

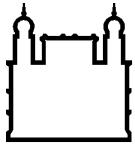
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS INIBIDORES DA
BIOSSÍNTESE DE ERGOSTEROL COMO POTENCIAIS À FÁRMACOS PARA
TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS**

LUDMILA FERREIRA DE ALMEIDA FIUZA

Rio de Janeiro
Janeiro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LUDMILA FERREIRA DE ALMEIDA FIUZA

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL COMO POTENCIAIS À FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro

RIO DE JANEIRO

Janeiro de 2018

Ferreira de Almeida Fiuza, Ludmila .

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS INIBIDORES DA SÍNTESE DE ERGOSTEROL COMO POTENCIAIS À FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS / Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza. - Rio de Janeiro, 2018.

92 f.; il.

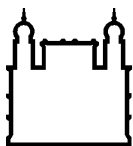
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Maria de Nazaré Correia Soeiro.

Bibliografia: f. 85-92

1. doença de Chagas. 2. Trypanosoma cruzi. 3. inibidores da CYP51 . 4. quimioterapia experimental.. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: LUDMILA FERREIRA DE ALMEIRA FIUZA

**IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS INIBIDORES DA SÍNTESE DE
ERGOSTEROL COMO POTENCIAIS À FÁRMACOS PARA TERAPIA DA
DOENÇA DE CHAGAS**

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro

Aprovada em: 10 / 01 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira - Presidente (IOC/ Fiocruz)

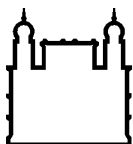
Prof. Dr^a. Tecia Maria Ulisses de Carvalho (IBCCF/ UFRJ)

Prof. Dr. Israel Felsenszwalb (IBRAG/ UERJ)

Prof. Dr. Elmo Eduardo Almeida Amaral (IOC/ Fiocruz)

Prof. Dr^a. Francisca Hildemagna Guedes da Silva (IBqM/ UFRJ)

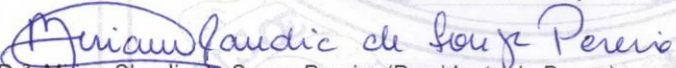
Rio de Janeiro, 10 de Janeiro de 2018.



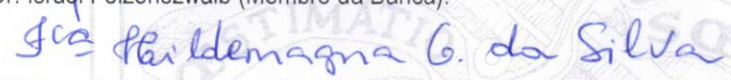
Ministério da Saúde

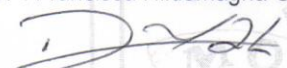
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza**, sob orientação da Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro. Ao décimo dia do mês de janeiro de dois mil e dezoito, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL COMO POTENCIAIS A FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS”**. No programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Israel Felzenszwalb - UERJ/RJ, Dr^a. Francisca Hildemagna Guedes da Silva - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral – IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Tecia Maria Ulisses de Carvalho – UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 10 de janeiro de 2018.


Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira (Presidente da Banca):


Dr. Israel Felzenszwalb (Membro da Banca):


Dr^a. Francisca Hildemagna Guedes da Silva (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico este trabalho a todos que
acreditaram e me auxiliaram durante
minha jornada até este ponto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos orixás, por me manter erguida sem sucumbir aos momentos de dificuldades durante minha breve jornada.

A minha amada mãe, que é minha heroína e me inspira com toda sua garra. Essa mulher batalhadora foi capaz de me criar com muito carinho, compreensão e além disso sempre me apoiou e incentivou seguir o caminho necessário para alcançar meus objetivos.

A toda minha família, meus primos Paula Cristine e Victor, a minha afilhada ou como ela prefere ser chamada “princesa da dinda”. Muito obrigada por todas as emoções partilhadas nesses dois anos.

A todos que perdi precocemente, minha avó Zuleica, meu pai Carlos, meu tio Paulo César e minha dinda Dilsa, aonde estiverem espero que estejam me conduzindo e protegendo.

A minha imensa família espiritual, minha Zeladora, meus irmãos, meus filhos, tios e primos que sempre me apoiaram, e em suas rezas têm espaço para zelar pelo meu equilíbrio e bem-estar.

Aos meus amigos de turma, Alex Moura, Aline Loureiro, Diogo Bellinato, Keli Antunes, Luiz Antonio de Oliveira, Mayra Reimann, Paula Rangel e Ingrid Sousa, mestrandos como eu que sabem bem os desafios da pós-graduação.

Ao maravilhoso grupo do Laboratório de Biologia Celular. Ao Dr Gabriel Oliveira, por todos os ensinamentos e auxílio na experimentação animal. Obrigada! As Dra. Denise da Gama e Cristiane França, pela paciência e ajuda durante a realização dos experimentos. Agradeço também as pessoas incríveis que fazem parte do meu dia a dia no LBC, Aline Nefertiti, Marianne Rocha, Julianna Siciliano, Camila Cardoso, Raiza Brandão, Ivana Melo, Rayane Nogueira e aos demais colegas, por todas os assuntos divertidos e gargalhadas compartilhadas.

Gostaria de agradecer também a técnica Patrícia Bernardino minha quase irmã, por todos os experimentos e conhecimentos. Ao técnico Marcos Meuser, por todo conhecimento, e explicações cautelosas e minuciosas! Obrigada vocês são maravilhosos!

Em especial minha orientadora, Dra. Maria Nazaré Correia Soeiro, primeiro pela amizade e sensibilidade nos momentos difíceis, que precisei de ajuda e apoio,

e em segundo por ser uma ótima orientadora, sempre paciente e disposta a ensinar, uma profissional ímpar que transmite aos seus alunos o amor pelo que faz. Muito grata por tudo!

Também gostaria de agradecer ao nosso colaborador Dr. Reddy e seu time por disponibilizar os compostos estudados nesta dissertação, bem como pelos dados *in silico*.

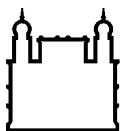
Gostaria de agradecer a Dra Mirian Pereira pela revisão deste trabalho e por aceitar o convite para compor a banca examinadora. O Dr. Israel Felzenszwalb, a Dra. Tecia Ulisses, o Dr. Elmo Amaral e a Dra. Francisca Hildemagna Guedes da Silva, agradeço por aceitarem o convite para compor a banca desta dissertação.

Ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, pela excelência no ensino.

.....
"A CIÊNCIA SE COMPÕE DE ERROS QUE, POR SUA
VEZ, SÃO OS PASSOS ATÉ A VERDADE."

JULIO VERNE

.....



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS COMPOSTOS INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE ERGOSTEROL COMO POTENCIAIS À FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS

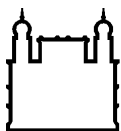
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza

A doença de Chagas (DC), patologia causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica em 21 países da América Latina e atualmente está listada como uma das vinte doenças tropicais negligenciadas, portanto, ainda representa um grave problema de saúde global. O atual tratamento para DC está limitado ao uso de dois nitroderivados com eficácia limitada e vários efeitos colaterais. O desenho racional de inibidores de rotas sintéticas de ergosterol (por exemplo, inibidores de CYP51) é uma estratégia promissora para terapia de infecções causadas por fungos e tripanosomatídeos, exibindo excelente atividade anti-*T. cruzi* em ensaios pré-clínicos. No presente trabalho, avaliamos através de diferentes abordagens a potência e seletividade de um novo inibidor CYP51 (composto **1**) e seus 17 análogos contra a infecção experimental por *T. cruzi*. Em relação ao efeito antiparasitário, o composto **1** foi ativo *in vitro* sobre a forma intracelular (cepa de Tulahuen) e sanguínea (cepa Y), com EC₅₀ 3,86 e 4,00 µM, respectivamente. *In vivo* a administração de composto **1** resultou em redução máxima de 43% no pico da parasitemia, porém, sem proteger contra a mortalidade. A fim de aprimorar a potência e propriedades farmacológicas, 17 novos análogos foram sintetizados e testados *in vitro*. Nossos achados demonstraram que cinco compostos foram potentes contra formas intracelulares (cepa Tulahuen), destacando **1e** e **1f**, com EC₅₀ 2,20 e 2,70 µM, respectivamente, e índices de seletividade (SI) = 50 e 36, respectivamente. Contra as formas sanguíneas, o composto **1f** atingiu um valor de EC₅₀ de 20,62 µM, com ação similar ao benznidazol, porém com inferior seletividade. Além disso, os resultados sugerem que a variação na potência dos compostos análogos estudados não está relacionada as propriedades eletrônicas dos substituintes, no entanto, a posição dos substituintes está relacionada a atividade tripanocida. Embora tenha melhorado a solubilidade do composto **1**, o análogo **1f** não aumentou a potência *in vitro* nem promoveu melhor eficácia *in vivo* (dados não mostrados contra o modelo murino de infecção aguda pelo *T. cruzi*, o que justifica a síntese e otimização de novas moléculas com o objetivo de contribuir para terapias alternativas para DC.

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, inibidores da CYP51 e quimioterapia experimental.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ
IDENTIFICATION OF NEW ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS INHIBITORS AS
POTENTIAL DRUGS FOR THERAPY OF CHAGAS DISEASE**

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza

The Chagas disease (CD), pathology caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* is endemic in 21 countries in Latin America and is currently listed as one of twenty neglected tropical diseases, therefore, it still represents a serious global health problem. The current treatment for CD is limited to the use of two nitroderivatives with limited efficacy and several side effects. The rational design of ergosterol synthetic route inhibitors (eg, CYP51 inhibitors) is a promising strategy for therapy of fungal and trypanosomatid infections, exhibiting excellent anti-*T. cruzi* activity in preclinical trials. In the present work, we evaluated through different approaches the potency and selectivity of a new CYP51 inhibitor (**compound 1**) and its 17 analogues against the experimental infection by *T. cruzi*. Regarding the antiparasitic effect, compound **1** was active *in vitro* on the intracellular (Tulahuen strain) and blood (strain Y) forms, with EC_{50} 3.86 and 4.00 μ M, respectively. *In vivo* administration of compound **1** resulted in a maximum 43% reduction in peak parasitemia, but without protection against mortality. In order to improve potency and pharmacological properties, 17 new analogs were synthesized and tested *in vitro*. Our findings demonstrated that five compounds were potent against intracellular forms (Tulahuen strain), highlighting **1e** and **1f**, with EC_{50} 2.20 and 2.70 μ M, respectively, and selectivity indexes (SI) = 50 and 36, respectively. Against blood forms, compound **1f** reached an EC_{50} value of 20.62 μ M, with similar action to benznidazole, but with lower selectivity. In addition, the results suggest that the variation in potency of the analogous compounds studied is not related to the electronic properties of the substituents, however, the position of the substituents is related to trypanocidal activity. Although the solubility of compound **1** has improved, analogue **1f** does not increased potency *in vitro* and did not promote better *in vivo* efficacy against the murine model of acute infection by *T. cruzi* (data not shown), which justifies the synthesis and optimization of new molecules with the objective of contributing to alternative therapies for CD.

Key-words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, CYP51 inhibitors, and experimental chemotherapy.

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Doença de Chagas um olhar histórico.....	16
1.2 Distribuição geográfica e epidemiologia	17
1.3 Agente etiológico.....	18
1.4 Fases da doença e sintomatologia.....	21
1.5 Tratamento.....	22
1.5.1 Avaliação do Benznidazol para interromper a tripanossomíase	25
1.5.2 Ensaios clínicos com inibidores da Biossíntese do ergosterol.....	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 ANEXO	31
3.1 Artigo submetido.....	31
4 DISCUSSÃO	76
5 CONCLUSÕES	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Figura 1. Carlos Chagas. Fonte: Hablamos de Chagas: aportes para re-pensar la problemática com una mirada integral – livro digital (2015).	16
Figura 2. Mapa da distribuição geográfica da doença de Chagas. Adaptado DNDi https://www.dndi.org/dis	18
Figura 3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2017.	20
Figura 4. Progressão Progressão da patologia. Adaptado Chatelain, 2017.	22
Figura 5. Estrutura química dos fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas. Adaptado de Soeiro & de Castro, 2009.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de produto alvo para doença de Chagas. Adaptado DNDi, 2017 acessado 15/11/201724

Tabela 2. Critérios hit e lead de candidatos para doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset, 2014).78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BT	Bloodstream
BENEFIT	Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis
Bz	Benznidazol
co A	Coenzima A
CYP51	C-14 α -demetilase
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
dpi	Dia pós infecção
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTU	Discrete Typing Unit
EC₅₀	Concentração mínima de 50% de eficácia
EC₉₀	Concentração mínima de 90% de eficácia
H	Hora
HMG-coA	Hidroximetilglutaril
i.p	Intraperitoneal
IBE	Inibidor da Biossíntese de Ergosterol
IS	Índice de seletividade
kDNA	DNA do cinetoplasto
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LC₅₀	Limiar de toxicidade
Nf	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.o.	Per oral
PCR	Reação em cadeia da polymerase
pH	Potencial de Hidrogênio
Pos	Posaconazole
Rav	Ravuconazole
tto	Tratamento
VP	Vacúolo parasitóforo
WHO	World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS UM OLHAR HISTÓRICO

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana foi descrita há mais de cem anos pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Chagas (**Figura 1**).

Em 1907, o pesquisador foi enviado ao norte de Minas Gerais no município de Lassance, com o objetivo de controlar os surtos recorrentes de Malária, que prejudicavam a construção da extensão da Ferrovia Central do Brasil. Nos meados



Figura 1. Carlos Chagas. Fonte: *Hablamos de Chagas: aportes para repensar la problemática con una mirada integral* – livro digital (2015).

de 1908 durante a coordenação da campanha profilática, Chagas foi notificado pelo engenheiro Catarino Motta sobre a presença de um inseto hematófago. Esse inseto hematófago proliferava nas cabanas da região e era vulgarmente chamado de “chupão” ou de “barbeiro” devido ao hábito de sugar o sangue, durante a noite, pela picada na face das pessoas adormecidas. Ao examinar os insetos, ele encontrou em seus intestinos formas flageladas do protozoário, que foram relacionadas à um estágio parasitário do *Trypanosoma minasense* (*T. minasense*), previamente identificados em micos da região (Chagas, 1909; Kropf & Sá, 2009; Coura et al.,

2014).

Frente as restrições locais decorrentes da ausência de infraestrutura adequada para realização de pesquisas mais específicas, Chagas retornou ao Rio de Janeiro a fim de conduzir experimentos *in vivo*. A partir destes experimentos atestou o papel do inseto vetor na transmissão do protozoário, além de comprovar que este era um novo parasito e não se tratava de *T. minasense*, nomeando-o de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) em homenagem a seu mestre Oswaldo Cruz. Com base nos resultados obtidos, Chagas iniciou estudos sistemáticos sobre *T. cruzi*, direcionando suas análises a outros possíveis hospedeiros vertebrados (Kropf & Sá, 2009; Coura et al., 2014). Acreditando que humanos poderiam também ser hospedeiros deste parasito, em 1909 retornou à Lassance para analisar mais profundamente os habitantes da região. Durante esse período sugeriu que as habitações humanas eram o habitat

preferido do inseto vetor, e também identificou a presença do protozoário em um animal doméstico, caracterizando esse animal como hospedeiro doméstico. Ademais, comprovou sua teoria que humanos poderiam ser hospedeiros relatando o caso da menina Berenice de 2 anos que apresentava sintomas como febre, hepatoesplenomegalia e um edema palpebral unilateral, que provavelmente fora porta de entrada do parasito (mais tarde chamado de sinal de Romaña). Além da sintomatologia, exames microscópicos de amostras de sangue da menina demonstraram a presença de parasitos circulantes semelhantes aos encontrados no inseto e nos hospedeiros vertebrados previamente estudados (Chagas, 1909; Coura et al., 2014).

Carlos Chagas descreveu assim aspectos da patologia, marcando a todos da comunidade científica com a divulgação de uma nota prévia sobre esta nova morbidade em 22 de abril de 1909. Neste mesmo ano, contemplou a todos com seu artigo completo publicado no primeiro volume da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Chagas, 1909; Kropf & Sá, 2009; Malafaias & Rodrigues, 2010; Coura et al., 2014).

1.2 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA

A doença de Chagas está listada dentre as 20 doenças tropicais negligenciadas (DTN). As DTNs são patologias associadas à pobreza e escassez de condições sanitárias adequadas que afetam principalmente populações de baixa renda com efeitos devastadores na saúde e desenvolvimento. De acordo com o DNDi (Drugs Neglected Diseases initiative), a DC é endêmica em 21 países da América Latina, estima-se que 70 milhões de pessoas estão sob risco de infecção por todo mundo e o número de casos em regiões não endêmicas veem crescendo como por exemplo, nos Estados Unidos da América, Austrália e Europa (**Figura 2**).



Figura 2. Mapa da distribuição geográfica da doença de Chagas, demonstrando em marrom escuro países endêmicos, em marrom claro países não endêmicos, porém com a presença da patologia e em branco, países com ausência da DC. Adaptado DNDi <https://www.dndi.org/dis>.

Atualmente existem cerca de 6 – 8 milhões de portadores, e somente no Brasil encontram-se de 1.9 – 4.6 milhões. No continente Europeu estima-se que existem aproximadamente 72.000 pessoas infectadas por *T. cruzi* em virtude da migração internacional de portadores oriundos de países endêmicos. Ainda nesse cenário, além de afetar o continente europeu, a intensificação da migração de cidadãos latino-americanos para países da América do Norte (Estados Unidos, e também Canadá), Ásia (Japão) e Oceania (Austrália), vem aumentando o número de portadores da DC em países não endêmicos. Ocorrem anualmente aproximadamente 14.000 mortes em decorrência dessa patologia. A partir da publicação de Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade para o Período 2000/2060, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estabeleceu-se a projeção relativa às estimativas do número de pessoas infectadas por *T. cruzi*. De acordo com essa projeção, no ano de 2055 haverá cerca de 700 mil a 1.7 milhões portadores da DC no Brasil. (Hotez & Pecoul, 2010; Dias et al., 2016; Martins-Melo et al., 2016; DNDi, 2017).

1.3 AGENTE ETIOLÓGICO

Trypanosoma cruzi, agente etiológico da DC, pertence à família Trypanosomatidae, e baseado nas variações genéticas do parasito, as cepas foram agrupadas em “Unidades discretas de Tipagem (Discrete Typing Units - DTUs) que são um conjunto de cepas geneticamente semelhantes. Atualmente, as cepas de *T.cruzi* são agrupadas em 6 DTUs com propriedades biológicas distintas como,

infectividade, tropismo tecidual e susceptibilidade a fármacos, sendo Tcbat uma linhagem independente de *T. cruzi* isolada de morcegos brasileiros que apresenta padrões únicos de PCR (Reação em cadeia da polimerase) e não se agrupa em nenhuma das seis DTUs (Zingales et al., 2009; Rassi et al., 2012; Zingales et al., 2012; Lima et al., 2015). A família Trypanosomatidae caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma estrutura de DNA correspondente ao genoma mitocondrial (kDNA) localizado próximo ao corpo basal (Rassi et al., 2012).

O protozoário apresenta um ciclo de vida complexo que envolve os hospedeiros vertebrado e invertebrado. Durante seu ciclo biológico, apresenta 3 formas parasitárias: as formas proliferativas epimastigota e amastigota, cuja multiplicação ocorre no intestino do inseto triatomíneo e no citoplasma das células dos hospedeiros mamíferos, respectivamente, e a forma não multiplicativa infectante tripomastigota que circula pelo sangue periférico do hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguíneo) e na parte posterior do intestino do hospedeiro invertebrado – tripomastigota metacíclico (Tyler & Engman, 2001; Teixeira et al., 2012).

