro especies de *Plasmodium* (*Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae*) que producen la malaria en humanos pero sin duda la infección causada por *Plasmodium falciparum* es la más peligrosa ocasionando la muerte en muchos casos.

La malaria es un problema de salud pública en más de 90 países, habitados por un total de 2.400 millones de personas; más de un 40% de la población mundial. La prevalencia de la enfermedad se estima en unos 300-500 millones de casos clínicos anuales y más del 90% de los casos de malaria se encuentran en la África sub-sahariana y la mortalidad es de aproximadamente 1-2 millones de muertes cada año. La mayoría de las muertes ocurren en niños pequeños, especialmente en áreas rurales remotas con poco acceso a asistencia médica. Es la enfermedad tropical de mayor impacto y causa un número de muertes superior a la de cualquier otra enfermedad transmisible. En muchos países en desarrollo, especialmente África, el coste material y de vidas humanas es enorme aunque lamentablemente, es una enfermedad curable con un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado.

Los parásitos se transmiten por mosquitos del género *Anopheles* y tras la picadura, se establece una infección asintomática en células hepáticas. Después de un periodo de incubación de aproximadamente una semana, se liberan las formas sanguíneas del parásito que se desarrollan y multiplican en el interior de eritrocitos. El parásito produce proteínas que se transportan y se sitúan en la membrana del eritrocito. Tales proteínas hacen que el eritrocito se pegue a las paredes de los vasos sanguíneos originando la obstrucción de los mismos. En la malaria cerebral, una complicación severa de la malaria producida por *P. falciparum*, el secuestro de eritrocitos infectados en los vasos sanguíneos se asocia con una pérdida del conocimiento y la afección resulta letal si no es tratada. Los parásitos de las especies *P. vivax* y *P. ovale*, se caracterizan por presentar la fase de hipnozoíto que pueden persistir durante años en el hígado y causar recidivas periódicamente.

El tratamiento ha sido posible durante muchos años gracias a la existencia de un número restringido de fármacos presentando cada uno de ellos una serie de limitaciones de tipo farmacológico aunque el problema más acuciante de carácter reciente es la aparición de resistencias y a ello se

debe en parte la progresión actual de la enfermedad<sup>1</sup>. Los fármacos de mayor utilización como son la cloroquina y la asociación de sulfadoxina y pirimetamina presentan beneficios limitados y en determinados casos son de una eficacia cuestionable debido a los fenómenos de resistencia<sup>2,3</sup>.

No obstante, recientemente se han producido una serie de avances que abren nuevas expectativas en el desarrollo de antimaláricos. El advenimiento del proyecto genoma<sup>4</sup> junto con el conocimiento cada vez mayor del mecanismo de acción de ciertos fármacos y de las bases moleculares de la resistencia constituyen el punto de partida para identificación de nuevos compuestos. El análisis comparado del proyecto genoma ha dado lugar a información esencial en relación a procesos metabólicos específicos, la diferenciación, la invasión celular, la patogenicidad etc. todo ello utilizable en el diseño de nuevos fármacos<sup>5</sup>. Estudios en los campos de la genómica funcional y estructural sin duda darán lugar a un conjunto de conocimientos que serán explotables para el diseño de nuevas cabezas de serie.

En relación con las estrategias utilizadas en la identificación de nuevos compuestos aplicables al control de la malaria existe dos tendencias actuales: 1. por una parte se están utilizando combinaciones nuevas de fármacos ya conocidos o derivados de clases de compuestos de eficacia reconocida con el fin de generar análogos que sean activos incluso frente a cepas resistentes; 2. en segundo lugar, se han identificado una serie de potenciales dianas terapéuticas, esenciales para la viabilidad que resultan del conocimiento del parásito, y que desde una perspectiva "racional" se estudian para desarrollar inhibidores específicos a partir de información funcional y estructural. Ambas estrategias están generando un conjunto de moléculas prometedoras que unido a la existencia de iniciativas a escala mundial para financiar estudios destinados al desarrollo de nuevos compuestos (Medicines for Malaria Venture, The Bill and Melinda Gates Foundation) abren la posibilidad de que en un futuro próximo se dispongan de nuevos agentes quimioterapéuticos para controlar la enfermedad.