Devido hábito hematófago, o inseto ingere formas tripomastigotas circulantes no sangue periférico do hospedeiro vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo (**Figura 3**). Após a ingestão e já no trato digestivo do triatomíneo, o protozoário diferencia-se na forma proliferativa encontrada no hospedeiro invertebrado (epimastigota). No intestino médio, epimastigotas multiplicam-se por divisão binária, e na porção posterior do intestino as formas proliferativas diferenciam-se através da metaciclogênese, na forma infectante tripomastigota metacíclica (**Figura 3**). As formas infectantes, excretadas nas fezes e urina durante a alimentação do inseto vetor, são capazes de aderir e penetrar células presentes no local da porta de entrada do parasito (lesão na pele ou resultante da picada) ou através da mucosa do hospedeiro mamífero. Uma vez no hospedeiro mamífero, essas formas invadem diversos tipos de células nucleadas, sendo localizadas provisoriamente em vacúolos parasitóforos (VP), que se fundem a endossomos iniciais e tardios, assim como a lisossomos. A acidificação dos VPs, em associação a secreção de enzimas pelo parasito (transialidases e neuraminidases) capazes de desializar a face interna da membrana do VP assim como, participação de proteínas semelhantes a porinas (Tc-Tox) também secretadas pelo *T.cruzi*, resultam na

fragmentação da membrana do vacúolo e da localização do protozoário no citoplasma da célula (De Souza et al., 2010).

No citoplasma, os tripomastigotas metacíclicos finalizam sua conversão em amastigotas que se multiplicam por divisão binária aproximadamente a cada de 12 horas, por 4 a 5 dias. Após o período de replicação, as formas multiplicativas se transformam novamente em tripomastigotas que devido a ruptura das células hospedeiras são liberados na circulação, podendo invadir tecidos adjacentes, migrarem para locais distantes alcançando principalmente células musculares (cardíacas, lisas e esqueléticas) e iniciar novos ciclos replicativos. Além disso, as formas na corrente sanguínea estão disponíveis para infectar vetores que irão se alimentar de sangue do hospedeiro (Tyler & Engman, 2001; Teixeira et al., 2012; Rassi et al., 2012; Bern, 2015).

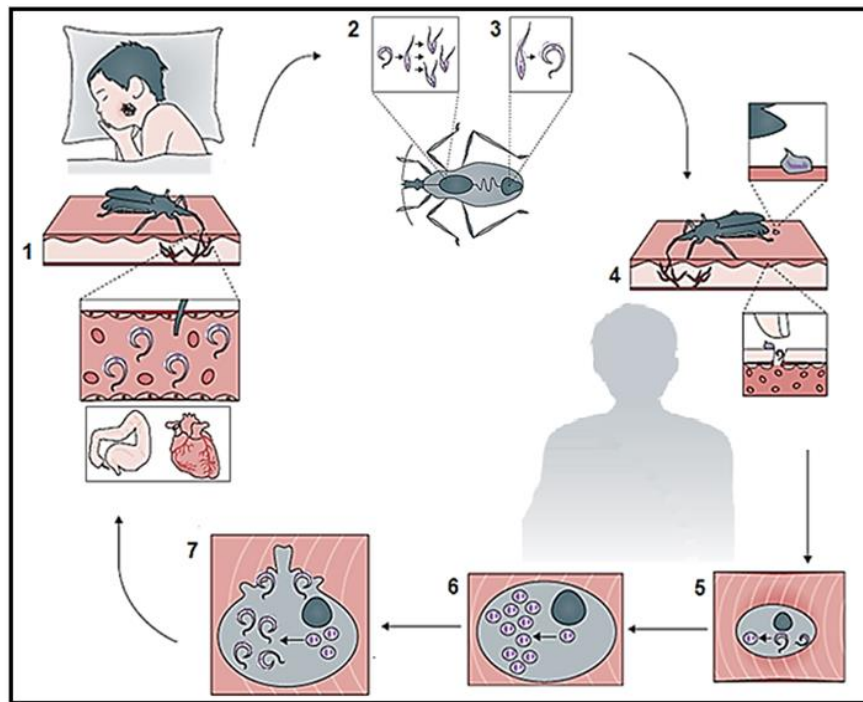


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi* – 1. O triatomíneo ingere tripomastigotas circulantes no sangue periférico do hospedeiro vertebrado; 2. Tripomastigotas se transformam em epimastigota no intestino médio do vetor; 3. Epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior do inseto; 4. Durante o repasto sanguíneo essas formas infecciosas são excretadas nas fezes e urina e penetram pela lesão na pele ou através da mucosa intacta do hospedeiro mamífero; 5. Estes parasitos invadem diversas células nucleadas e no citoplasma, os tripomastigotas diferenciam-se na forma intracelular proliferativa (amastigota); 6. No citoplasma da célula hospedeira, amastigotas proliferam-se intensamente; 7. As amastigotas se transformam em tripomastigotas, e são liberadas na corrente sanguínea por rupturas nas células hospedeiras, e podem infectar células adjacentes, migrar para tecidos e órgãos ou dar continuidade ao ciclo através de sua ingestão pelo vetor durante novo repasto sanguíneo. Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2017. Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2017.

A transmissão do patógeno pode ocorrer pela via vetorial clássica através da picada do inseto triatomíneo, via congênita (transmitida de mãe para filho), contaminação por transfusão de sangue, contaminação por transplante de órgãos, além da via oral que nas últimas décadas no Brasil tem ganhado relevância. Tendo em vista as políticas de controle vetorial em países endêmicos, surtos de infecção oral compreendem mais de 70% dos novos casos agudos na Amazônia (Coura, 2015; Chatelain, 2017).

1.4 FASES DA DOENÇA E SINTOMATOLOGIA

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. A fase aguda tem início após infecção, cursa aproximadamente 1- 2 semanas de incubação, podendo durar em média até 2 meses (**Figura 4**). É caracterizada por parasitemia patente facilmente detectável por microscopia óptica. Durante a fase aguda, grande parte dos pacientes é assintomático, o que explica o fato da maioria das infecções agudas não ser diagnosticada.

Nos casos agudos sintomáticos observa-se, de modo geral, sinais inespecíficos, que podem incluir: febre, mal-estar, aumento no baço, fígado e linfonodos, edema subcutâneo (localizado ou generalizado) e alterações neurológicas. De 10 a 20 % dos casos agudos podem exibir sinais característicos de inflamação no local da penetração do parasito nódulo, como por ex.: na pele (chagoma de inoculação) ou indolor edema na pálpebra (sinal de Romana). Esta fase pode ser fatal para aproximadamente 2 – 8% dos casos (Bern, 2011; Rassi et al., 2012; Bern, 2015; Chatelain, 2017). A resposta imune do hospedeiro controla a replicação do parasito e os sintomas são resolvidos espontaneamente. Após um período variando entre 4 - 8 semanas, há uma drástica redução na carga parasitária, resultando em níveis indetectáveis na circulação. Nessa fase, a infecção é revelada por sorologia ou métodos parasitológicos indiretos. A parasitemia subpatente caracteriza a fase crônica (**Figura 4**).

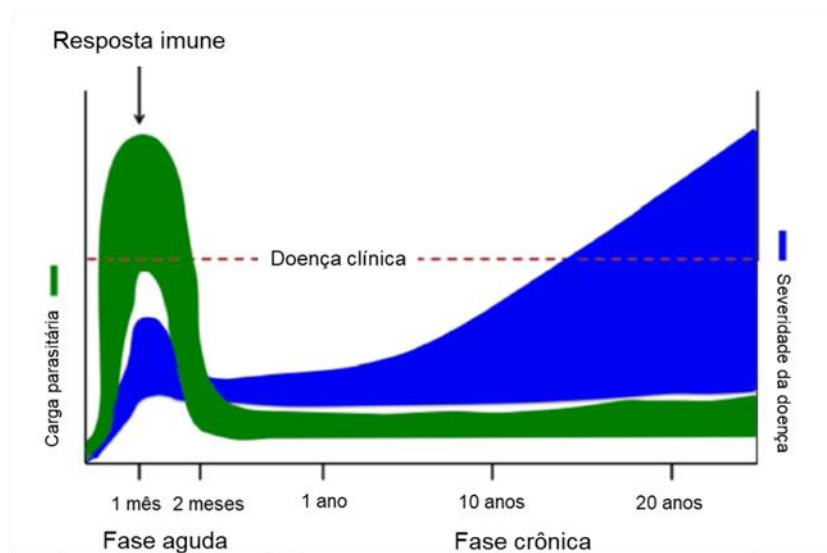


Figura 4. Progressão da patologia. Em verde a fase aguda da doença caracterizada pela parasitemia patente que na maioria dos casos são assintomáticos. Em azul a fase crônica que em função do sistema imune do hospedeiro apresenta carga parasitária reduzida a níveis indetectáveis, 20- 30% dos casos apresentam progressão da doença relacionada principalmente a cardiomiopatia e efeitos gastrointestinais. Adaptado Chatelain, 2017.

A maioria dos casos crônicos permanece assintomático, e estima-se que 30 – 40 % dos portadores podem desenvolver sintomas após 10 – 20 anos pós infecção. A persistência do parasito (mesmo em baixas concentrações) nos tecidos junto à uma resposta imunológica do hospedeiro desbalanceada, podem acarretar a progressão de uma disfunção cardíaca (cardiomiopatia chagásica crônica) associada ou não a efeitos gastrointestinais - principalmente megaesófago e megacólon (WHO, 2017; Rassi et al., 2012; Rassi et al., 2017; Chatelain, 2017).

1.5 TRATAMENTO

Após mais de um século de sua descoberta, a DC ainda é um grave problema de saúde pública, e assim como outras DTNs, o apoio financeiro para esforços de controle e eliminação, bem como pesquisa e desenvolvimento ainda é insuficiente. Nas últimas décadas, apenas 1% de todos os novos fármacos aprovados foram direcionados as doenças negligenciadas, apesar de suas consideráveis perdas e impactos negativos na saúde pública global (Hotez & Pecoul, 2010).

Apesar do atual arsenal terapêutico disponível resultar em elevados índices de cura na fase aguda da doença, prevenindo futuros danos aos órgãos no curso da

progressão da infecção crônica, estima-se que hoje menos de 1% dos portadores tem acesso ao tratamento (DNDi, 2017).

Atualmente o tratamento está restrito ao uso de dois nitroderivados, o nitrofurano nifurtimox - Nf (3-metil-4-[59-nitrofurfuriladenina] tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (**Figura 5 A**) e o nitroimidazol benznidazol - Bz (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) (**Figura 5 B**), ambos introduzidos na clínica médica entre 1960 e 1970, sendo que o Nf teve sua produção descontinuada no Brasil na década de 80 (Coura & de Castro, 2002; Bern, 2015; DNDi, 2017). Estes nitroderivados atuam reduzindo grupamento nitro e produzindo metabólitos altamente tóxicos para o parasito (Urbina, 1999). O Nf apresenta eficácia durante a fase aguda da DC em contrapartida, exibe diversos efeitos colaterais mais intensos que incluem anorexia, perda de peso, parestesia, sonolência ou excitabilidade psíquica e sintomas gastrointestinais como náuseas, vômitos e cólicas intestinais ocasionais (Patterson & Wyllie, 2014; Bern, 2015; Sales Junior et al., 2017). A molécula nitroimidazólica Bz possui atividade semelhante ao Nf em ambas as fases, porém possui menos efeitos colaterais e, portanto, é a primeira escolha para o tratamento (Bern, 2015). O efeito adverso mais comum deste medicamento é uma dermatite alérgica generalizada que consiste em erupções eritematosas pruriginosas. Outros efeitos que podem ocorrer, porém com menos frequência são neuropatias periféricas e polineuropatia (Rassi et al., 2012). Os efeitos colaterais que ambos os fármacos apresentam podem levar a interrupção do tratamento. Durante a fase aguda, o tratamento com os nitroderivados é capaz de suprimir a parasitemia além de reduzir gravidade e a duração dos sintomas, o percentual de cura nesta fase varia entre, 60 a 80%. Na fase crônica, ambos os medicamentos apresentam falha terapêutica com percentual de cura em torno de 8 - 20%. Também apresentam falha terapêutica na fase aguda e crônica sobre infecção por algumas cepas do parasito naturalmente resistentes a ambos nitroderivados (Sales Junior et al., 2017).

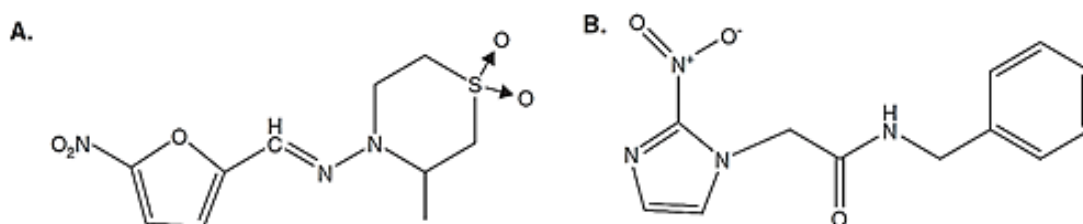


Figura 5. Estrutura química dos fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas, nifurtimox (A) e benznidazol (B). Adaptado de Soeiro & de Castro, 2009.

Frente a essas limitações, a busca por novas entidades farmacológicas para esta patologia silenciosa faz-se urgentemente necessária. Instituições que buscam novos fármacos para patologias negligenciadas como Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi) descrevem características ideais e desejáveis para seleção de novos candidatos à fármacos. Os principais aspectos estabelecidos para seleção de novos medicamentos para tratamento da DC são: (i) ação do fármaco sobre as duas fases da doença, (ii) atividade sobre diferentes cepas do parasito e sobre as formas parasitárias relevantes para infecção humana, (iii) ausência de toxicidade sobre células de mamíferos, bem como de genotoxicidade, mutagenicidade e cardiotoxicidade, (iv) administração por via oral e (v) baixo custo na produção para melhor acessibilidade nas regiões de extrema pobreza (DNDi, 2017). Os critérios definidos como aceitáveis e ideais de acordo com o DNDi encontram-se listados na **tabela 1**.

Tabela 1. Perfil de produto alvo para doença de Chagas. Adaptado DNDi, 2017 acessado 15/11/2017

	Aceitável	Ideal
População alvo	Crônica	Crônica e aguda (reativações)
Distribuição geográfica	Todas as regiões	Todas as regiões
Eficácia	Dose padrão não inferior a benznidazol em todas as regiões	Superioridade à dose padrão de benznidazol para diferentes fases da doença (aguda e crônica)
Segurança	> Bz na frequência de descontinuações definitivas do tratamento para indicação médica (clínica e laboratorial)	> Bz na frequência de descontinuações definitivas do tratamento para indicação médica (clínica e laboratorial)
Contraindicações	Gravidez	Sem contraindicações
Precauções	Nenhuma genotoxicidade e sem potencial pró-arrítmico	Não há genotoxicidade, teratogenicidade e sem potencial pró-arrítmico
Interações	Nenhuma interação clinicamente significativa com fármacos antiarrítmicos e anticoagulantes	Nenhuma interação clinicamente significative
Apresentação	Oral / Parenteral (POC curto) Adaptado à idade	Oral Adaptado à idade
Estabilidade	3 anos, zona climática IV	5 anos, zona climática IV
Regime dosagem	Oral - qualquer duração Parenteral - <7 dias	<30 dias
Custo	Menor possível	Tratamentos atuais

Depois de mais de 100 anos após a descoberta da patologia e de mais 50 anos da introdução dos nitroderivados utilizados na terapia atual, as triagens clínicas finalizadas recentemente CHAGASAZOL (NCT01162967), STOPCHAGAS (NCT01377480), E1224 (NCT01 48228), BENEFIT – benznidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (NCT0123916), contribuíram positivamente fornecendo dados que permitem reflexões acerca de novas abordagens terapêuticas para a doença de Chagas.

1.5.1 AVALIAÇÃO DO BENZNIDAZOL PARA INTERROMPER A TRIPANOSSOMÍASE

A Avaliação do Benznidazol para interromper a tripanossomíase (BENEFIT - Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) teve por objetivo avaliar a eficácia e a segurança do benznidazol comparando com o efeito placebo, na redução da progressão da cardiomiopatia chagásica crônica. O estudo randomizado ocorreu durante 7 anos (2004 - 2011) e contou com 2854 portadores de diversos países onde a DC é endêmica, com idades variando entre 18-75 anos que foram divididos aleatoriamente em dois grupos: 1431 e 1423 portadores tratados com Bz e placebo, respectivamente. Inicialmente o grupo tratado com Bz receberia uma dose de 5 mg/ kg por 60 dias, que foi alterada para uma concentração fixa de 300 mg por dia administrada durante um período de tratamento variável entre 40-80 dias. Os pacientes foram acompanhados desde dias após o fim do tratamento até avaliações anuais. O estudo atestou a capacidade do Bz na supressão da carga parasitária, porém demonstrou sua ineficácia em prevenir a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica (Morillo et al., 2015).

1.5.2 ENSAIOS CLÍNICOS COM INIBIDORES DA BIOSSÍNTESE DO ERGOSTEROL

A via biossintética do ergosterol vem sendo estudada há mais de 20 anos por diversos grupos de pesquisa, em virtude da sua essencial importância para sobrevivência do parasito, sendo, portanto, um promissor alvo para quimioterapia contra a DC. Alguns antifúngicos foram descritos *in vitro* e *in vivo* por apresentar excelente atividade tripanocida, e a partir dos ensaios pré-clínicos, os mais ativos foram avaliados em triagens clínicas, incluindo CHAGASAZOL, STOPCHAGAS

(ambos utilizam o posaconazol – Pos) e E1224 (pró-droga do ravuconazol - Rav). Esses medicamentos são inibidores da biossíntese de ergosterol (IBE) que é essencial para membrana de fungos e de tripanosomatídeos. Semelhante ao colesterol em mamíferos, esse esterol desempenha um papel crucial na estabilidade, fluidez e permeabilidade de membranas biológicas. Esse esterol é derivado de acetil-coenzima A (acetil-CoA). A síntese se inicia com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA produzindo acetoacetil-CoA e, em seguida, ocorre a adição de uma terceira molécula de acetil-CoA que resulta na formação da Hidroximetilglutaril – coenzima A (HMG-coA). Através da ação de uma redutase, a HMG-CoA é reduzida por NADH em mevalonato. Após dupla fosforilação e descarboxilação do mevalonato, há produção do fosfato de isopentila, e deste produto são obtidos geranildifosfato, o farnesil difosfato e o esqualeno. Em seguida, ocorre a síntese do epóxido esqualeno que é catalisado produzindo lanosterol, que sofre demetilação e é convertido em zimosterol pela ação da enzima C14 α -esterol demetilase (CYP51). Essa fase é restrita aos tripanosomatídeos, pela ação da enzima catalizadora esterol 24-C-metiltransferase, o zimosterol é convertido em ergosterol (Soeiro & de Castro, 2009).

A inibição da síntese de ergosterol pode ocorrer em diferentes pontos da via, e as moléculas azólicas atuam frente a inibição da ação da enzima CYP51, membro da família das citocromo P450. A inibição desta enzima resulta no acúmulo de precursores tóxicos de ergosterol, e, portanto, a inibição desta via pode afetar a citocinese, o crescimento e resultar também em danos na membrana (Lepesheva et al., 2007; Soeiro & de Castro, 2009; Lepesheva et al., 2015).

1.5.2.1 CHAGASAZOL & STOPCHAGAS

Ambos estudos avaliaram a capacidade do posaconazol (Pos) medicamento já introduzido no tratamento de infecções fúngicas, sob regime de mono ou terapia combinada para tratamento da DC. Estas análises tiveram por base a excelente atividade *in vitro*, com EC₅₀ de 0,3 nM sobre as formas multiplicativas e *in vivo* atingindo alto percentual de cura (90 – 76 %) durante a fase aguda em modelo de infecção por cepas susceptíveis e parcialmente susceptíveis, respectivamente e, na fase crônica (> 60 % sobre infecção com cepas susceptíveis e parcialmente susceptíveis) (Urbina et al., 1998).

A triagem clínica randômica CHAGASAZOL avaliou a eficácia e segurança da monoterapia por Pos em comparação ao Bz, para tratamento de portadores da doença de Chagas crônica. Os 78 pacientes com idade variando entre ≥ 18 anos, com dois testes sorológicos e PCR positivos para *T. cruzi* foram divididos em três grupos: (i) tratados com Bz (dose de 150 mg duas vezes ao dia), (ii) tratados com baixa concentração de Pos (dose de 100 mg duas vezes ao dia – 200 mg/ dia) e (iii) tratados com alta concentração de Pos (dose de 400 mg duas vezes ao dia – 800 mg/ dia), todos por 60 dias. Os portadores foram acompanhados por diferentes períodos para avaliação de peso, funcionamento cardíaco e hepático e também, para obtenção de amostras de sangue para análises bioquímicas. Testes sorológicos foram realizados após 6 meses do fim do tratamento e no fim do período de acompanhamento (40^a semana). As análises moleculares foram realizadas durante diferentes semanas após o término do tratamento (tto) até o fim do período de acompanhamento. Os dados atestaram a capacidade deste composto azólico na redução da carga parasitária, em contraposição o medicamento não sustentou sua ação tripanocida, demonstrando ineficácia na manutenção da cura e reproduzindo alta porcentagem de falha terapêutica ($> 80\%$) (Molina et al., 2014; Molina et al., 2015).

Como alternativa para esta falha, foi desenhada uma triagem clínica (STOPCHAGAS) cujo objetivo foi avaliar a terapia combinada de Bz e Pos, esperando-se obter melhores resultados que os obtidos com a monoterapia. No ensaio clínico STOPCHAGAS portadores com mais de 18 e menos de 50 anos, com mais de 60 kg, e com sorologia positiva em 2 testes e PCR positiva para *T. cruzi*, foram divididos em 4 grupos: (i) monoterapia com alta concentração de Pos (400 mg), (ii) terapia combinada de Bz (200 mg) e placebo, (iii) Bz (200 mg) e Pos (400 mg) e (iv) placebo (10 mg), sendo todos os esquemas 2x ao dia por 60 dias. O acompanhamento ocorreu em diferentes momentos: inicialmente até o 60^o dia (nos dias 15, 30, 45 e 60) e nos dias 90, 120, 150, 180 e 360 após a divisão dos grupos para início do tratamento. Os portadores foram submetidos a eletrocardiograma e testes de função hepática no primeiro dia de tto e durante cada visita durante o período do tto (60 dias). Análises moleculares foram realizadas em diferentes dias desde o primeiro dia de tto até o fim do acompanhamento no dia 360 (30, 60, 90, 120, 150, 180, e 360). Como esperado, a terapia combinada de Bz e Pos demonstrou 100% de cura, similar aos resultados com Bz e placebo, enquanto a

monoterapia de Pos apresentou falha terapêutica > 80%. Os dados responderam à pergunta inicial que supunha que os resultados da terapia combinada seriam superiores à monoterapia, porém assim como na terapia com Pos, o tratamento com a combinação não manteve a atividade tripanocida após o período de um ano, atestando que esta combinação não é superior à monoterapia com Bz (Morillo et al., 2017).

1.5.2.2 E1224

Esta triagem clínica utilizou a pró-droga do ravuconazol – E1224, medicamento utilizado no tratamento de micoses sistêmicas e cuja atividade tripanocida foi caracterizada *in vitro* e *in vivo* (modelo de infecção aguda e crônica), sendo similar a atividade do Pos (Urbina et al., 2003). Extremamente potente *in vitro* e *in vivo*, este agente tem rápida conversão no seu metabólito e, foi direcionado para testes clínicos. Nesta triagem foi avaliada a segurança e eficácia da monoterapia com a pró-droga E1224 em comparação à monoterapia com Bz, utilizando 231 adultos portadores da fase crônica indeterminada da doença, que foram agrupados de acordo com os esquemas: E1224 - 200 mg/ semana, E1224 - 400 mg/ semana ambos por 8 semanas, E1224 - 400 mg/ semana durante 4 semanas e Bz - 5 mg/kg/d, 8 semanas. Os portadores foram avaliados na conclusão do tratamento e acompanhados em vários momentos até o 12º mês. O estudo comprovou que E1224 foi seguro e eficaz na supressão da parasitemia quando comparado ao benznidazole, atestou também que a dose mais alta resultou em uma interrupção do tratamento devido aos efeitos colaterais que foram superiores aos efeitos acarretados pelo Bz. Apesar da eficácia em suprimir a carga parasitária após 12 meses um percentual muito baixo dos portadores tratados com E1224 manteve supressão parasitária, enquanto 80% dos portadores tratados com Bz mantiveram a erradicação do parasito (Urbina, 2015; DNDi, 2014).

Visto à falha terapêutica destes medicamentos, alguns autores sugeriram possíveis aspectos que levaram a esses resultados negativos. Entre as várias possibilidades, autores relatam que os resultados decepcionantes podem estar relacionados à falta de tradução de modelos experimentais (*in vitro* e *in vivo*) em relação aos testes clínicos, visto que o modelo de infecção crônica conduzido nos ensaios *in vivo* poderia representar uma fase de infecção mais recente, o que superestimaria a ação dos fármacos, bem como a falta de condições farmacológicas

ideais para a terapia humana. De fato, a eficácia dos inibidores do CYP51 pode estar relacionada à dose, levando em consideração que as doses utilizadas nos ensaios são de 10 a 20 % inferiores a dose curativa em modelo murino. Autores demonstram que o tempo de exposição ao composto pode ser outro aspecto que corroborou para a falha dessas triagens, considerando a baixa meia vida plasmática do composto (E1224) e também a reserva de ergosterol endógeno no parasite. Existe a hipótese que sugere uma terapia com tempo de exposição mais prolongado para esgotar a reserva além de inibir a síntese de novo do esterol e dessa forma melhorar a eficácia dos fármacos (Molina et al., 2015; Morillo et al., 2017; Spósito et al., 2017). Lepesheva & Waterman (2011) ressaltam em seu trabalho que a falha desses compostos reposicionados da terapia antifúngica pode ser em decorrência da CYP51 fúngica compartilhar menos de 30% de semelhança na sequência de aminoácidos com a enzima homóloga de tripanosomatídeos.

Apesar da falha dos compostos inibidores de ergosterol nas triagens clínicas, esta classe de compostos deve ser mais estudada utilizando abordagens pré-clínicas mais preditivas para selecionar moléculas promissoras como novo agente antiparasitário. A dependência do parasito por esteróis endógenos, bem como a existência de especificidades na rota de síntese de esteróis no parasito, reforça o estudo de outros inibidores da CYP51 como possíveis candidatos para tratamento para DC. Moléculas com maior especificidade pela enzima parasitária em relação a humana tem sido descritas (Lepesheva, 2013; Lepesheva et al., 2015; Hoekstra et al., 2016). As moléculas não azólicas inibidoras de CYP51, como VNI e VFV, mostraram atividade muito promissora contra uma variedade de cepas do parasito em ensaios *in vitro* e *in vivo* sobre modelo murino experimental de infecção por *T. cruzi*. (Hargrove et al., 2012; Soeiro et al., 2013; Guedes-da-silva, 2015; Guedes-da-Silva et al., 2017).

Esses achados reiteram a necessidade de testar a atividade de novos inibidores da CYP51 que podem ser projetados com propriedades farmacológicas otimizadas, além de preconizar a redução dos custos de produção permitindo que o tratamento seja realizado por longos períodos de tempo (Soeiro et al., 2013; Hoekstra et al., 2016; Guedes-da-Silva et al., 2017). Dessa forma o presente estudo avaliou a atividade antiparasitária de um novo inibidor da CYP51 (composto **1**) e de 17 análogos através de diferentes análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar, através de estudos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*, a eficácia e seletividade de novos inibidores da biossíntese de ergosterol sobre a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O objetivo geral desdobrou-se nos quatro objetivos específicos listados abaixo:

- A. Avaliar a atividade dos compostos sobre as formas relevantes para infecção humana: formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas, em diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* representantes de distintos DTUs;
- B. Determinar o perfil de toxicidade dos compostos sobre culturas de células de mamíferos (células cardíacas e de linhagem celular L929), estabelecendo o índice de seletividade (IS);
- C. Conduzir avaliações bioquímicas, de modelagem molecular e predição matemática, visando caracterizar o perfil farmacológico dos compostos testados e seu perfil de interação e de inibição da enzima CYP51 do parasito,
- D. A partir da análise de ação *in vitro* e *in silico*, explorar efeito anti-parasitário *in vivo* dos compostos mais promissores através de estudos sobre infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

3 ANEXO

3.1 ARTIGO SUBMETIDO

O trabalho a seguir intitula-se “**Identification of Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: In vitro and in vivo evaluation, binding mode prediction and SAR exploration**” e foi compilado a partir dos dados obtidos na presente dissertação, submetido e aceito para ser publicado na revista *European Journal of Medicinal Chemistry*.

Nele foi avaliado, a atividade de um inibidor de CYP51 (composto **1**) selecionado a partir de uma quimioteca. Com este composto foram realizados ensaios fenotípicos que determinaram a atividade da molécula. Tendo em vista estes dados a molécula foi otimizada estruturalmente dando origem a 17 análogos (**1a**, **1b**, **1c**, **1d**, **1e**, **1f**, **1g**, **1h**, **1i**, **1j**, **1k**, **1l**, **1m**, **1n**, **1o**, **1p** e **1q**), que tiveram sua atividade investigada sobre as formas parasitárias relevantes para infecção humana, a forma tripomastigota sanguínea e a forma multiplicativa - amastigota intracelular, utilizando diferentes cepas representantes de distintos DTU's (I, II e VI). Além disso, foi caracterizado seu perfil de toxicidade sobre células de mamíferos, bem como avaliado a relação estrutura – atividade e modo de interação com a enzima do parasito. E a partir dos resultados, no artigo determinamos a janela terapêutica dos compostos, através do cálculo de índice de seletividade, investigando por fim, a ação *in vivo* das duas moléculas mais potentes, o composto **1** e seu análogo **1f**.

CARTA DE SUBMISSÃO

De: eesserver@eesmail.elsevier.com [mailto:eesserver@eesmail.elsevier.com]

Enviada em: terça-feira, 19 de dezembro de 2017 18:02

Para: soeiro@ioc.fiocruz.br

Assunto: Thank you for your submission to European Journal of Medicinal Chemistry

Dear Dr. Soeiro,

Thank you for sending your manuscript Identification of Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: In vitro and in vivo evaluation, binding mode prediction and SAR exploration for consideration to European Journal of Medicinal Chemistry. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for European Journal of Medicinal Chemistry to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0223-5234/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of European Journal of Medicinal Chemistry, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/EJMECH>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: soeiro@ioc.fiocruz.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/EJMECH/automail_query.asp

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in European Journal of Medicinal Chemistry.

Kind regards,

Professor Hervé Galons

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

Identification of Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: *In vitro* and *in vivo* evaluation, binding mode prediction and SAR exploration

Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza¹, Raiza Brandão Peres¹, Marianne Rocha Simões-Silva¹, Patricia Bernardino da Silva¹, Denise da Gama Jaen Batista¹, Cristiane França da Silva¹, Aline Nefertiti Silva da Gama¹, Tummala Rama Krishna Reddy² and Maria de Nazaré Correia Soeiro*¹

¹ Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

² School of Health, Sport and Bioscience, College of Applied Health and Communities, University of East London, Stratford campus, Water Lane, UK.

* Corresponding author at Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

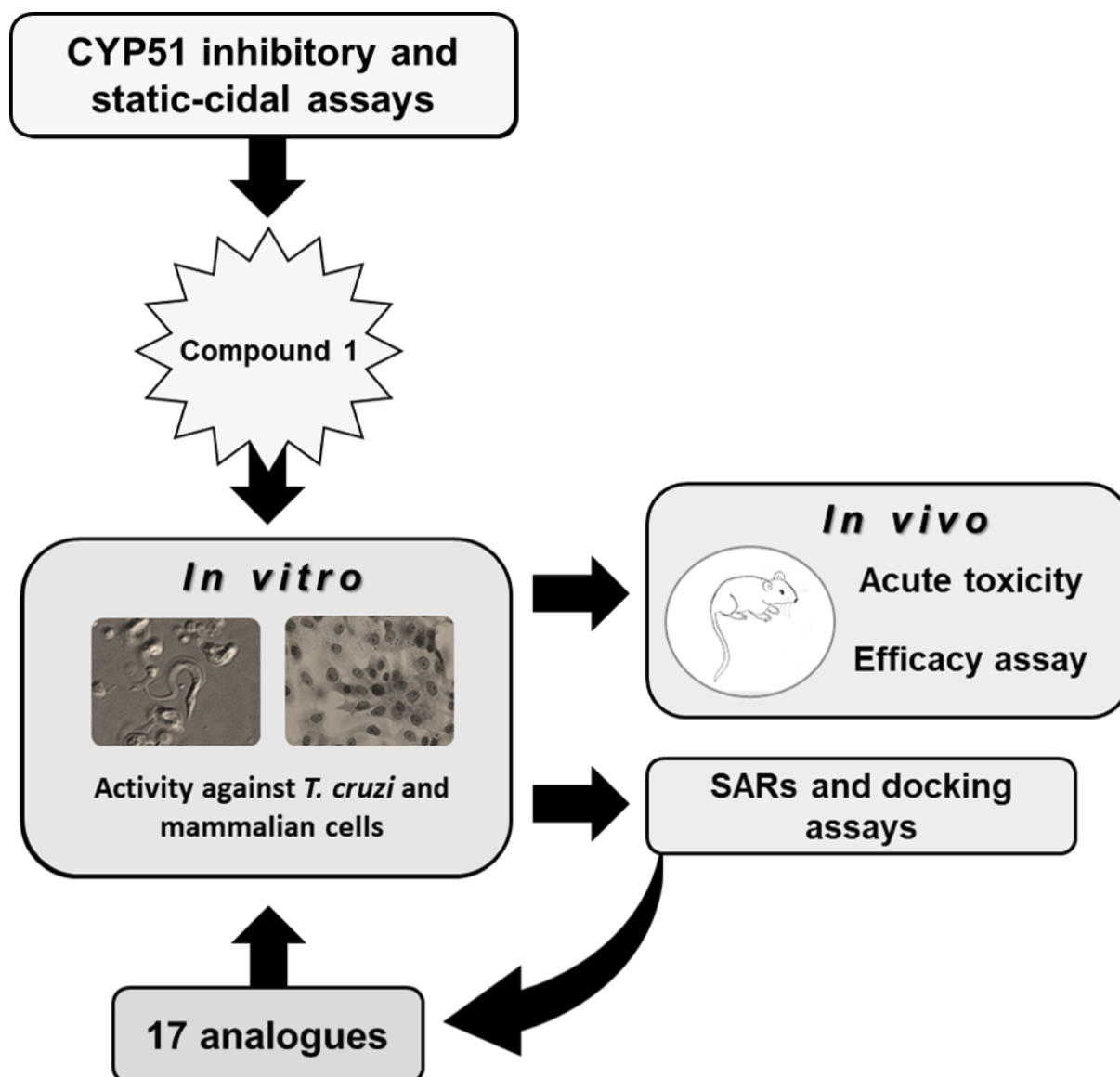
Email address: soeiro@ioc.fiocruz.br (M.N.C. Soeiro)

Running title: Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin activity against *T.cruzi*

Highlights

- Structure based studies predicted the binding of novel CYP51 inhibitor with CYP51Tc.
- The compounds **1** and **1f** displayed trypanocidal effect upon *T.cruzi* *in vitro*.
- Compound **1f** gave no effect *in vivo*, while compound **1** reduced the parasitemia peak.

Graphical abstract



Abstract

American trypanosomiasis or Chagas disease (CD) is a vector borne pathology caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), which remains a serious global health problem. The current available treatment for CD is limited to two nitroderivatives with limited efficacy and several side effects. The rational design of ergosterol synthetic route inhibitors (e.g. CYP51 inhibitors) represents a promising strategy for fungi and trypanosomatids, exhibiting excellent anti-*T.cruzi* activity in pre-clinical assays. In the present work, we evaluate through different approaches (molecular docking, structure activity relationships, CYP51 inhibitory assay, and phenotypic screenings *in vitro* and *in vivo*) the potency and selectivity of a novel CYP51 inhibitor (compound **1**) and its analogues against *T.cruzi* infection. Regarding anti-parasitic effect, compound **1** was active *in vitro* with EC₅₀ 3.86 and 4.00 μM upon intracellular (Tulahuen strain) and bloodstream forms (Y strain), respectively. *In vivo* assays showed that compound **1** reduced in 43 % the parasitemia peak but, unfortunately failed to promote animal survival. In order to promote an enhancement at the potency and pharmacological properties, 17 new analogues were purchased and screened *in vitro*. Our findings demonstrated that five compounds were active against intracellular forms, highlighting compounds **1e** and **1f**, with EC₅₀ 2.20 and 2.70 μM, respectively, and selectivity indices (SI) = 50 and 36, respectively. Against bloodstream trypanomastigotes, compound **1f** reached an EC₅₀ value of 20.62 μM, in a similar range to Benznidazole, but with low SI (3). Although improved the solubility of compound **1**, the analogue **1f** did not enhance the potency *in vitro* neither promote better *in vivo* efficacy against mouse model of acute *T.cruzi* infection arguing for the synthesis of novel pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin derivatives aiming to contribute for alternative therapies for CD

Key-words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, CYP51 inhibitors and SAR studies.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is a parasitic infection caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Considered, as a worldwide public health problem due to migration flows and non-vector transmission routes, it is estimated that about 6 to 7 million people are carriers of *T. cruzi* and an average of over 12,000 people die every year [1, 2]. The main mechanism of transmission includes: classical vectorial transmission by triatomine bugs also known as blood sucking bugs, via congenital when the parasite is transmitted from mother to child, by oral contamination through ingesting the parasite on contaminated food or drink and through iatrogenic that comprehend blood transfusion or organ transplantation [3]. In many endemic countries like Brazil, vector and blood bank control measures lead to a drastic decrease in the number of new cases via classical vectorial route however, in last decades the oral transmission has emerged with epidemiological relevance in the Amazon region [2]. The CD has two phases, the acute phase appears soon after infection and is characterized by the patent parasitemia and mostly displaying oligosymptoms ranging from flu-like to intense myocarditis. Due to immune host response, there is a control of the parasite load and most patients move to a later stage called the chronic phase. Although most stay at the indeterminate stage, about 30-40% may develop symptoms after 10 to 20 years post infection mainly related to cardiomyopathy associated or not to gastrointestinal effects [1,4]. The CD available treatment is restricted to two oral nitroheterocyclic compounds, nifurtimox and benznidazole (Bz) both introduced in clinical more than 50 years ago. Even though 25 million people are at risk of infection, according to the WHO, less than 1% of infected patients receive treatment [5]. Thus, the development of new effective drugs for Chagas disease is urgently needed, a neglected pathology that mostly affects poor regions, and with low interest

by the pharmaceutical companies due to the low monetary welfares. In addition, other limitations of using the current nitro-derivative drugs are: varying results according to the disease stage, treatment period and dose, age and geographical origin of the patients, side effects, besides a natural resistance profile of some parasite strains against nitro-derivatives [1, 6, 7, 8]. In order to face the limitations of the available therapy, several *in vitro* and *in vivo* studies of potentials new drug candidates for CD have been performed; some of these studies involving inhibitors of the ergosterol biosynthesis pathway. Differently from mammalian cells, in fungi and trypanosomatids, the cytochrome P450 enzyme or sterol 14 α -demethylase (CYP51) pathway leads to formation of ergosterol-like products, which are essential for the survival of these parasites, producing viable membranes and making possible cell growth and division [9,10]. Recently, two CYP51 inhibitors first introduced as antifungal, Posaconazole and E1224 (the prodrug of Ravuconazole) and that later showed *in vitro* and *in vivo* efficacy against *T. cruzi* were moved for clinical trials upon chronic Chagas disease patients. Unsuccessfully, both inhibitors demonstrated therapeutic failure as compared to the reference drug, Bz [3, 11]. Among several possibilities, the disappointing results could be related to the lack of translation from *in vitro* and *in vivo* models as compared to the clinic trials as well as lack of pharmacological ideal conditions for human therapy. In fact, the efficacy of the CYP51 inhibitors may be related to the dose and time of exposure. It has been proposed that in clinical trials the administrated dose was inferior to those reached in pre-clinical analysis required to sustain the trypanocidal effect. Also, longer drug therapy administration could have improved their clinical trial efficacy [12, 13, 14]. Then, this class of compounds should be more studied in pre-clinical studies as the parasite is dependent on endogenous sterols and their products, reinforcing the purpose to study CYP51 inhibitors as potential treatment to CD [15, 16, 17]. Also, it

must be considering others CYP51 inhibitors molecules, like imidazolic compounds VNI and VFV, that revealed very promising activity against a variety of *T. cruzi* strains *in vitro* and *in vivo* including a high stringent male mouse experimental model [10, 18, 19, 20]. These findings reinforces the need to test the potential activity of novel inhibitors of CYP51 more potent and selective and that could be designed with optimized pharmacological properties, besides presenting reduced production cost, and which would allow treatment to be carried out for extended periods of time [10, 16, 20]. Thus, the aim of this study was to evaluate the anti-parasitic activity of a novel pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitor (compound 1) and its 17 analogues through different *in silico*, *in vitro* and *in vivo* analysis.