## Fármacos antimaláricos de uso tradicional

Entre los fármacos de uso extendido para el tratamiento de la malaria y atendiendo a su mecanismo de acción se encuentran, a grandes rasgos, los que actúan a nivel de la detoxificación del grupo hemo o los que interfieren con el metabolismo del ácido fólico. Ejemplos de los primeros son la cloroquina y derivados y los endoperóxidos como la artemisina mientras que entre los segundos se encuentran las sulfamidas y la pirimetamina.

Dentro de los compuestos que se vienen utilizando durante los últimos cuarenta años se pueden citar las quinoleínas entre las que cabe reseñar la cloroquina (4-aminoquinoleínas), la quinina y la mefloquina (aril amino alcoholes). Su mecanismo de acción exacto está sujeto a controversia aunque está demostrado que interfieren con la ruta de degradación de la hemoglobina (Hb) uniéndose a la ferriprotoporfirina IX<sup>6</sup>. Durante las fases intraeritrocíticas, el parásito ingiere por fagocitosis la hemoglobina que se transporta posteriormente a la vacuola digestiva. En el interior de esta vacuola se digiere la globina por acción de una serie de proteasas mientras que el grupo hemo se convierte en un material cristalino insoluble denominado hemozoína o pigmento malárico mediante un mecanismo conocido como la polimerización del grupo hemo. Mecanismos alternativos de destrucción del grupo hemo lo constituyen su oxidación por acción del peróxido de hidrógeno o su destrucción de forma minoritaria en el citosol por intervención del glutatión en estado reducido<sup>7</sup>. Parece ser que las aminoquinoleínas también interfieren en estos dos últimos procesos<sup>8</sup>.

Otro conjunto de compuestos de extrema utilidad en el tratamiento de la malaria lo forman los antifolatos que actúan a distintos niveles del metabolismo del ácido fólico. Así se distinguen las sulfamidas que inhiben a la dihidropteroato sintasa, una enzima clave implicada en la síntesis del ácido fólico o compuestos como el cicloguanilo y la pirimetamina que son inhibidores de la dihidrofolato reductasa una enzima responsable de la regeneración del cofactor en estado reducido y que se encuentra asociada a la timidilato sintasa en una enzima bifuncional esencial para la síntesis celular de timidilato<sup>9</sup>. Asociaciones de ambos tipos de fármacos han resultado ser extremadamente eficaces en el tratamiento pero mutaciones en la proteína blanco han generado múltiples casos de resistencia lo que unido a casos de hipersensibilidad a las sulfamidas durante su uso en la profilaxis, hace que su uso presente limitaciones<sup>10</sup>.

La artemisina y sus derivados constituyen una clase de fármacos que si bien se vienen utilizando desde hace mucho tiempo en el tratamiento de la enfermedad, recientemente se han sintetizado una serie de derivados de elevada eficacia que constituyen alternativas extremadamente prometedoras en cuanto a su posible utilización en la clínica a corto plazo. La artemisina es un 1,2,4-trioxano que se obtiene a partir de la planta *Artemisia annua*<sup>10</sup> y que ha sido utilizado durante siglos en la medicina tradicional china como un tratamiento para la fiebre y la malaria. En el año 1971, químicos chinos aislaron el compuesto activo responsable de su acción terapéutica y lo denominaron qinghaosu (artemisinina). La artemisina es una lactona sesquiterpénica cuyo potencial terapéutico es limitado por su baja solubilidad. Sin embargo derivados semisintéticos como el artesunato, el artemeter o el arteeter, de mayor potencia que la artemisina, se están utilizando desde hace tiempo en la clínica con una elevada eficacia habiéndose descrito relativamente pocos casos de resistencia. En cuanto a su mecanismo de acción, su actividad biológica es dependiente de la rotura del enlace peróxido tras la interacción con el F<sub>1</sub> del grupo hemo en el interior de la vacuola digestiva generándose radicales libres con capacidad alquilante que alquilan el grupo hemo y posiblemente otras proteínas del parásito<sup>12</sup>. Adicionalmente, los endoperóxidos también parecen actuar a nivel de la formación de la hemozoína o como fuente de radicales hidroxilo<sup>13</sup>. Estudios muy recientes apuntan que la artemisina es un inhibidor de la SERCA (Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplásmico, PfATP6) de *Plasmodium*<sup>14</sup>. Recientemente se ha descrito un conjunto de derivados que presentan una elevada estabilidad química y una pronunciada actividad antimalárica tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>15</sup>.