2. Results and discussion

Compound dataset was prepared using commercially available compounds, which cover the broad chemical landscape from the Asinex supplier of ZINC database (release 6). A dataset of 240,000 compounds was extracted (smiles format) based on “lead-like” properties such as Molecular weight between 150 and 500, H-bond donor ≤ 5 , H-bond acceptors ≤ 10 , XlogP ≤ 5 , Number of rotatable bonds ≤ 8 . The minimum cut off for the molecular weight was chosen as 150 to avoid the selection of reagent like molecules. 2D-fingerprints in combination with tanimoto distances were used to select a diverse set of 100 compounds. These compounds were screened for their *in vitro* efficacy against intracellular *T. cruzi* amastigotes (strain: Sylvio X10/7) in a single replicate at 5 μM . Five compounds that showed $>80\%$ growth inhibition of intracellular amastigotes were selected and a 10-point dose-response curves was carried out to determine their potency. We next assessed these compounds in the static-cidal and CYP51_{Tc} assays. Here, we discuss an interesting compound 1 (MW

413.93; cLogP 4.84; H-bond acceptors 4; H-bond donors 2; Number of rotatable bonds 4) with a pyrazolo[3,4-e][1,4] thiazepin scaffold that showed strong CYP51_{Tc} inhibition, with activity comparable to Nifurtimox (Figure 1). This compound demonstrated an EC₅₀ of 0.4 μM against intracellular Sylvio X10/7 parasites, cidal nature (rate of kill assay) with minimum cidal concentration (MCC) of 17 μM (Figure 2) and CYP51_{Tc} inhibition with an IC₅₀ of 0.1 μM (Figure 3). Both potency and cidal nature of this compound are compared to Nifurtimox in Table 1.

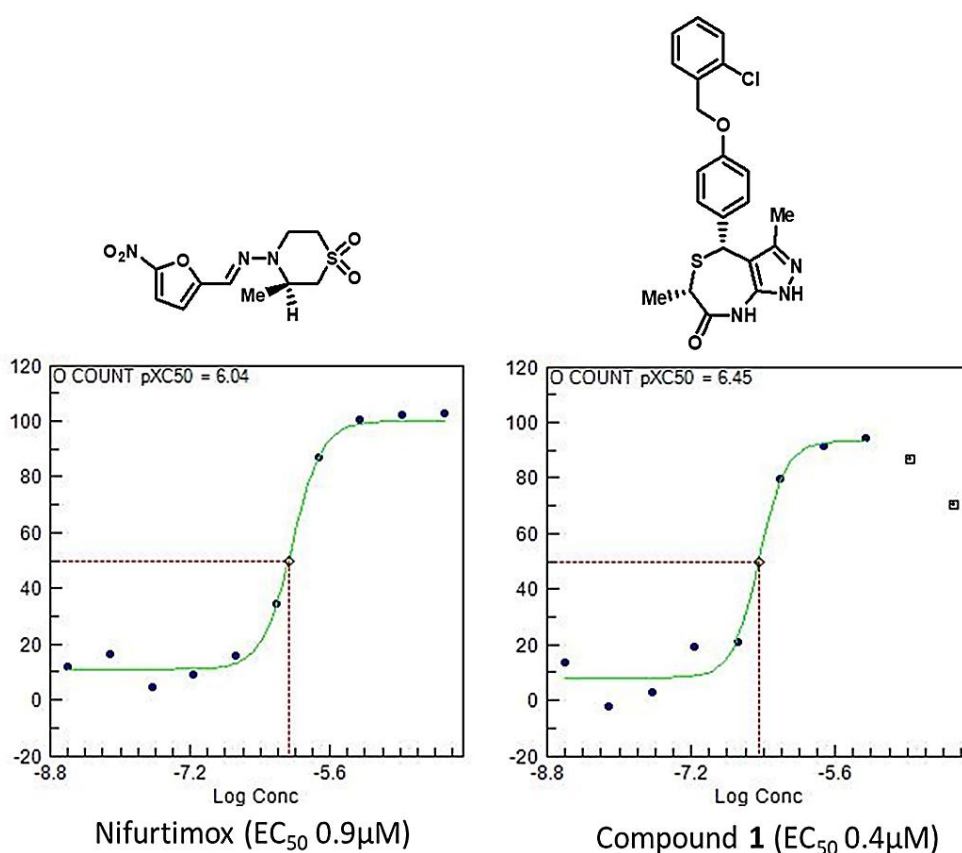


Figure 1. Molecular structures and ten point dose response curves of Nifurtimox and compound 1 with calculated potency values. The X-axis shows log of compound molar concentrations (M) and Y-axis shows the normalized activity based on the measurement of number of amastigotes per host cell.

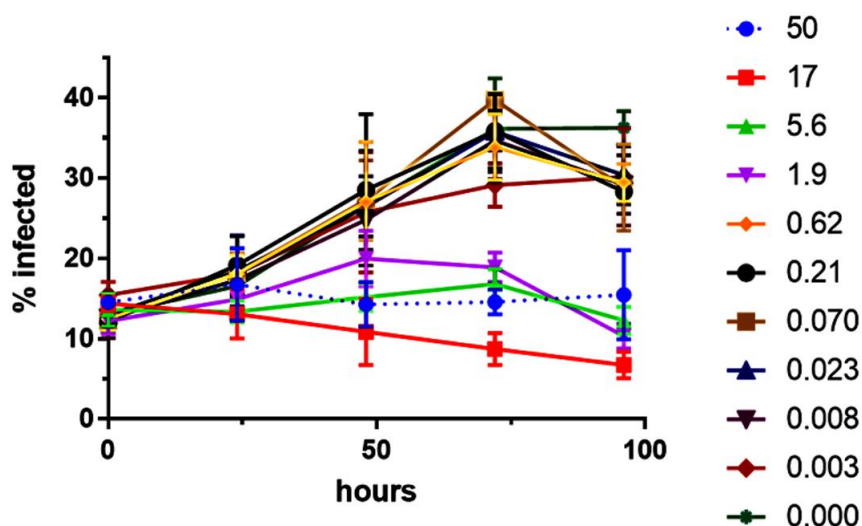


Figure 2. Rate-of-kill assay for compound 1. Ten concentrations of compound were tested. Growth curves are shown for the compound at different concentrations indicated on the right hand side of each growth-line (μM). The level of infection was assessed every 24 hours for 96 hours. Dotted line represents concentration at which host cell toxicity was observed. All measurements are the average of three replicates.

Table 1. Potency assay and Static-cidal (SC) assay results for control compound Nifurtimox and compound 1

Compound	MAX PI * (Static Cidal)	Activity against Sylvio X10/7 strain EC_{50} (μM)	Cidal/Static Conc. MIN (μM)	TOX Conc. (μM)
Nifurtimox	103	0.9	5	>50
Compound 1	94	0.4	17	50

*Maximum Percent Inhibition in the static cidal assay, only derived from compound concentrations that are not toxic to the host cells.

Inhibitory effect of compound 1 on CYP51_{Tc} activity

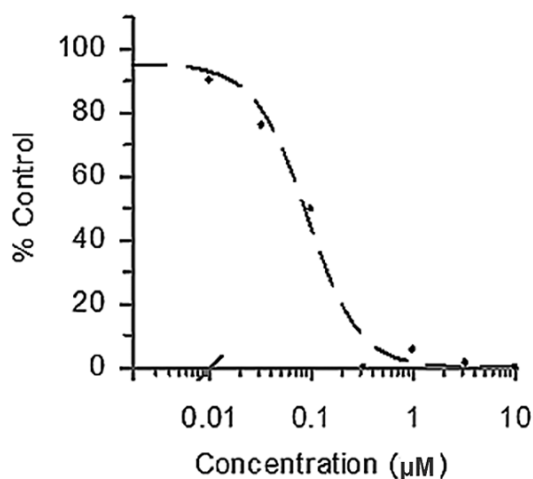


Figure 3. *T. cruzi* CYP51 Inhibition Assay results for the compound 1 showing an IC_{50} value of 0.1 μM . 'Y' axis range 95.02 (std. error 4.94), slope factor 1.70 (std. error 0.39). Refer supporting information for test concentrations and associated data.

Compound **1** was tested in a fluorescence based functional assay [21] using recombinant expressed *T.cruzi* CYP51 (Tulahuen strain). Posaconazole was used as a reference compound. Compound **1** showed potent inhibition of *T.cruzi* CYP51 with IC₅₀ value of 0.1 μM (Figure 3), whereas Posaconazole displayed an IC₅₀ value of 0.048 μM (refer supporting information). In a similar assay, Riley et al. [21] reported an IC₅₀ value of 0.880 μM for Fluconazole. Overall compound **1** displayed over 8-fold more inhibitory activity than Fluconazole and 2-fold less inhibitory activity than Posaconazole.

As compound **1** showed good potency, cidal nature and strong CYP51_{Tc} inhibition, we have selected this compound for further development. Initially we have assessed the binding interactions of compound **1** with CYP51 using structure based drug design in order to gain deeper understanding of the interactions at the molecular level. Further, we have tested this compound against other strains of *T.cruzi* representatives of distinct parasite discrete type units - DTUs (Tulahuen – DTU VI and Y, DTU II).

Binding Mode Prediction and Molecular interactions analysis of compound 1

The ligand present in the CYP51_{Tc} (PDB ID: 4C27) crystal structure was re-docked to validate the docking protocol, which was able to successfully reproduce the binding mode observed in the crystal structure. The RMSD value between the heavy atoms of the GLIDE-predicted pose and the crystallographic binding pose is 0.41 Å. We used this docking protocol to dock compound **1** to CYP51_{Tc}.

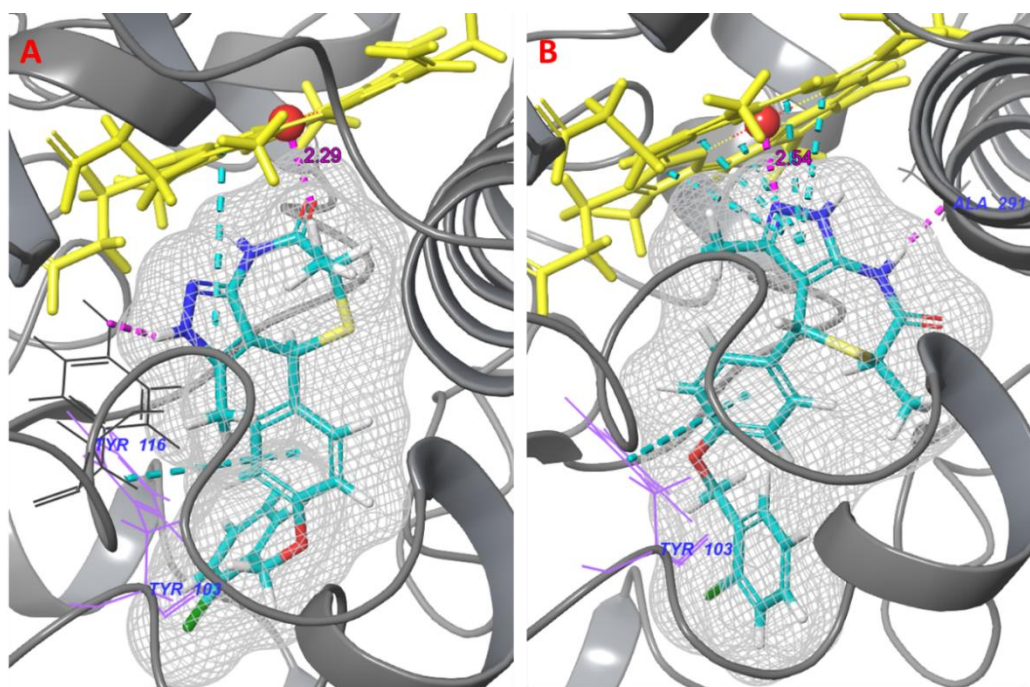


Figure 4: Predicted binding poses (A and B) of compound **1** (Teal sticks). CYP51 of *T. cruzi* is represented as a transparent surface with cartoon secondary structure. Heme in yellow sticks, Fe in red CPK model. Compound **1** representation: Van der Waals surface around the compound **1** in mesh format, nitrogen in blue, oxygen in red, sulfur in yellow, chlorine in green. Heme iron co-ordination for both binding poses (A and B) in magenta dotted lines. π - π stacking interactions between pyrazole ring and heme macrocycle in teal dashed lines. Side chains of the amino acid residues (wire format) involved in interactions with compound **1** (A, B) through either π - π stacking (Teal dashed lines) or hydrogen bonding (magenta dashed lines). All structure based drug design Images in this article are generated using Schrödinger drug design software.

Docking studies predicted two binding poses for compound **1** (Figure 4). In both the poses, the benzyloxy phenyl moiety attached to the basic scaffold pyrazolo-thiazepin mainly occupies the hydrophobic cleft making good van der Waals and hydrophobic interactions with the surrounding amino acids, but the basic scaffold is in different orientation, and the heme iron coordination is different. In the top scoring **pose 1** (XP GScore = - 9.44), the heme iron coordination is predicted with the carbonyl oxygen of the basic scaffold at a distance of 2.29 Å. The Pyrazole ring of the basic scaffold engages in π - π stacking interactions with the heme macrocycle and hydrogen bonds through N-H group with a hydroxyl oxygen of the B'/C loop residue Tyr116. In addition, the phenyl group undergoes a π - π stacking interaction with the

phenyl ring of the B' helix residue Tyr103. In the slightly lower scoring **pose 2** (XP GScore = - 8.66), the heme iron coordination is predicted with the nitrogen atom of the pyrazole ring at a distance of 2.54 Å. Similar to pose 1, the Pyrazole ring undergoes π - π stacking interactions with the heme macrocycle and the phenyl group engages in π - π stacking interaction with the phenyl ring of the B' helix residue Tyr103. In addition, the N-H group of the thiazepin ring hydrogen bonded to the carbonyl oxygen of the I-helix residue Ala291. The proposed hydrogen bond formation with Tyr116, π - π stacking interactions with the heme macrocycle and Tyr103 appear to mimic the posaconazole/flucanazole interactions with the CYP51_{Tc}. Overall, both the poses are stabilized in the binding pocket with a network of interactions including Fe-coordination, π - π stacking and hydrogen bonding interactions. It appears that these interactions play a dominant role in the binding affinity of compound **1**.

Evaluation of *in vitro* activity of compound 1 against Tulahuen and Y strains

Compound **1** was further evaluated against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen strain transfected with the β -galactosidase). The anti-parasitic activity of this compound was measured to determine the EC₅₀ values after 96 h of compound incubation. The data showed that compound **1** present considerable reduction in the number of parasite population, with an EC₅₀ of 3.86 μ M, which is comparable to the activity of reference compound (Bz) that reached an EC₅₀ of ~2.63 μ M (Table 2). Our data confirmed that this CYP51 inhibitor is able to act upon different parasite strains (Sylvio-X10/7 and Tulahuen), belonging also to different *T. cruzi* DTUs (I and VI, respectively), which is a very promising characteristic for a novel drug for CD [8].

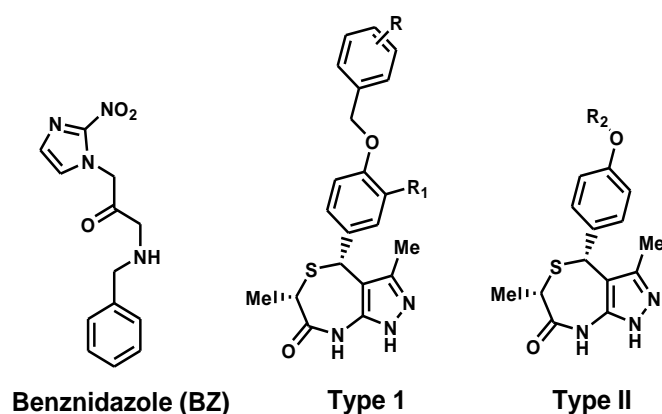
Table 2. Activity (EC_{50} - Mean \pm SD) against intracellular forms (Tulahuen B-Galactosidase transfected strain) and bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* (2 and 24h - Y strain).

Compound	Activity against intracellular forms (EC_{50} μ M)	Activity against bloodstream trypomastigotes (EC_{50} μ M)	
		2 h	24 h
Benznidazole	2.63 \pm 0.49	>10	6.02 \pm 1.47
Compound 1	3.86 \pm 0.26	>10	4.00 \pm 0.35

Next, as compound 1 displayed a potential activity *in vitro* against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen and Sylvio X10/7 strains), this compound was assayed against other relevant forms for mammalian infection, the bloodstream trypomastigotes, using also another parasite strain and DTU (Y strain, DTU II), under a time drug exposure incubation (2 and 24 h). The findings demonstrated that although both compound 1 and Bz were not active after 2 h of incubation (EC_{50} of >10 μ M), the CYP51 inhibitor showed trypanocidal effect after longer periods of incubation of BT, with an EC_{50} of ~4 μ M, and as found for intracellular parasites (Tulahuen strain), with comparable potency as Bz (Table 2) and Nifurtimox (Table 1). We have therefore evaluated a set of selected analogues (1a-1q, Table 3) with various functional groups that differ in electronic properties, position and steric properties as follows. The phenotypic effect of these compounds was first screened regarding their ability to reduce the infection levels against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen strain). Compounds with > 50 % reduction on infection levels using a single concentration (10-12 μ M, corresponding the EC_{90} value of Bz, Table 3) were further subjected to potency assays (activity expressed as EC_{50} in Table 3). Toxicity profiles were determined against L929 cell cultures by incubating for 96 h with different concentrations of these compounds and then cell viability evaluated by both light microscopy and colorimetric assay (AlamarBlue tests) and expressing the respective LC_{50} values (Table 3). The ratio of LC_{50} and EC_{50} values is presented in the same table as Selectivity Index (SI),

indicating the quantity of compound that is active against the *T. cruzi* but is not toxic towards the host cell.

Table 3. Activity (percentage reduction of the L929 culture infection) using a fixed concentration (10-12 μM), and anti-parasitic potency (EC_{50} - Mean \pm SD – 96 h), mammalian host cell toxicity (L929 – 96 h) and selectivity against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen B-Galactosidase transfected strain).



ID	Type	R			R ₁	R ₂	% reduction on the infection level (single concentration)	EC ₅₀ μM	LC ₅₀ μM	SI (LC ₅₀ /EC ₅₀)
		Ortho	Meta	Para						
Bz	-	-	-	-	-	-	89.3 \pm 2.8	3.79 \pm 1.02	>200	>53
1	I	Cl	H	H	H	-	-	3.86 \pm 0.26*	-	-
1a	I	H	H	Cl	H	-	14.88 \pm 5.44	nd	nd	nd
1b	I	F	H	H	H	-	63.64 \pm 6.52	5.30 \pm 2.84	>200	>38
1c	I	H	F	H	H	-	70.68 \pm 8.59	5.32 \pm 0.87	103.12 \pm 8.95	19.38
1d	I	H	H	F	H	-	32.42 \pm 8.72	nd	nd	nd
1e	I	Me	H	H	H	-	69.14 \pm 4.99	2.20 \pm 0.01	110.97 \pm 14.38	50.44
1f	I	H	Me	H	H	-	89.25 \pm 7.0	2.70 \pm 0.01	98.90 \pm 3.07	36.63
1g	I	H	H	Me	H	-	0	nd	nd	nd
1h	I	H	H	H	OMe	-	12.02 \pm 15.50	nd	nd	nd
1i	I	Cl	H	H	OMe	-	27.88 \pm 17	nd	nd	nd
1j	I	H	Cl	H	OMe	-	39.94 \pm 12.61	nd	nd	nd
1k	I	H	H	Cl	OMe	-	53.94 \pm 10.55	10.85 \pm 0.96	50.56 \pm 2.74	4.7
1l	I	Me	H	H	OMe	-	16.43 \pm 13.67	nd	nd	nd
1m	I	H	Me	H	OMe	-	25.05 \pm 3.77	nd	nd	nd
1n	I	H	H	Me	OMe	-	1.98 \pm 1.79	nd	nd	nd
1o	II	-	-	-	-	i-Pr	0	nd	nd	nd
1p	II	-	-	-	-	n-Pr	0	nd	nd	nd
1q	II	-	-	-	-	allyl	0	nd	nd	nd

* EC₅₀ data taken from Table 2; i-Pr: isopropyl; n-Pr: n-propyl; nd: not determined

The *in vitro* analysis revealed that five compounds (**1b**, **1c**, **1e**, **1f** and **1k**, Table 3) were able to decrease the intracellular parasite load in the infected L929 cell cultures,

ranging 53 up to 89 % of reduction when concentration equivalent of EC₉₀ of Bz was used (Table 3). These compounds also displayed low toxicity profile against mammalian host cells (LC₅₀ ≥ 50 μM, table 3). Compounds **1c**, **1e** and **1f** did not induce loss of cellular viability after incubation for 96 h with doses up to 98 μM. Compound **1b** maintained mammalian cell viability up to 200 μM. However, compound **1k** exhibited moderate toxicity with LC₅₀ of ~50 μM. Compound **1e** displayed high SI value (> 50), comparable to benznidazole. Compounds **1b**, **1c**, **1f** displayed considerable selectivity with SI values >38, >19 and >36 respectively. Although compound **1k** showed moderate potency against intracellular parasites, it showed poor selectivity (SI value = 4.7). An interesting observation from the above results (Table 3) is that compounds with *ortho*-substitutions displayed better selectivity and toxicity profiles when compared with *meta*-substituted compounds (compare SI and LC₅₀ values of **1b** with **1c** and **1e** with **1f**) when assayed against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen strain). Compounds (**1b**, **1c**, **1e**, **1f** and **1k**, Table 3) showed good *in vitro* potency against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen β-Galactosidase transfected strain) were further tested for their activity against bloodstream trypomastigotes (Y strain). The results are shown in Table 4. After 2 h of incubation, all compounds showed an EC₅₀ of >50 μM, similarly as benznidazole. After 24 h of incubation, compounds **1b**, **1e** and **1k** did not show much improvement in the potency. Compound **1c** showed large variations in potency possibly due to compound instability. Interestingly, compound **1f** showed (EC₅₀ of ~20 μM) comparable activity to reference compound (EC₅₀ of ~16 μM). The predicted binding pose of compound **1f** is shown in Figure 5 (A). The orientation of the binding pose and the receptor interactions are similar to compound **1**. We have further evaluated all five compounds for their toxicity on primary cell cultures. Uninfected cardiac cells were incubated for 24 h with different doses of these compounds and

then cell viability evaluated by both light microscopy and colorimetric assay Prestoblu.

Table 4. Activity (EC_{50} μ M - Mean \pm SD – 2 and 24h) against bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain) besides toxicity upon cardiac cells (24h) and selectivity profile.

Compound	EC_{50} μ M		LC_{50} μ M	SI (LC_{50}/EC_{50} – 24 h) μ M
	2 h	24 h		
Benznidazole	>50	16.86 \pm 3.34	>200	>12
1b	>50	>50	>200	>4
1c	>50	46.98 \pm 10.93	93.97 \pm 11.73	3.71
1e	>50	38.6 \pm 6	>200	>5.2
1f	>50	20.62 \pm 6.12	66 \pm 25.82	3.20
1k	>50	39.37 \pm 6.37	ND*	ND*

* ND: Not determined

Compounds **1b**, **1e** did not induce loss of cellular viability after incubation for 24 h up to 200 μ M (Table 4). Compounds **1c** and **1f** displayed low toxicity with LC_{50} values of ~93 and ~66 μ M, respectively.

Structure Activity Relationship (SAR) Analysis

Next, the structure activity relationships of these compounds (**1a-1q**) is discussed according to their effect towards the infection level and the EC_{50} values against the intracellular parasites. Compounds **1a-1g** (Table 3) that differ in the substitution pattern on the benzyl ring showed varied levels of potency. Compound **1** with *ortho*-chloro substitution displayed potency with an EC_{50} of ~3.86 μ M. The switching of electron withdrawing, bulky chlorine from *ortho*- position (**1**) to *para*- position (**1a**) resulted in loss of potency. Replacement of *ortho*- chloro substituent with fluoro group (**1b**) displayed potency with an EC_{50} of ~5.30 μ M, and the switching of fluoro group from *ortho*- (**1b**) to *meta*- position (**1c**) displayed similar potency. However, *para*- fluoro substituted compound (**1d**) showed poor potency. Replacement of bulky, electron withdrawing *ortho*- chloro group (**1**) with isosteric, isolipophilic and electron donating methyl group (**1e**) displayed improved potency with an EC_{50} of ~2.20 μ M,

and the switching of methyl group from *ortho*- (**1e**) to *meta*- position (**1f**) retained the potency with an EC₅₀ of ~2.70 μM. However, *para*- methyl substitution (**1g**) resulted in complete loss of potency, suggesting that the substitution pattern on the aromatic ring is important. The general trend of activity being *ortho*- and *meta*- substituted compounds are more potent than *para*- substituted compounds (compare **1** with **1a**; compare **1b**, **1c** with **1d**; compare **1e**, **1f** with **1g**). Overall, *para*- substitutions (chloro/fluoro/methyl; **1a**, **1d**, **1g**) on the benzyl ring generally displayed poor or no potency. Docking studies on these compounds suggest that *para*- substitutions protrude from the hydrophobic cleft towards a more solvent exposed area, while the *ortho*- and *meta*- substitutions allow better interactions with the hydrophobic cleft. This may explain why all substitutions at the *para*- position (**1a**, **1d**, **1g**) are not tolerated. The results suggest that the electronic properties of the substituents (chlorine moiety being electron withdrawing and methyl moiety being electron donating) did not influence the activity; however, the position specific and hydrophobic effects of the substituents on the benzyl ring are mainly involved in the variation in potency. We next turned our attention to compounds **1h-1n** with *ortho*- methoxy substituted phenyl ring. Compound **1h** with unsubstituted benzyloxy group showed poor potency. Compounds with *ortho*- (**1i**, **1l**), *meta*- (**1j**, **1m**) and *para*- substitutions (**1n**) on the benzyl ring also displayed poor or no potency, the only exception is *para*-chloro substitution which resulted in a comparatively potent compound **1k**. Our binding mode analysis of compounds **1i**, **1j**, **1l** and **1m** suggested that the introduction of a bulky methoxy group at the *ortho*- position restricts the conformation of the phenyl ring, thereby resulting in a different orientation, losing key interactions such as coordination with the heme iron, π-π stacking with Tyr103 and hydrogen bonding with Tyr116. This appears to have resulted in loss of potency for these compounds. Interestingly, in the top scored binding poses of compounds **1h**,

1k and **1n** reverse binding modes were observed, where the pyrazolo [3,4-e] [1,4] thiazepin-7-one scaffold is placed in the hydrophobic binding cleft, benzyloxy moiety is placed in the B'/C loop and I helix region. This reverse binding mode do not appear to have favoured the potency of compounds **1h** and **1n**. However, for compound **1k**, methoxy phenyl ring is in a different orientation compared to **1h** and **1n**, making strong hydrophobic interactions with the surrounding amino acids, thereby displaying moderate potency with an EC₅₀ of ~10.85 μM. The binding pose of compound **1k** is shown in Figure 5 (B).

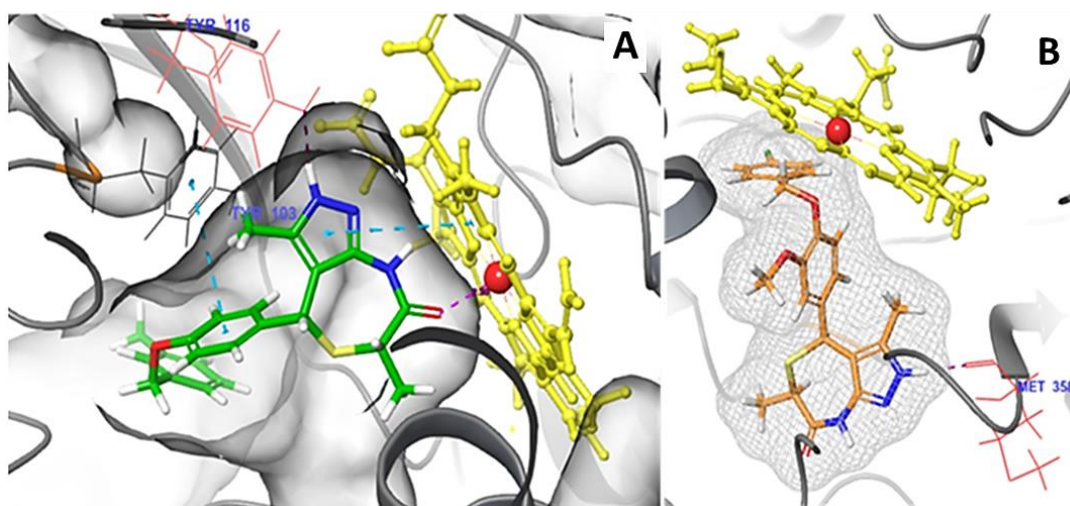


Figure 5: A) Predicted binding pose of compound **1f** (green sticks; XP GScore -8.58) in the hydrophobic tunnel. Heme iron co-ordination is represented as magenta dotted lines (2.30 Å). π - π stacking interactions between pyrazole ring and heme macromolecule in teal dashed lines. Side chains of the amino acid residues TYR103 (wire format in black) TYR116 (wire format in magenta) involved in interactions with compound **1f** through π - π stacking (teal dashed lines) and hydrogen bonding (magenta dashed lines) respectively. All the interactions of this compound are similar to compound **1** (pose 1). B) Predicted reverse binding pose of **1k** (orange sticks; XP GScore -10.64), pyrazolo [3,4-e] [1,4] thiazepin-7-one ring system is at the entrance of the tunnel and p-chlorophenyl moiety is oriented towards the heme; Heme in yellow sticks, Fe in red CPK model, Van der Waals surface around the compound **1k** in mesh format, nitrogen in blue, oxygen in red, sulfur in yellow. Side chain carbonyl oxygen of the amino acid residue MET358 (wire format in magenta) is involved in hydrogen bonding (magenta dashed lines) interaction with the NH moiety (pyrazole ring) of compound **1k**.

We finally probed the contribution of the substituted benzyl group of the pyrazolo [3,4-e] [1,4] thiazepin-7-one ring system towards the potency by screening a small set of analogues with aliphatic substitutions (Type II). Replacement of benzyl ring

with isopropyl (**1o**), n-propyl (**1p**) and allyl (**1q**) moieties completely abolished the potency altogether, suggesting that substituted benzyl ring plays an important role in stabilising the complex by forming strong hydrophobic interactions with the hydrophobic cleft. Moreover, perhaps these aliphatic substitutions do not fill the hydrophobic pocket enough, which was needed for potency and stability. Overall, these results suggest that the coordination with the heme iron, π - π stacking and hydrogen bond interactions in the B' helix and B'/C loop region, and the hydrophobic interactions with the residues surrounding the hydrophobic tunnel are crucial for the potency of this series of compounds.

Overall, **1e** and **1f** were the more promising compounds regarding potency and selectivity profiles in both the intracellular (Tulahuen) and bloodstream trypomastigote (Y strain) forms of *T. cruzi* when compared to **1b**, **1c**, and **1k**. Hence, as **1e** showed poor solubility profile, we have further evaluated compounds **1** and **1f** for their *in vivo* activity in mouse models of acute *T. cruzi* infection.

Evaluation of compounds *in vivo*

The *in vivo* efficacy of the compound **1** was evaluated using non-toxic doses (previously determined in acute mice toxicity tests, showing an NOAEL > 50 mg/kg - i.p., data not shown) using 5, 10 and 20 mg/kg/daily doses. Bz was tested in parallel at its optimal dose of 100 mg/kg [22]. The administration of compound **1** for five days resulted in a mild reduction in the parasitemia peak levels, being much lower than Bz which reached 100 % of peak suppression. The CYP51 inhibitor reached 30, 38 and 43% of reduction in respective doses of 5, 10 and 20 mg/kg/day at the peak of parasitemia, (**Figure 6**). Regarding the mortality, while Bz guaranteed 100 % animal survival, all treated animals with compound **1**, died (**Figure 7**). Unfortunately, using

the same mouse experimental model of *T. cruzi* infection, the administration for five consecutive days of 5-20 mg/kg of compound **1f** (non-toxic doses based on previous acute toxicity assays using female Swiss mice) did not induce parasitemia decrease neither protect against animal mortality. Bz was able to completely suppress parasitemia peak (8 dpi) and gave 100 % mice survival (data not shown).

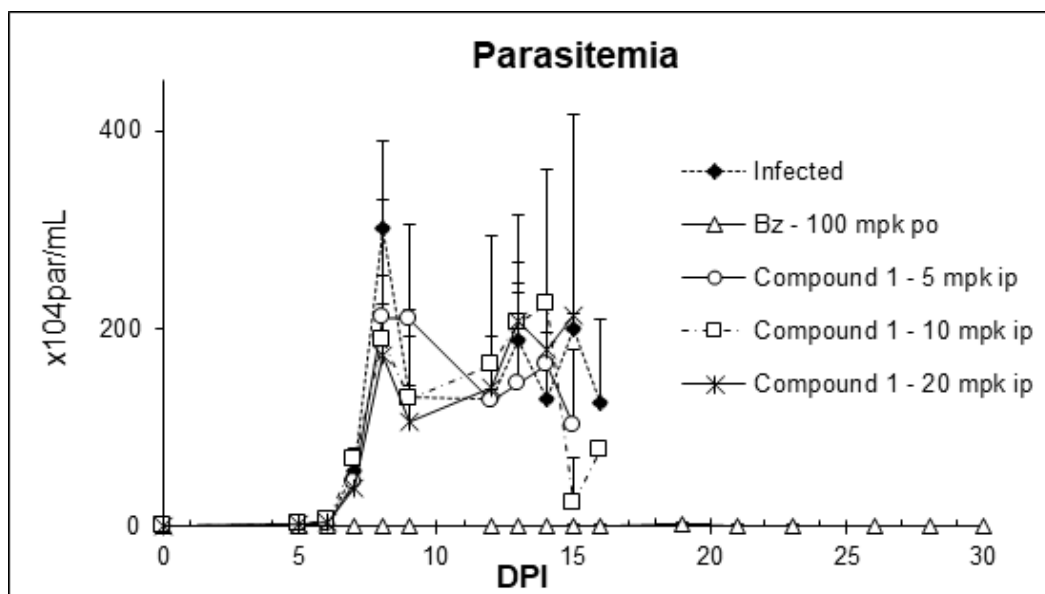


Figure 6. In vivo effect of Compound **1** (5-20 mg/kg) and Bz (100 mg/kg) upon *T. cruzi* parasitemia levels using an mouse model of acute infection (Y strain). mpk = mg/kg; DPI: Days post-infection.

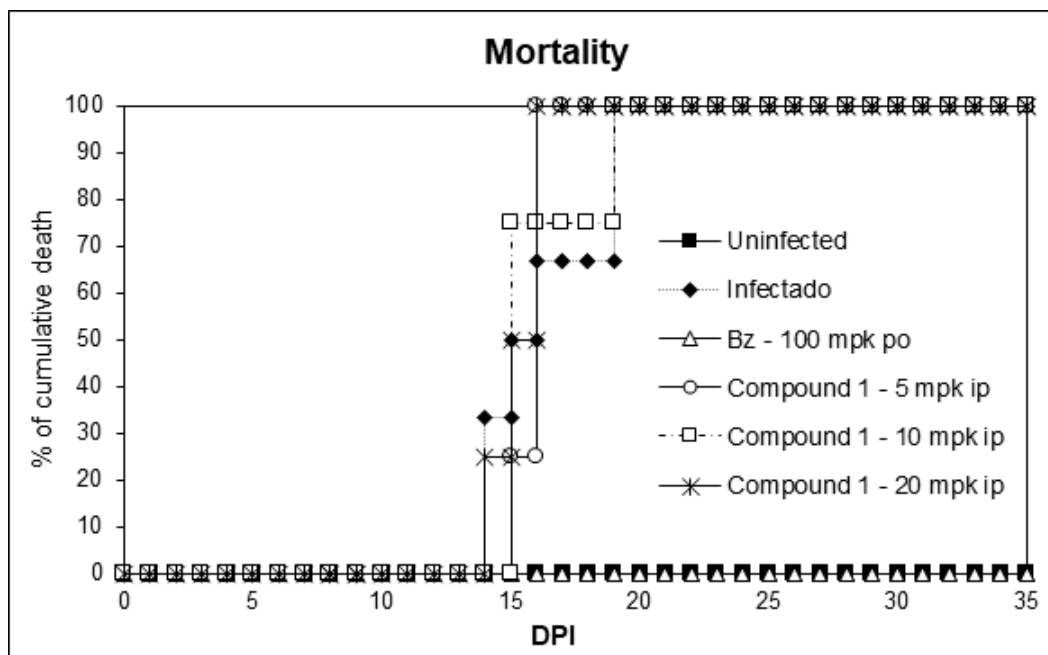


Figure 7. In vivo effect of Compound **1** (5-20 mg/kg) and Bz (100 mg/kg) upon animal mortality induced by *T. cruzi* infection using an mouse model of acute infection (Y strain). mpk = mg/kg; DPI: Days post-infection.