Finalmente dentro del conjunto de compuestos de utilización habitual cabe destacar determinados antibióticos desarrollados como antibacterianos que también exhiben actividad antimalárica y tienen aplicaciones profilácticas. Su modo de acción se basa en que el parásito presenta un orgánulo típico del orden Apicomplexa que se conoce como el apicoplasto<sup>16</sup>. Este organelo fue adquirido supuestamente mediante un proceso de endosimbiosis con un alga unicelular y ha perdido su capacidad fotosintética pero tiene una serie de funciones metabólicas esenciales como son la síntesis del grupo hemo, la síntesis de isoprenoides (ruta DOXP)<sup>17</sup> y la síntesis de ácidos grasos<sup>18</sup>. Adicionalmente el apicoplasto tiene un genoma circular residual que codifica una serie de proteínas y que presenta capacidad de replicación. Los antibióticos actúan inhibiendo estos procesos y por ello compuestos como las tetraciclinas y la rifampicina presentan actividad antimalárica. Asimismo algunos compuestos inhiben la síntesis de proteínas mitocondrial<sup>19</sup>.

## Nuevas estrategias y perspectivas en el desarrollo de antimaláricos

Como consecuencia del creciente conocimiento de la bioquímica y el genómica del parásito se han identificado una serie de procesos o rutas metabólicas que constituyen potenciales dianas terapéuticas y que ofre-

cen numerosas posibilidades para el desarrollo de compuestos totalmente nuevos desde el punto de vista de su modo de acción. Sin embargo, aunque existen varios ejemplos de aproximaciones al desarrollo de nuevos fármacos, hasta la fecha la mayoría se encuentran en la fase de identificación de cabezas de serie con actividad antiplasmodio o en período de optimización con el fin de generar compuestos con propiedades terapéuticas adecuadas. Solo algunos ejemplos están en fase de estudios preclínicos. Algunos de los ejemplos más significativos de compuestos en fase de desarrollo son:

1. Los inhibidores de proteasas
2. Inhibidores de la síntesis de ácidos grasos
3. Inhibidores de la ruta de biosíntesis de isoprenoides
4. Compuestos que interfieren con el transporte y el metabolismo de fosfolípidos
5. Inhibidores del metabolismo mitocondrial
6. Inhibidores del metabolismo de pirimidinas.

### **Inhibidores de proteasas**

Dado que la parte proteica de la hemoglobina debe ser degradada a los aminoácidos correspondientes para ser utilizados como fuente para la síntesis de proteínas por parte del parásito, la inhibición de este proceso resulta letal. Igualmente, proteínas del citoesqueleto del eritrocito también son degradadas durante el proceso de invasión y ruptura. Se han identificado una serie de proteasas específicas implicadas en la degradación de la globina como son las plasmepsinas (aspartato proteasas), la falcipaina (una cisteína proteasa), la falcilisina (una metaloproteasa) y una histospartato proteasa no-convencional. Inhibidores de estas enzimas constituyen potenciales antimaláricos y se han realizado múltiples estudios con el fin de intentar identificar inhibidores específicos que sean activos en modelos murinos de la enfermedad<sup>20</sup>. Así por ejemplo se han descrito un conjunto de peptidil fluorometil cetonas y peptidil vinil sulfonas que son potentes inhibidores de la falcipaina 2 y que presentan una elevada actividad antimalárica *in vitro* aunque tiene limitaciones debido a su toxicidad y propiedades farmacocinéticas<sup>21,22</sup>.