3. Conclusion

Only two drugs are available for the treatment of Chagas disease, and both have limited efficacy in addition to several adverse effects. So the search for more effective therapeutic alternatives is urgently needed, to face these limitations CYP51 inhibitors were suggested due to its specific and selective mechanism of action. In this study we have focused on the initial lead optimization of pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based lead compound **1**. This compound displayed comparable activity with nifurtimox and benznidazole, being potent against multiple strains (Sylvio-X10/7, Tulahuen and Y strain) and forms of *T. cruzi*. Fluorescence based functional assay confirmed that the mode of action of lead compound **1** is via inhibition of CYP51_{Tc}. Structure based drug design studies predicted the binding interactions of lead compound **1** with CYP51_{Tc} to be similar to Posaconazole and Fluconazole. A small library of analogues of compound **1** were evaluated for their potency and selectivity profiles against both the intracellular (Tulahuen) and bloodstream trypomastigote (Y strain) forms of *T. cruzi*. This resulted in interesting SARs that are in good agreement with our predicted binding modes. Compound **1f** showed most promising anti-*T.cruzi* activity. Lead compound **1** and compound **1f** were further evaluated for their *in vivo* activity in mouse models of acute *T.cruzi* infection. Compound **1** is only partially effective in the reduction of parasitemia possibly due to limited permeability and solubility characteristics. Compound **1f** failed to reduce the parasitemia possibly due to poor permeability. Solubility and permeability are important physicochemical characteristics of drug like compounds that reflect their bioavailability. The CYP51_{Tc} inhibitors described here provide an excellent template for further lead optimization of pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based

analogues with improved solubility and permeability properties that may facilitate the anti-*T.cruzi* drug development.

Acknowledges: The authors are in debt to Dr. Jennifer Riley, Dr. John Thomas and Dr. Manu De Rycker (University of Dundee) for help with generating data associated with CYP51 inhibition assay, potency and rate of kill assays (Sylvio X10/7 strain). We would also like to thank Dr. Rhodri Owen (University of East London) for providing HPLC support and for all technical support offering by Marcos Meuser (LBC/IOC/Oswaldo Cruz Foundation) and Dr. Cristina Berzal (Complutense University of Madrid). The present study was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Oswaldo Cruz, PDTIS, PAEF/CNPq/Fiocruz, CAPES and University of East London. MNCS is research fellow of CNPq and CNE research.

4. Experiment

Compound database preparation: All the compounds in the dataset were processed through concord for the three-dimensional structure generation (mol2 files). Compounds with inappropriate isomeric specifications, compounds containing disallowed atoms in terms of valency and compounds with errors in ring definition are excluded from the co-ordinate generation. These compounds were converted into SLN format (SYBYL Line Notation) using UNITY translate module in SYBYL Version 7.3 (Tripos) [23]. The selector module was used to generate two dimensional fingerprints and tanimoto distances. All the compounds in this study were purchased from ASINEX.

Molecular docking: Molecular modelling studies were performed primarily using Schrödinger drug design software suite (Schrödinger Release 2017-2) [24].

Protein preparation: The CYP51_{Tc} (PDB: 4C27 with a resolution of 1.95 Å) protein structure was retrieved from Protein Data Bank. The protein was initially prepared using the Protein Preparation Wizard module of Schrödinger suite that prepares the protein by adding hydrogens, assigning correct bond orders, creating zero bond orders to metals, fixing errors like missing side chains and adjusting the ionisation and tautomeric states (via Epik). We have deleted all the water molecules, chloride ions and solvents (ethylene glycol) from the protein. Optimisation of the hydrogen bonding network and the orientation of the hydroxyl/thiol groups, terminal amide groups in Asn and Gln, and His states was carried out using the ProtAssign algorithm. Finally, restrained minimization was carried out using all atoms OPLS3 force fields, with converge heavy atoms to RMSD set to 0.3 Å (default).

Ligand Preparation: All the compounds were prepared using Ligprep module, which performed addition of hydrogens, 2D to 3D conversion, generation of ionization and tautomeric states including metal binding states (via Epik) at physiological pH 7.0 ± 2.0, and also generated possible stereoisomers and ring conformations using default settings. All the compounds were energy minimised using OPLS3 force fields.

Docking studies: The Receptor Grid generation was carried out by identifying the ligand in the 4C27 crystal structure and excluding it from the grid generation. The grid covers the entire binding site, which includes the heme iron macromolecule. Metal coordination constraint was applied at the Fe atom of the heme that defines an interaction between the ligand atom and the heme iron. Docking of compounds was carried out using Schrödinger GLIDE, in extra precision (XP) mode.

CYP51 inhibitory assay: The CYP51 assay was carried out as described in [21]. All the potency assays and rate of kill assays with *T. cruzi* Sylvio X10/7 strain were carried out as described in [25].

Spectroscopic data analysis and compound purity assessment by HPLC

All 18 compounds were purchased directly from Asinex and used as supplied unless otherwise stated. Accurate mass and nominal mass measurements were performed using Bruker micrOTOF mass spectrometer. All ¹H-NMR spectra were recorded in deuterio-DMSO in 5 mm tubes, with tetramethylsilane as an internal standard, using a Bruker instrument. Chemical shifts (δ) are reported in ppm, and coupling constants (J) are given in Hz. Signals are represented by s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dq (double quartet), m (multiplet), bs (broad singlet), and dd (double doublet). HPLC was carried out using Agilent-1200 instrument. Column: Agilent eclipse plus C18 (150mm \times 4.6mm, 5 μ m particle size), mobile phase 0.01% TFA in acetonitrile/water (5% to 95% organic over 20min at 1mL/min), 10 μ L injection. Detection was at 254nm, runtime 25 min. All the samples were prepared by dissolving the 5mg of compound in 0.7 mL of d⁶-DMSO (Sample solution prepared for HNMR was analyzed by HPLC). Blank (without the compound) d⁶-DMSO was used as a reference standard. Most of the compounds displayed >90% purity except compounds **1h** (77%), **1j** (88%), **1l** (87%) and **1n** (84%). Refer to the supporting information for complete data on HPLC purity analysis. Isomer ratios of the compounds were calculated from ¹H-NMR spectra based on the CH₃ signal (s) from substituted pyrazole ring of the one of the isomer against CH₃ signal (s) from substituted pyrazole ring of the other isomer.

4-[4-(2-Chloro-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (Compound 1). Mixture of two isomers (98:2), δ_{H} /ppm (400 MHz, d^6 -DMSO): Major isomer peaks are at 12.32 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.62-7.55 (1H, m, Ar-H), 7.54-7.46 (1H, m, Ar-H), 7.43-7.34 (2H, m, Ar-H), 7.21 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.94 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 5.56 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 5.11 (2H, s, CH_2), 3.68 (1H, q, $J = 7.0$, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.91 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 from [1, 4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.86 (1H, s, NH from sec.amide), 7.0 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, Ar-H), 5.33 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.14 (2H, s, CH_2), 1.69 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.08 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, CH_3 from [1, 4] thiazepin ring). HRMS- m/z (ESI): found 414.1046 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$) requires 414.0965.

4-[4-(4-Chloro-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1a). Mixture of two isomers (96:4), δ_{H} /ppm (400 MHz, d^6 -DMSO): Major isomer peaks are at 12.31 (1H, s, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.48-7.41 (4H, m, Ar-H), 7.19 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 6.91 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.05 (2H, s, CH_2), 3.67 (1H, q, $J = 7.04$ Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.90 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.18 (3H, d, $J = 7.08$ Hz, CH_3 from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.86 (1H, s, NH from sec.amide), 6.97 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar-H), 5.32 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.08 (2H, s, CH_2), 1.68 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.07 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 from [1, 4] thiazepin ring). HRMS- m/z (ESI): found 414.1042 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$), requires 414.0965.

4-[4-(2-Fluoro-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1b). Mixture of two isomers (95:5), δ_{H} /ppm (400 MHz, d^6 -DMSO): Major isomer peaks are at 12.31 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.58-7.50 (1H, m, Ar-H), 7.46-7.37 (1H, m, Ar-H), 7.29-7.15 (2H, m, Ar-H) this multiplet is overlapped with doublet from the aromatic ring that is directly attached to the pyrazolo[3, 4-e][1, 4]thiazepin basic scaffold, 7.20 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 6.94 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.56 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.09 (2H, s, CH₂), 3.68 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.91 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.85 (1H, s, NH from sec.amide), 6.94 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.56 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.11 (2H, s, CH₂), 1.68 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.07 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). ¹⁹FNMR: 118.41 ppm. HRMS-m/z (ESI): found 398.1341 (C₂₁H₂₁FN₃O₂S [M + H]⁺), requires 398.1260.

4-[4-(3-Fluoro-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1c). Mixture of two isomers (86:14), δ_{H} /ppm (400 MHz, d^6 -DMSO): Major isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.47-7.38 (1H, m, Ar-H), 7.31-7.23 (2H, m, Ar-H), 7.16-7.12 (1H, m, Ar-H) this multiplet is overlapped with doublet from the aromatic ring that is directly attached to the pyrazolo[3, 4-e][1, 4]thiazepin basic scaffold, 7.19 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 6.92 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.08 (2H, s, CH₂), 3.67 (1H, q, J = 7.03 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.08 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.85 (1H, s, NH from sec.amide), 6.97 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.32 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin

ring), 5.10 (2H, s, CH₂), 3.24 (1H, q, J = 1.67 Hz), 1.67 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.06 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). ¹⁹FNMR: 113.20 ppm. HRMS-m/z (ESI): found 398.1341 (C₂₁H₂₁FN₃O₂S [M + H]⁺), requires 398.1260.

4-[4-(4-Fluoro-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1d). Mixture of two isomers (96:4), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): Major isomer peaks are at 12.33 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.54-7.44 (2H, m, Ar-H), 7.25-7.16 (4H, m, Ar-H), 6.91 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.03 (2H, s, CH₂), 3.67 (1H, q, J = 7.02 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.08 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.85 (1H, s, NH from sec.amide), 6.96 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.32 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.05 (2H, s, CH₂), 1.67 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.07 (3H, d, J = 7.1 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). ¹⁹FNMR: 114.49 ppm. HRMS- m/z (ESI): found 398.1340 (C₂₁H₂₁FN₃O₂S [M + H]⁺), requires 398.1260.

3,6-Dimethyl-4-[4-(2-methyl-benzyloxy)-phenyl]-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1e). Mixture of two isomers (97:3), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): Major isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.38 (1H, d, J = 7.30 Hz, Ar-H), 7.28-7.14 (5H, m, Ar-H), 6.94 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.56 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.03 (2H, s, CH₂), 3.68 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 2.30 (3H, s, *ortho* CH₃), 1.91 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.85 (1H, s, NH from sec.amide), 6.99 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.32 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin

ring), 5.06 (2H, s, CH₂), 2.32 (3H, s, *ortho* CH₃), 1.68 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.08 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). HRMS- m/z (ESI): found 394.1586 (C₂₂H₂₄N₃O₂S [M + H]⁺), requires 394.1511.

3,6-Dimethyl-4-[4-(3-methyl-benzyloxy)-phenyl]-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1f). Mixture of two isomers (66:34), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): Major isomer peaks are at 12.31 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.32-7.09 (6H, m, Ar-H), 6.91 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.01 (2H, s, CH₂), 3.67 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 2.31 (3H, s, *meta* CH₃), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.85 (1H, s, NH from sec.amide), 7.32-7.09 (6H, m, Ar-H), 6.96 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 5.32 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 5.03(2H, s, CH₂), 3.24 (1H, q, J = 7.2 Hz methine from [1, 4] thiazepin ring), 2.31 (3H, s, *meta* CH₃), 1.70 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.01 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 394.1580 (C₂₂H₂₄N₃O₂S [M + H]⁺), requires 394.1511.

3,6-Dimethyl-4-[4-(4-methyl-benzyloxy)-phenyl]-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1g). Mixture of two isomers (69:31), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): Major isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.36-7.27 (2H, m, Ar-H), 7.22-7.12 (4H, m, Ar-H), 6.90 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.00 (2H, s, CH₂), 3.67 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 2.29 (3H, s, *para* CH₃), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.18 (3H, d, J = 7.08 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.85 (1H, s, NH from sec.amide), 7.36-7.27 (2H, m, Ar-H), 7.22-7.12 (4H, m, Ar-H), 6.94 (2H, d, J = 8.8 Hz,

Ar-H), 5.31 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.01 (2H, s, CH₂), 3.24 (1H, q, J = 7.2 Hz methine from [1, 4] thiazepin ring), 2.30 (3H, s, *para* CH₃), 1.67 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.07 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 394.1582 (C₂₂H₂₄N₃O₂S [M + H]⁺) requires 394.1511.

4-(4-Benzyloxy-3-methoxy-phenyl)-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1h). Mixture of two isomers (63:37), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): First isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.50-7.27 (5H, m, Ar-H), 7.01-6.89 (2H, m, Ar-H), 6.75 (1H, dd, J = 8.3 + 2.0 Hz, Ar-H), 5.51 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.02 (2H, s, CH₂), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.67 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.95 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.04 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable second isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.50-7.27 (5H, m, Ar-H), 7.01-6.89 (2H, m, Ar-H), 6.63 (1H, dd, J = 8.3 + 1.8 Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.04 (2H, s, CH₂), 3.73 (3H, s, OCH₃), 3.30 (1H, q, methine from [1, 4] thiazepin ring, this peak is partly covered by water peak from DMSO), 1.68 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.09 (3H, d, J = 7.2 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 410.1539 (C₂₂H₂₄N₃O₃S [M + H]⁺) requires 410.1460.

4-[4-(2-Chloro-benzyloxy)-3-methoxy-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1i). Mixture of two isomers (72:28), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): Major isomer peaks are at 12.31 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.67 (1H, s, NH from sec.amide), 7.63-7.54 (1H, m, Ar-H), 7.53-7.46 (1H, m, Ar-H), 7.42-7.34 (2H, m, Ar-H), 7.02-6.90 (2H, m, Ar-H), 6.77 (1H, dd, J = 8.3 + 2.0 Hz, Ar-H), 5.53 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.10 (2H, s, CH₂), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.67 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.96 (3H, s, CH₃

from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH_3 from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.63-7.54 (1H, m, Ar-H), 7.53-7.46 (1H, m, Ar-H), 7.42-7.34 (2H, m, Ar-H), 7.02-6.90 (2H, m, Ar-H), 6.65 ((1H, dd, $J = 8.3 + 1.80$ Hz, Ar-H), 5.31 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.11 (2H, s, CH_2), 3.74 (3H, s, OCH_3), 3.30 (1H, q, methine from [1, 4] thiazepin ring, this peak is partly covered by water peak from DMSO), 1.69 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.09 (3H, d, $J = 7.10$ Hz, CH_3 from [1,4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 444.1159 ($\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$) requires 444.1070.

4-[4-(3-Chloro-benzyloxy)-3-methoxy-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1j). Mixture of two isomers (68:32), $\delta\text{H/ppm}$ (400 MHz, d^6 -DMSO): First isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.67 (1H, s, NH from sec.amide), 7.52-7.34 (4H, m, Ar-H), 7.03-6.87 (2H, m, Ar-H), 6.76 (1H, dd, $J = 8.3 + 2.1$ Hz, Ar-H), 5.52 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.05 (2H, s, CH_2), 3.72 (3H, s, OCH_3), 3.67 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, methine from [1,4] thiazepin ring), 1.95 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.20 (3H, d, $J = 7.04$ Hz, CH_3 from [1,4] thiazepin ring); Observable second isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.52-7.34 (4H, m, Ar-H), 7.03-6.89 (2H, m, Ar-H), 6.64 (1H, dd, $J = 8.2 + 1.9$ Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.10 (2H, s, CH_2), 3.74 (3H, s, OCH_3), 1.68 (3H, s, CH_3 from pyrazole ring), 1.09 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH_3 from [1, 4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 444.1154 ($\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$) requires 444.1070.

4-[4-(4-Chloro-benzyloxy)-3-methoxy-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1k). Mixture of two isomers (68:32), $\delta\text{H/ppm}$ (400 MHz, d^6 -DMSO): major isomer peaks are at 12.31 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.51-7.41 (4H, m, Ar-H), 7.00-6.87 (2H, m,

Ar-H), 6.75 (1H, dd, $J = 8.4 + 2.0$ Hz, Ar-H), 5.51 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.03 (2H, s, CH₂), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.67 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, methine from [1,4] thiazepin ring), 1.95 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.51-7.41 (4H, m, Ar-H), 7.00-6.87 (2H, m, Ar-H), 6.63 (1H, dd, $J = 8.2 + 1.8$ Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.04 (2H, s, CH₂), 3.73 (3H, s, OCH₃), 3.30 (1H, q, methine from [1, 4] thiazepin ring, this peak is partly covered by water peak from DMSO), 1.67 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.09 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 444.1157 (C₂₂H₂₃ClN₃O₃S [M + H]⁺) requires 444.1070.

4-[3-Methoxy-4-(2-methyl-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (11). Mixture of two isomers (66:34), δ H/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): major isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.67 (1H, s, NH from sec.amide), 7.43-7.34 (1H, m, Ar-H), 7.28-7.14 (3H, m, Ar-H), 7.03-6.91 (2H, m, Ar-H), 6.77 (1H, dd, $J = 8.3 + 2.0$ Hz, Ar-H), 5.52 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 5.00 (2H, s, CH₂), 3.70 (3H, s, OCH₃), 3.67 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, methine from [1,4] thiazepin ring), 2.30 (3H, s, *ortho* CH₃), 1.96 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.43-7.34 (1H, m, Ar-H), 7.28-7.14 (3H, m, Ar-H), 7.03-6.91 (2H, m, Ar-H), 6.65 (1H, dd, $J = 8.2 + 1.8$ Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 5.02 (2H, s, CH₂), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.30 (1H, q, methine from [1, 4] thiazepin ring, this peak is partly covered by water peak from DMSO), 2.32 (3H, s, *ortho* CH₃), 1.69 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.10 (3H, d, $J = 7.12$ Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 424.1688 (C₂₃H₂₆N₃O₃S [M + H]⁺) requires 424.1617.

4-[3-Methoxy-4-(3-methyl-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1m). Mixture of two isomers (65:35), δ H/ppm (400 MHz, d^6 -DMSO): major isomer peaks are at 12.30 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.30-7.10 (4H, m, Ar-H), 7.00-6.87 (2H, m, Ar-H), 6.74 (1H, dd, $J = 8.3 + 2.0$ Hz, Ar-H), 5.51 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.00 (2H, s, CH₂), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.66 (1H, q, $J = 7.07$ Hz, methine from [1,4] thiazepin ring), 2.31 (3H, s, *meta* CH₃), 1.95 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, $J = 7.04$ Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.30-7.10 (4H, m, Ar-H), 7.00-6.87 (2H, m, Ar-H), 6.62 (1H, dd, $J = 8.4 + 2.0$ Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 5.00 (2H, s, CH₂), 3.73 (3H, s, OCH₃), 3.30 (1H, q, methine from [1,4] thiazepin ring, this peak is partly covered by water peak from DMSO), 2.31 (3H, s, *meta* CH₃), 1.68 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.09 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 424.1687 (C₂₃H₂₆N₃O₃S [M + H]⁺) requires 424.1617.

4-[3-Methoxy-4-(4-methyl-benzyloxy)-phenyl]-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1n). Mixture of two isomers (62:38), δ H/ppm (400 MHz, d^6 -DMSO): major isomer peaks are at 12.29 (1H, bs, NH from 3-pyrazole ring), 9.66 (1H, s, NH from sec.amide), 7.35-7.26 (2H, m Ar-H), 7.24-7.14 (2H, m, Ar-H), 7.00-6.87 (2H, m, Ar-H), 6.74 (1H, dd, $J = 8.3 + 2.1$ Hz, Ar-H), 5.51 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 4.97 (2H, s, CH₂), 3.70 (3H, s, OCH₃), 3.66 (1H, q, $J = 7.0$ Hz, methine from [1,4] thiazepin ring), 2.29 (3H, s, *para* CH₃), 1.95 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.18 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.35-7.26 (2H, m Ar-H), 7.24-7.14 (2H, m, Ar-H), 7.00-6.87 (2H, m, Ar-H), 6.62 (1H, dd, $J = 8.3$

+ 1.8 Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1,4] thiazepin ring), 4.98 (2H, s, CH₂), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.29 (1H, q, methine from [1, 4] thiazepin ring, this peak is partly covered by water peak from DMSO), 2.30 (3H, s, *para* CH₃), 1.68 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.09 (3H, d, J = 7.12 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 424.1687 (C₂₃H₂₆N₃O₃S [M + H]⁺) requires 424.1617.

4-(4-Isopropoxy-phenyl)-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1o). Mixture of two isomers (97:3), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): major isomer peaks are at 12.30 (1H, s, NH from 3-pyrazole ring), 9.64 (1H, s, NH from sec.amide), 7.15 (2H, d, J = 8.68 Hz, Ar-H), 6.80 (2H, d, J = 8.76 Hz, Ar-H), 5.54 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 4.54 (1H, hept, CH of isopropyl), 3.67 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.23 (6H, d, J = 6.0 Hz, (CH₃)₂ of isopropyl), 1.18 (3H, d, J = 7.08 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring); Observable minor isomer peaks are at 9.83 (1H, s, NH from sec.amide), 6.85 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.67 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.07 (3H, d, J = 7.1 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring). HRMS; m/z (ES): found 332.1428 (C₁₇H₂₂N₃O₂S [M + H]⁺) requires 332.1354.

3,6-Dimethyl-4-(4-propoxy-phenyl)-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1p). Mixture of two isomers (85:15), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): major isomer peaks are at 12.30 (1H, s, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.16 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 6.82 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 3.87 (2H, t, J = 6.52 Hz, OCH₂ of n-propyl), 3.67 (1H, q, J = 7.0 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.76-1.62 (2H, m, CH₂ of n-propyl), 1.19 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃ from [1,4]

thiazepin ring), 0.95 (3H, t, J = 7.45 Hz, CH₃ of n-propyl); Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 7.13 (2H, d, J = 8.64 Hz, Ar-H), 6.86 (2H, d, J = 8.72 Hz, Ar-H), 5.30 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 3.90 (2H, t, J = 6.56 Hz, OCH₂ of n-propyl), 3.23 (1H, q, J = 7.17 Hz this peak is partly covered by water peak from DMSO), 1.76-1.62 (2H, m, CH₂ of n-propyl), 1.06 (3H, d, J = 7.20 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring), 0.97 (3H, t, J = 7.47 Hz, CH₃ of n-propyl); HRMS; m/z (ES): found 332.1428 (C₁₇H₂₂N₃O₂S [M + H]⁺) requires 332.1354.

4-(4-Allyloxy-phenyl)-3,6-dimethyl-4,8-dihydro-1H-pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin-7-one (1q). Mixture of two isomers (97:3), δH/ppm (400 MHz, d⁶-DMSO): major isomer peaks are at 12.31 (1H, s, NH from 3-pyrazole ring), 9.65 (1H, s, NH from sec.amide), 7.17 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 6.85 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 6.09-5.94 (1H, m, =CH of allyl), 5.55 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 5.37 [1H, dq, J = 1.71 + 17.25 Hz, =CH₂ (H_a-terminal vinyl proton on SP² carbon)], 5.23 [1H, dq, J = 1.4/1.6 + 10.5 Hz, =CH₂ (H_b-terminal vinyl proton on SP² carbon)], 4.52 [1H, t, J = 1.48, O-CH₂ (H_a-allyl proton adjacent to SP² carbon)], 4.51 [1H, t, J = 1.48, O-CH₂ (H_b-allyl proton adjacent to SP² carbon)], 3.67 (1H, q, J = 7.1 Hz, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.90 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.19 (3H, d, J = 7.1 Hz, CH₃ from [1,4] thiazepin ring), Observable minor isomer peaks are at 9.84 (1H, s, NH from sec.amide), 6.87 (2H, d, J = 8.72 Hz, Ar-H), 5.31 (1H, s, methine from [1, 4] thiazepin ring), 1.67 (3H, s, CH₃ from pyrazole ring), 1.07 (2H, d, J = 7.1 Hz, CH₃ from [1, 4] thiazepin ring), HRMS; m/z (ES): found 330.1272 (C₁₇H₂₀N₃O₂S [M + H]⁺) requires 330.4180.

Compounds preparation: Benznidazole (Bz) (N-benzyl-2-nitroimidazole-1-acetamide) was obtained from the Pharmaceutical Laboratory of the State of Pernambuco (LAFEPE, Brazil) and used in all trials as reference drug. All the CYP51

inhibitor compounds were purchased from Asinex commercial vendor, diluted in dimethylsulfoxide (DMSO - *in vitro*) or in trappsol (*in vivo*) not reaching vehicle levels above 0.6 % and 20 % for *in vitro* and *in vivo* assays, respectively.

***T. cruzi* parasites:** Bloodstream trypomastigotes (BT - *Y strain*) were obtained from heart puncture of infected male Swiss Webster mice at parasitemia peak. The parasites were purified and resuspended in RPMI 1640 medium (pH 7.2 to 7.4) without phenol red (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM glutamine, as reported previously [26, 27] The analysis upon intracellular forms *T. cruzi* (Tulahuen strain transfected with *Escherichia coli* β -galactosidase gene) [28] was conducted using L929 cell lineages that were infected with tissue culture-derived trypomastigotes using a 10:1 parasite/ host cell ratio [27].

***In vitro* assays**

Mammalian cell culture: The cardiac cells (CC) were obtained from Swiss embryos Webster mice as described by Meirelles and coworkers [29], and seeded 96 well plate. The cardiac cell cultures were stored at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; without phenol red; Sigma-Aldrich) supplemented with 5% fetal bovine serum, 2.5 mM CaCl₂, 1 mM L-glutamine, streptomycin, and 2% chicken embryo extract [22, 29]. Moreover, L929 fibroblastic cells were cultivated (4 x10³ cells/well in 96-well microplates) at 37°C in RPMI 1640 medium (pH 7.2 to 7.4) without phenol red (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% glutamine, as reported previously [27, 30].

Cytotoxicity assays: To evaluate the toxicity profile and determine the selectivity index (SI), cardiac and L929 cells were incubated at 37°C with crescent concentrations of the studied compounds for 24 and 96 h and cellular viability were

evaluated by colorimetric analysis using Prestoblue [27] and Alamarblue [30] assays as reported, respectively. After 5 and 6 h of incubation respectively, the absorbance were measured at 570 and 600 nm according to manufactures instructions and the results confirmed by the analysis of morphology and physiology aspects through light microscopy. The results are expressed as the percent of reduced viability in compound-treated and vehicle-treated samples by following the manufacturer's instructions and the EC₅₀ values calculated (concentration that reduces the cellular viability by 50%) [26, 27, 30].

Trypanocidal effects: BT forms of Y strain ($5 \times 10^6/\text{mL}$) were incubated for 2 and 24 h at 37°C in absence or presence of crescent concentrations (0 – 50 μM) of each tested compound. The compounds were diluted in RPMI 1640 medium (Roswell Park Memorial Institute - Sigma Aldrich – USA) supplemented with 5% FBS. Subsequently the incubation, death rates were assessed by light microscopy quantification using a Neubauer chamber to determine the EC₅₀ that correspond the compound concentration that reduces in 50% of the number of the parasite population [26,27, 31]. For the effect against intracellular forms (Tulahuen- β -galactosidase strain), L929 cells were infected for 2h, rinsed using saline to remove non-internalized parasites and then incubated for 48 h at 37°C to establish the culture infection. The infected L929 cell cultures were exposed first to a fixed concentration of tested compounds (10-12 μM). Those that presented ≥ 50 % of reductions in the parasite load, were further screened using infected cultures submitted increasing non-toxic concentrations of the selected compounds to determine the EC₅₀ values. Next, the absorbance was measured at 570 nm and results expressed as the percentage of *T. cruzi* growth inhibition in compound-tested cells compared to untreated cells. In

parallel, the therapy using the reference drug (Bz) was always performed as reported [26].

***In vivo* assay**

Acute toxicity: NOAEL (no-observed-adverse-effect level) was obtained by injecting, via intraperitoneal (ip), increasing concentrations of the tested compound (up to 200 mg/kg of mice body weight) in female Swiss Webster mice (weight, 20 to 23 g; *n* - 2 mice per assay for two assays). Treated animals were inspected for toxic and subtoxic symptoms according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines. At 48 h after compound injection, the NOAEL values were determined as reported previously [31].

Mice infection and treatment schemes: Male Swiss Webster mice (18 to 20 g) obtained from the animal facilities of Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) from Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) were housed at a maximum of 6 animals per cage, and kept in a specific-pathogen-free (SPF) room at 20 to 24°C under a 12- light and 12-h dark cycle, providing sterilized water and chow *ad libitum*. The animals were acclimated for 7 days before starting the experiments. Infection was performed by i.p. injection of 10⁴ bloodstream trypomastigotes (Y strain). Compound **1** was first dissolved in DMSO and then freshly diluted with 20% of Trappsol (CTD, Inc., USA) and Bz was prepared in sterile distilled water with 3% Tween 80 (Sigma-Aldrich). The animals were divided into the following groups: uninfected (noninfected and untreated), untreated (infected with *T.cruzi* but treated only with vehicle), and treated (infected and treated) i.p. with nontoxic doses of 5 to 20 mg/kg/day test compound or with 100 mg/kg/day Bz p.o. The mouse received a 0.1-ml i.p. dose, the treatment started at 5th day post infection (dpi) that represent the

parasitemia onset in this experimental model and followed for five consecutive days, until 9th dpi. For Bz treatment, infected mice received a 0.1 mL p.o. following the same therapeutic schemes as described above [19].

Parasitemia and mortality rates: Parasitemia was individually detected by Pizzy-Brener [32] methodology using direct light microscopy to quantify the number of parasites in 5µL of blood collected from tail vein, and the mice were checked for mortality daily until 30 days post treatment [31]. Mortality was expressed by the percentage of cumulative mortality (CM) as described by Batista and coworkers [22].

Ethics

All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA LW16/14).

References

- [1] World Health Organization (WHO). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, 2017 (accessed 20 November 2017).
- [2] JCP. Dias, AN. Ramos Jr, ED. Gontijo, A. Luquetti, MA. Shikanai-Yasuda, JR. Coura, RM. Torres, JR. Melo, EA. Almeida, W Jr. Oliveira, AC. Silveira, JM. Rezende, FS. Pinto, AW. Ferreira, A. Rassi, AA Filho. Fragata, AS. Sousa, D. Correia, AM. Jansen, GM. Andrade, CF. Britto, AY. Pinto, A Jr. Rassi, DE. Campos, F. Abad-Franch, SE. Santos, E. Chiari, AM Hasslocher-Moreno, EF. Moreira, DS. Marques, EL. Silva, JA. Marin-Neto, LM. Galvão, SS. Xavier, AS. Valente, NB. Carvalho, AV Cardoso, RA. Silva, VM. Costa, SM. Vivaldini, SM. Oliveira, VD. Valente, MM. Lima, RV. Alves, 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. Rev da Soc Bras Med Trop. 49 (2016) 3-60.
- [3] E.Chatelain, Chagas disease research and development: is there light at the end of the tunnel? Comput Struct Biotechnol J. 15 (2017) 98-103.
- [4] E. Chatelain, N. Konar, Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. Drug Des Devel Ther. 9 (2015) 4807-4823.

- [5] Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-disease-background/>, 2017 (accessed 20 November 2017).
- [6] MNC. Soeiro, SL. De Castro. Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches. Expert Opin Ther Targets. 13 (2009)105-121.
- [7] SR. Wilkinson, JM. Kelly, Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Rev Mol Med. 11(2009) e31.
- [8] B. Zingales, MA. Miles, CB. Moraes, A. Luquetti, F. Guhl, AG. Schijman, I. Ribeiro, Drug discovery for Chagas disease should consider Trypanosoma cruzi strain diversity. Mem Inst Oswaldo Cruz. 109 (2014) 828-833.
- [9] JA. Urbina, Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 104 (2009) 311-318.
- [10] MN. Soeiro, EM. de Souza, CF. da Silva, Batista Dda. G, MM. Batista, BP. Pavão, JS. Araújo, CA. Aiub, PB. da Silva, J. Lionel, C. Britto, K. Kim, G. Sulikowski, TY. Hargrove, MR. Waterman, GI, Lepesheva, *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase inhibitor VNI against drug-resistant strains of *T. cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 57(2013) 4151-4163.
- [11] I. Molina, J. Gómez i Prat, F. Salvador, B. Treviño, E. Sulleiro, N. Serre D. Pou, S. Roure, J. Cabezos, L. Valerio, A. Blanco-Grau, A. Sánchez-Montalvá, X. Vidal, A. Pahissa, Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. N Engl J Med. 370 (2014)1899-1908.
- [12] I. Molina, F. Salvador, A. Sánchez-Montalvá, The use of posaconazole against Chagas disease. Curr Opin Infect Dis. 28 (2015) 397-407
- [13] CA. Morillo, H. Waskin, S. Sosa-Estani, M. Del Carmen Bangher, C. Cuneo, R. Milesi, M. Mallagray, W. Apt, J. Beloscar, J. Gascon, I. Molina, LE. Echeverria, H. Colombo, JA. Perez-Molina, F. Wyss, B. Meeks, LR. Bonilla, P. Gao, B. Wei, M. McCarthy, S. Yusuf, Investigators. STOP-CHAGAS, Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. J Am Coll Cardiol. 69 (2017) 939-947.
- [14] JA.Urbina, Pharmacodynamics and Follow-Up Period in the Treatment of Human *Trypanosoma cruzi* Infections With Posaconazole. J Am Coll Cardiol. 70 (2017) 299-300.
- [15] GI. Lepesheva, Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? Expert Opin Drug Discov. 8(2013)1479-1489.

- [16] GI. Lepesheva, TY. Hargrove, G. Rachakonda, Z. Wawrzak, S. Pomel, S. Cojean, PN. Nde, WD. Nes, CW. Locuson, MW. Calcutt, MR. Waterman, JS. Daniels, PM. Loiseau, F. Villalta, VFV as a new effective CYP51 structure-derived drug candidate for Chagas disease and visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 212 (2015) 1439-1448.
- [17] WJ. Hoekstra, TY. Hargrove, Z. Wawrzak, D. da Gama Jaen Batista, CF. da Silva, AS. Nefertiti, G. Rachakonda, RJ. Schotzinger, F. Villalta, Mde N. Soeiro, GI. Lepesheva, Clinical Candidate VT-1161's Antiparasitic Effect *In Vitro*, Activity in a Murine Model of Chagas Disease, and Structural Characterization in Complex with the Target Enzyme CYP51 from *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 60 (2016) 1058-1066.
- [18] TY. Hargrove, K. Kim, M. de Nazaré Correia Soeiro, CF. da Silva, DD. Batista, MM. Batista, EM. Yazlovitskaya, MR. Waterman, GA. Sulikowski, GI. Lepesheva, CYP51 structures and structure-based development of novel, pathogen-specific inhibitory scaffolds. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2 (2012) 178-186.
- [19] FH. Guedes-da-Silva, DG. Batista, CF. da Silva, MB. Meuser, MR. Simões-Silva, JS. de Araújo, CG. Ferreira, OC. Moreira, C. Britto, GI. Lepesheva, Mde N. Soeiro, Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 59 (2015) 7564-7570.
- [20] FH. Guedes-da-Silva, DGJ. Batista, CF. Da Silva, JS. De Araujo, BP. Pavao, MR. Simoes-Silva, MM. Batista, KC. Demarque, OC. Moreira, C. Britto, GI. Lepesheva, MNC. Soeiro, Antitrypanosomal activity of sterol 14 α - demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the Swiss mouse models of Chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(2017) e02098-16.
- [21] J. Riley, S. Brand, M. Voice, I. Caballero, D. Calvo, KD.Read, Development of a Fluorescence-based *Trypanosoma cruzi* CYP51 Inhibition Assay for Effective Compound Triaging in Drug Discovery Programmes for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 9 (2015) e0004014.
- [22] DG. Batista, MM. Batista, GM. Oliveira, PB. Amaral, J. Lannes-Vieira, CC. Brito, A.Junqueira, MM. Junqueira, AJ. Romanha, PA. Sales Junior, CE. Stephens, DW. Boykin, MN. Soeiro, Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 54 (2010) 2940-2.
- [23] SYBYL Molecular Diversity Selector, Version 7.3; Tripos, Inc.: St.Louis, MO, 2006
- [24] Schrödinger Release 2017-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.