### **Inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos**

En relación con la síntesis de ácidos grasos, es de destacar las peculiaridades características que reviste este proceso en bacterias y en cloroplastos dado que contienen un sistema denominado tipo II (FASII) en el que cada reacción en el proceso de biosíntesis está catalizada por una proteína independiente monofuncional al contrario de células de mamífero donde la síntesis está mediada por una proteína multifuncional conocida como la ácido graso sintetasa de tipo I<sup>23</sup>. Inhibidores de enzimas de la ruta son el triclosan y la tiolactomicina, un metabolito secundario de hongos y están en desarrollo nuevos compuestos con potencial terapéutico<sup>24</sup>.

### **Fármacos dirigidos a la ruta de biosíntesis de isoprenoides**

La síntesis de isoprenoides constituye una ruta metabólica que ha recibido una considerable atención en *Plasmodium* por varios motivos. Por una parte es de subrayar las especiales características que presenta la síntesis del isopentenil pirofosfato, un intermediario de la ruta, que tiene lugar a través de un conjunto de reacciones que se conocen como la ruta DOXP (1-deoxi-D-xilulosa 5-fosfato) o ruta independiente de ácido mevalónico. Este proceso ocurre en el apicoplasto y se encuentra ausente en células de mamíferos que utilizan un conjunto de reacciones diferente<sup>25</sup>. La fosmidomicina y derivados son inhibidores de la DOXP reductoisomerasa,

una enzima clave de la ruta pero carecen de eficacia terapéutica por el momento pues tras el tratamiento aparecen recrudescencias de la enfermedad<sup>26</sup>. Otro proceso relacionado con la síntesis de isoprenoides y que presenta perspectivas altamente esperanzadoras con vistas al desarrollo de inhibidores específicos es la isoprenilación de proteínas, reacción que está catalizada por las llamadas prenil transferasas siendo la más estudiada en el caso de *Plasmodium* la farnesil transferasa<sup>27</sup>. Inhibidores de este tipo de enzimas han sido desarrollados intensamente por su actividad antitumoral ya que determinadas proteínas implicadas en transducción de señales como ras o rho GTPasas se activan mediante la adición de un residuo farnesilo que permite su inserción en la membrana<sup>28</sup>. La farnesil transferasa es una proteína heterodimérica que cataliza la transferencia de un residuo farnesilo desde el farnesil difosfato al extremo carboxilo de la proteína que se farnesila. La mayoría de los compuestos son péptidomiméticos de la secuencia de reconocimiento CaaX (C=cisteína, a= aminoácido de cadena lateral alifática, X= serina o metionina) aunque recientemente se han sintetizado análogos que presentan propiedades farmacocinéticas mejoradas<sup>29</sup>.

En relación con esta ruta igualmente se ha descrito que inhibidores de otra enzima implicada en la síntesis de isoprenoides, la farnesil difosfato sintetasa, también tienen capacidad para inhibir el crecimiento de *Plasmodium*. Estos compuestos pertenecen al grupo de los bisfosfonatos y fueron desarrollados originalmente para el tratamiento de la osteoporosis pero posteriormente han demostrado un enorme potencial antiprotozoario<sup>30</sup>.

### **Inhibidores del metabolismo de fosfolípidos y la actividad mitocondrial**

Otro proceso que tiene lugar durante las fases intraeritrocíticas del parásito es la síntesis activa de estructuras de membrana. Uno de los componentes principales de las membranas del parásito es el fosfolípido fosfatidilcolina cuya síntesis a su vez depende de la incorporación de colina exógena a partir de la sangre. Distintos análogos de la colina exhiben una potente actividad antimalárica y se asume que inhiben el transporte de colina que tiene lugar a través de un transportador específico localizado en la membrana del parásito<sup>31</sup>. Varios de estos compuestos exhiben una potentísima actividad frente al parásito incluso en modelos animales y actualmente se encuentran en fase de optimización sus propiedades farmacológicas y biodisponibilidad<sup>32</sup>. Algunos de estos análogos también parecen interferir con la formación de hemozoína.

Existen un conjunto de compuestos que interfieren con la actividad mitocondrial del parásito. Las fases intraeritrocíticas tiene un metabolismo mitocondrial activo estando presentes todas las enzimas implicadas en el ciclo de los ácido tricarbóxicos y determinados componentes de la cadena de transporte electrónico. Así la cadena respiratoria del parásito constituye un blanco de acción de fármacos siendo ejemplos de compuestos que actúan a este nivel la atovaquona un fármaco que se une al sitio de oxidación del Coenzima Q en el citocromo B del complejo III. Este fármaco ha sido utilizado con éxito en la clínica en combinación con el proguanilo<sup>33</sup>. Asimismo, inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa una enzima implicada en la síntesis de novo de pirimidinas mitocondrial<sup>34</sup> también tienen actividad antiplasmodio aunque el desarrollo de compuestos con propiedades farmacológicas adecuadas está por llegar.

Finalmente hacer referencia a un conjunto de compuestos análogos del nucleósido uridina que se han caracterizado como inhibidores del enzima desoxiuridina trifosfato sintetasa y que han demostrado actividad antimalárica *in vitro*. Así se han descrito varios análogos trifenilmetano activos frente al parásito y se han determinado las bases moleculares de la interacción del inhibidor con el enzima blanco<sup>35</sup>.

En definitiva, existen varias aproximaciones prometedoras al desarrollo de nuevos compuestos con potencial antimalárico. Algunos corresponden a nuevos derivados de antiguos compuestos de reconocida utilidad clínica y que presentan ventajas frente a sus predecesores, sobre todo en relación con el tratamiento de casos de resistencia. Por otra parte existen toda una serie de nuevas dianas potenciales que se han mencionado en la presente revisión y que desde el punto de vista de su papel en la viabilidad y su capacidad de inhibición constituyen nuevas alternativas al descubrimiento de antimaláricos. Algunos de los inhibidores en estudio corresponden a fármacos desarrollados para otros fines (antitumorales, antibacterianos) y que en una aproximación de lo que se conoce como química "piggy back" están aprovechando la información existente para desarrollar nuevos compuestos. Es de esperar que en un futuro próximo lleguen a ensayos clínicos algunas de estas iniciativas abriendo de esta manera nuevas perspectivas en el tratamiento de esta devastadora enfermedad.

## Bibliografía

1. Welles TE. Plasmodium chloroquine resistance and the search for a replacement antimalarial drug. *Science* 2002;298(5591):124-6.
2. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, et al. Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. *Mol Cell* 2000;6(4):861-71.
3. White NJ. Antimalarial drug resistance: the pace quickens. *J Antimicrob Chemother* 1992;30:571-85.
4. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, Carlton JM, et al. Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature* 2002;419(6906):498-511.
5. Fraunholz MJ, Roos DS. PlasmoDB. exploring genomics and post-genomics data of the malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Redox Rep* 2003;8(5):317-20.
6. Welles TE. Malaria. How chloroquine works. *Nature* 1992;355(6356):108-9.
7. Ginsburg H, Golenser J. Glutathione is involved in the antimalarial action of chloroquine and its modulation affects drug sensitivity of human and murine species of Plasmodium. *Redox Rep* 2003;8(5):276-9.
8. Sullivan DJ. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *Int J Parasitol* 2002;32(13):1645-53.
9. Bzik DJ, Li WB, Horii T, Inselburg J. Molecular cloning and sequence analysis of the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84(23):8360-4.
10. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, et al. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in Plasmodium falciparum: what next? *Trends Parasitol* 2001;17(12):582-8.
11. R.K. Haynes. Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment? *Curr Opin Infect Dis* 2001;14:719-726.
12. Borstnik K, Paik IH, Shapiro TA, Posner GH. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. *Int J Parasitol* 2002;432(13):1661-7.
13. Haynes RK. Artemisinin and derivatives: the future for malaria treatment? *Curr Opin Infect Dis* 2001;14(6):719-26.
14. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature* 2003;424(6951):957-61.
15. Vennerstrom JL, Arbe-Barnes S, Brun R, Charman SA, Chiu FC, Chollet J, et al. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug development candidate. *Nature* 2004;430(7002):900-4.
16. Foth BJ, McFadden GI. The apicoplast: a plastid in Plasmodium falciparum and other Apicomplexan parasites. *Int Rev Cytol* 2003;224:57-110.
17. Rodriguez-Concepcion M. The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des* 2004;10(19): 2391-400.
18. Suroliia A, Ramya TN, Ramya V, Suroliia N. FASt inhibition of malaria. *Biochem J* 2004;383(Pt. 3):401-12.
19. Wilson RJ. Progress with parasite plastids. *J Mol Biol* 2002;319(2):257-74.
20. Rosenthal PJ. Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol* 2004;34(13-14):1489-99.
21. Li R, Chen X, Gong B, Selzer PM, Li Z, Davidson E, et al. Structure-based design of parasitic protease inhibitors. *Bioorg Med Chem* 1996;4(9):1421-7.
22. Rosenthal PJ, Sijwali PS, Singh A, Shenai BR. Cysteine proteases of malaria parasites: targets for chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2002;8(18):1659-72.
23. Waller RF, Ralph SA, Reed MB, Su V, Douglas JD, Minnikin DE, et al. A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(1): 297-301.
24. Rao SP, Suroliia A, Suroliia N. Triclosan: a shot in the arm for antimalarial chemotherapy. *Mol Cell Biochem* 2003;253(1-2):55-63.
25. Jomaa H, Wiesner J, Sanderbrand S, Altincicek B, Weidemeyer C, Hintz M, et al. Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 1999;285(5433):1573-6.
26. Borrmann S, Issifou S, Esser G, Adegnika AA, Ramharther M, Matsiegui PB, et al. Fosmidomycin-clindamycin for the treatment of Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis* 2004;190(9):1534-40.
27. Gelb MH, Van Voorhis WC, Buckner FS, Yokoyama K, Eastman R, Carpenter EP, et al. Protein farnesyl and N-myristoyl transferases: piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitypanosomatid and antimalarial therapeutics. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126(2):155-63.
28. Williams CL. The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal* 2003;15(12):1071-80.
29. Ohkanda J, Lockman JW, Yokoyama K, Gelb MH, Croft SL, Kendrick H, et al. Peptidomimetic inhibitors of protein farnesyltransferase show potent antimalarial activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11(6):761-4.
30. Ghosh S, Chan JM, Lea CR, Meints GA, Lewis JC, Tovian ZS, et al. Effects of bisphosphonates on the growth of Entamoeba histolytica and Plasmodium species in vitro and in vivo. *J Med Chem* 2004;47(1):175-87.
31. Biagini GA, Pasini EM, Hughes R, De Koning HP, Vial HJ, O'Neill PM, et al. Characterization of the choline carrier of Plasmodium falciparum: a route for the selective delivery of novel antimalarial drugs. *Blood* 2004;104(10):3372-7.
32. Vial HJ, Wein S, Farenc C, Kocken C, Nicolas O, Ancelin ML, et al. Prodrugs of bithiazolium salts are orally potent antimalarials. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(43):15458-63.
33. Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ, Hutchinson DB. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60(4):533-41.
34. Krungkrai J, Krungkrai SR, Phakanont K. Antimalarial activity of orotate analogs that inhibit dihydroorotase and dihydroorotate dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 1992;43(6):1295-301.
35. Whittingham JL, Leal I, Nguyen C, Kasinathan G, Bell E, Jones AF, et al. dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a new class of nucleoside inhibitors. *Structure* 2005;13(2):329-38.