- [25] M. De Rycker, J. Thomas, J. Riley, S.J. Brough, T.J. Miles, D.W. Gray, Identification of Trypanocidal Activity for Known Clinical Compounds Using a New *Trypanosoma cruzi* Hit-Discovery Screening Cascade. *PLoS Negl Trop Dis*. 10 (2016) e0004584.
- [26] B.L. Timm, P.B. da Silva, M.M. Batista, C.F. da Silva, R.R. Tidwell, D.A. Patrick, S.K. Jones, S.A. Bakunov, S.M. Bakunova, Mde N. Soeiro, *In vitro* and *In vivo* Biological Effect of Novel Arylimidamide Derivatives Against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 58 (2014) 3720-3726.
- [27] F.H. Guedes-da-Silva, D.G.J. Batista, M.B. Meuser, K.C. Demarque, T.O. Fulco, J.S. Araújo, P.B. Da Silva, C.F. Da Silva, D.A. Patrick, S.M. Bakunova, A.S. Bakunov, R.R. Tidwell, G.M. Oliveira, C. Britto, O.C. Moreira, MNC. Soeiro, *In vitro* and *in vivo* trypanosomicidal action of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 60 (2016) 2425-2434.
- [28] F.S. Buckner, C.L. Verlinde, A.C. La Flamme, W.C. Van Voorhis, Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against *Trypanosoma cruzi* Using Parasites Expressing β -Galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*. 40 (1996) 2592-2597.
- [29] MNL. Meirelles, T.C. Araujo-Jorge, C.F. Miranda, W. de Souza, H.S. Barbosa, Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *Eur J Cell Biol*. 41(1986) 198-206.
- [30] A.J. Romanha, S.L. De Castro, MNC. Soeiro, J. Lannes-Vieira, I. Ribeiro, A. Talvani; B. Bourdin, B. Blum, B. Olivieri, C. Zani, C. Spadafora, E. Chiari, E. Chatelain, G. Chaves, J.E. Calzada, J.M. Bustamante, L.H. Freitas-Junior, L.I. Romero, M.T. Bahia, M. Lotrowska, M. Soares, S.G. Andrade, T. Armstrong, W. Degraeve, Z.A. Andrade, *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105 (2010) 233-238.
- [31] C.F. Da Silva, D.G.J. Batista, G.M. Oliveira, E.M. de Souza, E.R. Hammer, P.B. da Silva, A. Daliry, J.S. Araujo, C. Britto, A.C. Rodrigues, Z. Liu, A.A. Farahat, A. Kumar, D.W. Boykin, MNC. Soeiro, *In vitro* and *in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated salt form—DB1965—against *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One*. 7(2012) e30356.
- [32] Z. Brener, Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst Med. trop. S. Paulo*. 4 (1962) 389-396.

Supporting Information

Identification of Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: *In vitro* and *in vivo* evaluation, binding mode prediction and SAR exploration

Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza¹, Raiza Brandão Peres¹, Marianne Rocha Simões-Silva¹, Patricia Bernardino da Silva¹, Denise da Gama Jaen Batista¹, Cristiane França da Silva¹, Aline Nefertiti da Gama¹, Tummala Rama Krishna Reddy² and Maria de Nazaré Correia Soeiro¹

¹ Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

² School of Health, Sport and Biosciences, College of Applied Health and Communities, University of East London, Stratford campus, Water Lane, UK.

Table of Contents:

Table of compound purity by HPLC	PAGE 2
CYP51 inhibition data for compound 1 and Posaconazole	PAGE 3

Determination of Compound Purity by HPLC method:

HPLC was carried out using Agilent-1200 instrument. Column: Agilent eclipse plus C18 (150mm × 4.6mm, 5µm particle size), mobile phase 0.01% TFA in acetonitrile/water (5% to 95% organic over 20min at 1mL/min), 10 µL injection. Detection was at 254nm, runtime 25 min. All the samples were prepared by dissolving the 5mg of compound in 0.7 mL of d⁶-DMSO. Blank (without the compound) d⁶-DMSO was used as a reference standard.

Table 1. HPLC purity analysis of pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitor compounds.

Compound No.	Retention Times (minutes) of detectable isomers	HPLC Purity (%)
1	15.598 (major), 15.873 (minor)	99
1a	15.798 & 16.087 (major); 19.849 & 20.354 (minor)	96
1b	14.585 & 14.812 (major); 17.874 & 18.429 (minor)	96
1c	14.713 & 14.976 (major); 18.045 & 18.576 (minor)	97
1d	14.675 & 14.896 (major); 17.912 & 18.426 (minor)	97
1e	15.302 (major) & 15.562 (minor)	97
1f	15.461 & 15.800 (major); 19.600 & 20.137 (minor)	98
1g	15.468 & 15.802 (major); 19.241 & 19.572 (minor)	96
1h	13.767 & 13.53 (nearly 1:1 ratio)	77
1i	14.836 (major) & 15.015 (minor)	99
1j	14.848 (major) & 15.073 (minor)	88
1k	14.917 & 15.133 (nearly 1:1 ratio)	99
1l	14.638 (minor) & 14.839 (major)	87
1m	14.631 (minor) & 14.837 (major)	93
1n	14.640 (minor) & 14.852 (major)	84
1o	13.211 (major) & 13.459 (minor)	93
1p	13.693 (major) & 14.010 (minor)	99
1q	12.968 (major) & 13.193 (minor)	93

Table 2. Depicts the *T. cruzi* CYP51 inhibition at different tested concentrations of Compound 1 and Posaconazole.

Compound 1 Conc. (μM)	% CYP51 Activity	Posaconazole Conc. (μM)	% CYP51 Activity
0	95	0	100
0.01	89.9	0.0005	100
0.033	75.8	0.00165	98.4
0.1	49.5	0.005	92.8
0.33	0	0.0165	71.9
1	5.4	0.05	32
3.3	1.2	0.17	0
10	0	0.5	0

4 DISCUSSÃO

Os nitroderivados Nf e Bz foram introduzidos na clínica médica nas décadas 60 e 70 respectivamente, desde então têm sido empregados como únicas alternativas de tratamento para DC. Ambos apresentam maiores taxas de cura durante a fase aguda (65 – 80%) em relação a fase crônica (15 a 35%) (Molina et al., 2014; Sales-Junior et al., 2017). Além de baixa atividade durante a fase crônica tardia da doença, outros fatores limitantes ao uso de ambos nitroderivados são: longo tempo de tratamento, diversidade de efeitos adversos recorrentemente, levando ao abandono do tratamento, entre outros aspectos como idade, sistema imunológico bem como a origem geográfica do portador além da ocorrência de cepas naturalmente resistentes (Zingales et al., 2014; Chatelain, 2017). A fim de introduzir alternativas mais seguras, eficazes e mais baratas de controle desta patologia, trabalhos exploram diferentes abordagens, como por exemplo, a identificação de moléculas mais seletivas ao parasito, o desenho racional de fármacos e ainda o desenvolvimento de esquemas vacinais preventivos administrados como imunoterapia, podendo ser utilizados em portadores crônicos assintomáticos e sintomáticos visando reduzir ou evitar o desenvolvimento de complicações cardíacas/digestivas em decorrência da inflamação continuamente estimulada pela persistência do parasitismo, mesmo que em níveis subpatentes e residuais (Quijano-Hernandez & Dumonteil, 2011; Dumonteil et al., 2012). Atualmente ainda não há uma vacina disponível para DC, e, portanto, a quimioterapia é único artifício para controle desta doença negligenciada (Sales-Junior et al., 2017).

A triagem clínica BENEFIT avaliou em portadores crônicos da DC a possível eficácia do Bz em prevenir a progressão de cardiomiopatia. Este ensaio demonstrou que apesar da atividade tripanocida, este não foi capaz de prevenir a progressão das lesões, reforçando a necessidade de abordagens de tratamento mais efetivas principalmente para portadores crônicos (Morillo et al., 2015; Morillo et al., 2017).

Os inibidores da biosíntese de esteróis (IBE) têm sido sugeridos como candidatos a novos fármacos para DC por serem moléculas com potente atividade antiparasitária, tendo em vista que a inibição desta rota é letal ao parasito, e pelas particularidades quanto aos seus produtos finais, sendo o colesterol para mamíferos, e o ergosterol para fungos e tripanossomatídeos. Dois IBEs, o Pos e a pró-droga do

Rav (E1224) são utilizados no tratamento de micoses sistêmicas, tiveram sua atividade tripanocida comprovada *in vitro* e *in vivo*, e foram avaliados em recentes ensaios clínicos (Urbina et al., 1998; Urbina et al., 2003; Soeiro et al., 2013; Urbina, 2015). Mesmo exibindo excelentes resultados nos testes pré-clínicos, ambos IBEs apresentaram falha terapêutica durante os ensaios clínicos, demonstrando serem ineficazes para o tratamento da infecção crônica por *T. cruzi* sobre esquema de mono (Pos e E1224) ou terapia combinada (Pos+Bz) (Morillo et al., 2017; Bern, 2017; Pérez-Molina & Molina, 2017). A falha terapêutica de ambas triagens clínicas foi atribuída a diferentes fatores como a dose, o tempo de exposição e possivelmente a baixa homologia entre as enzimas fúngicas e de tripanosomatídeos (Lepesheva & Waterman, 2011; Molina et al., 2015; Morillo et al., 2017; Spósito, 2017). Apesar da falha dos compostos azólicos relatada acima, inibidores da biosíntese de ergosterol continuam a ser considerados candidatos promissores no cenário de buscas por agentes antiparasitários para esta patologia silenciosa. Recentemente, nosso grupo demonstrou a excelente atuação das moléculas não azólicas, VNI e VFV, com potência semelhante ao Bz *in vitro* e *in vivo* (Hargrove et al., 2012; Soeiro et al., 2013; Guedes-da-silva, 2015; Guedes-da-Silva et al., 2017).

Visando selecionar com maior sensibilidade possíveis candidatos a novos agentes antiparasitários, e tendo por base os achados da literatura, é possível identificar características necessárias que permitam avançar no fluxograma de desenvolvimento de novos fármacos para DC, como aquelas exemplificadas pelo DNDi na Tabela 1 (Target Product Profile) e na Tabela 2 e que transcrevem o perfil mínimo e o aceitável de um novo medicamento para DC assim como, as características deste produto (composto “hit” e “lead” como apresentado por Don & loset, 2014), respectivamente. Além desses filtros, estudos concentram-se na busca por metodologias mais acuradas e que auxiliem na redução das lacunas na translação entre dados pré-clínicos e clínicos tendo em vista as falhas terapêuticas do Pos e do E1224, como por exemplo, o uso de metodologias de análise de carga parasitária por ensaios de bioluminescência, que permite avaliar individualmente a eficácia de um composto ao longo da infecção em modelos murinos, por método não invasivo produzindo dados mais precisos, entre outras (Martin-Plaza & Chatelain, 2015).

Tabela 2. Critérios hit e lead de candidatos para doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset, 2014).

Hit		
Critério	Parâmetro	
Eficácia <i>in vitro</i>	Atividade Seletividade: Regras de Lipinski	EC ₅₀ ≤10µM sobre amastigotas intracelulares
	Seletividade: Regras de Lipinski	(DTU II e VI).
DPMK <i>in silico</i>	Alertas estruturais (metabolismo/reactividade/estabilidade)	Priorizar hits, mas não deve ser utilizado como critério de seleção definitivo.
Toxicidade <i>in silico</i>	Alertas estruturais	Proceder com cautela, testar o mais cedo possível para determinar a extensão do problema percebido.
Perfil químico	Rotas sintéticas favoráveis	Via sintética aceitável para o composto e/ ou análogos (<8 passos)
Lead		
Eficácia <i>in vitro</i>	Atividade	EC ₅₀ 10-20 vezes maior atividade que o Hit.
	Seletividade	Maior que o Hit (ideal: ≥50 vezes) vs células de mamíferos.
Eficácia <i>in vivo</i>		Redução de 80% da parasitemia ou não detecção de parasitos ao final do tratamento e aumento da sobrevivência (10x50 mg kg ⁻¹ p.o.)
DPMK <i>in silico</i>	Regras de Lipinski	Priorizar hits não devendo ser utilizado como critério de seleção definitivo.
DPMK <i>in vitro</i>	Estabilidade metabólica (microssomas do fígado de murinos e humano).	Estabilidade- ranking do progresso dos compostos "médio" ou "alto".
	Permeabilidade a células Caco2 ou MDCK Pgp	Ranking do progresso dos compostos "médio" ou "alto"
	Solubilidade	Valor de pH abaixo 7.4>0.01 mg mL ⁻¹
	Ligação a proteína	Só se medido problema com biodisponibilidade
	Inibição de CYP3A4	EC ₅₀ >10µM
	Estabilidade no sangue e plasma	Avaliado
DPMK <i>in vivo</i>	PK em camundongo	Exposição do camundongo 10 mg kg ⁻¹ bid ou 20 mg kg dos compostos que atingirem níveis plasmáticos acima do EC ₅₀ nas últimas 24 horas progridem no <i>in vivo</i> .
Toxicidade <i>in vitro</i>	Estruturas alerta	Ensaio relevantes (Ames, genotoxicidade, cardiotoxicidade)
Toxicidade <i>in vivo</i>		Não é tóxica em camundongo a dose única
Perfil químico	Rotas sintéticas favoráveis	Não há potenciais passivos que impeçam a síntese em escala até 1g +
	Relação estrutura-atividade (SAR)	SAR preliminar com o mínimo de 10 compostos: evitar série faltando SAR ou exibindo SAR 'flat'.

No intuito de contribuir com estudos sobre novos agentes tripanocidas, a presente dissertação analisou a ação de 18 novas moléculas inibidoras da CYP51 (1

molécula mãe e 17 análogas), e os resultados serão a seguir discutidos na sequência de dois blocos.

No primeiro bloco, para orientar a identificação de moléculas inibidoras de IBEs com características farmacocinéticas aceitáveis, foi realizada a predição por modelos matemáticos, a fim de reduzir a possibilidade de fracassos nos futuros ensaios fenotípicos de eficácia (Pereira, 2007). Utilizando alguns critérios de exclusão (ex.: obediência as regras de Lipinski como peso molecular entre 150 e 500), a partir de uma quimioteca de mais de 240.000 compostos sintetizados pela ASINEX, nosso colaborador selecionou 100 compostos que apresentavam perfil farmacológico favorável e avaliou sobre infecção *in vitro* com a cepa Silvio (DTU I) de *T.cruzi*. Cinco destes compostos foram capazes de inibir a proliferação do parasito intracelular e testados quanto ao seu teor de inibição da enzima do parasito (CYP51_{Tc}). Destes, o mais ativo (potência semelhante ao Nifurtimox) o pirazolotiazepina denominado de composto **1**, foi ainda capaz de inibir a atividade da enzima do parasito na faixa semelhante a outros IBEs já descritos na literatura e que exibem excelente atividade anti-*T.cruzi*, como o Posaconazole (Urbina et al., 1998). A seguir após análise de modelagem molecular, o composto **1** foi mais detalhadamente estudado através de ensaios fenotípicos adotando o protocolo estabelecido por Romanha e colaboradores (2010) para triagem de compostos, sendo a atividade do composto avaliada *in vitro* sobre diferentes formas e cepas do parasito. Os estudos fenotípicos revelaram que este inibidor da biossíntese do ergosterol foi capaz de reduzir consideravelmente a população parasitária atingindo sobre formas intracelulares da cepa Tulahuen (DTU VI) com valores de EC₅₀ comparáveis ao dos medicamentos referência (Bz), apresentando perfil de um composto “hit” para DC (Katsuno et al., 2015). Em seguida, foi realizado ensaio para avaliar a atividade da molécula sobre outras cepas do parasito (Y – DTU II) que apresentam moderada susceptibilidade aos fármacos de referência (Zingales et al., 2009), utilizando desta vez a outra forma relevante para infecção em mamíferos (tripomastigotas sanguíneas), em diferentes tempos de incubação (2 – 24 h). Os resultados demonstraram que no tempo de 2 h tanto o composto **1**, quanto o Bz não foram ativos (EC₅₀ > 10 µM), mas após 24 h incubação o inibidor de CYP51 exibiu efeito tripanocida similar ao Bz, com EC₅₀ de ≈4 µM, repetindo o perfil expresso nos ensaios sobre as formas intracelulares de Tulahuen e Silvio, e corroborando a hipótese que tempo de incubação prolongado pode melhorar a eficácia desses compostos (Moraes et al., 2014; Molina et al.,

2015). Assim como demonstrado para outras moléculas da classe (Urbina et al., 1998; Urbina et al., 2003), a atividade do composto sobre diferentes cepas do parasito representa importante característica que deve ser considerada em novos candidatos à fármaco para tratamento da DC (Zingales et al., 2014).

Os resultados promissores encontrados nos ensaios *in vitro* permitiram mover essa molécula para estudos *in vivo* sobre modelo murino de infecção experimental pelo *T.cruzi*. Após ensaios de toxicidade aguda para exclusão de concentrações tóxicas, a eficácia foi avaliada em camundongos machos infectados com cepa Y, que foram divididos em grupos tratados com o composto, e grupos tratados com veículo (DMSO + trapsol) e com Bz. Enquanto o Bz apresentou em sua dose ótima (100 mg/kg) 100 % de supressão da carga parasitária (no pico da parasitemia que nesse modelo corresponde ao 8º dpi), o composto **1** apresentou efeito dose resposta atingindo 30, 38 e 43% de redução da carga parasitária no pico da parasitemia nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg (por 5 dias consecutivos, após parasitemia positiva), respectivamente. Com relação a mortalidade, novamente o Bz mostrou-se superior ao inibidor de CYP51, visto ter sido capaz de manter 100% de sobrevivência, em contraposição, todos animais tratados com o composto **1** morreram. O perfil da molécula que apresentou excelente atividade sobre diferentes cepas e formas do parasito *in vitro*, demonstrando características de composto “Hit”, não foi mantido nos ensaios *in vivo*, reafirmando a necessidade de metodologias que mimetizem com mais precisão a infecção pelo parasito e também possam diminuir as lacunas na transição entre ensaios *in vitro* e *in vivo* (Chatelain & Konar, 2015).

No segundo bloco a fim de melhorar a potência do composto **1** foram realizadas otimizações desta molécula frente a pequenas modificações estruturais e com a presença de distintos substituintes, resultando na síntese de 17 (**1a** – **1q**) análogos. Os análogos foram testados sobre a cepa Tulahuen em concentração fixa correspondente ao valor do EC₉₀ do benznidazol (10-12 µM), para avaliar ação sobre as formas intracelulares de *T. cruzi*. Após este filtro inicial, apenas 5 (**1b**, **1c**, **1e**, **1f** e **1k**) dos 17 análogos testados apresentaram redução ≥ 50%, e portanto foram direcionados a ensaios utilizando concentrações crescentes dos compostos ainda sobre as formas intracelulares (cepa Tulahuen). Os cinco inibidores de CYP51 foram potentes demonstrando valores de EC₅₀ na faixa do Bz mantendo o perfil “hit” demonstrado pelo composto **1** (Katsuno et al., 2015). Quando comparados entre si destacam-se os compostos **1e** e **1f** com os menores valores de EC₅₀ (2,20 e 2,70

μM , respectivamente). A toxicidade desses compostos foi avaliada sobre células de linhagem e, somente o composto **1k** exibiu moderada toxicidade $\text{LC}_{50} \approx 50 \mu\text{M}$ e $\text{IS} \approx 5$. As demais moléculas apresentaram $\text{LC}_{50} > 90 \mu\text{M}$. Os compostos **1b**, **1c**, **1f** e **1e** apresentaram considerável IS (>38 , >19 , >36 , >50 , respectivamente). Destacamos a molécula **1e** visto sua excelente atividade sobre as formas amastigotas que resultou em um $\text{IS} \approx 50$. Baseados nos dados da relação estrutura/ atividade, a comparação entre os 5 compostos mais ativos (**1b**, **1c**, **1e**, **1f** e **1k**), permite sugerir que as moléculas com os substituintes inseridos nas posições orto- e meta- foram mais potentes em relação às moléculas compostos com substituições na posição para-, revelando que a atividade da molécula está relacionada a posição na qual é inserido o substituinte. Retornando ao fluxograma fenotípico, os cinco mais ativos sobre formas intracelulares, foram avaliados sobre tripomastigotas sanguíneas, e no tempo de 2 h não exibiram ação tripanocida assim como o Bz, com semelhante perfil também do composto **1**. No tempo de 24 h os compostos **1b**, **1c**, **1e** e **1k** não apresentaram atividade significativa sobre as formas sanguíneas. O composto **1f** foi o mais ativo alcançando valores de EC_{50} próximos ao Bz ($\approx 16 \mu\text{M}$ e $\approx 20 \mu\text{M}$ para o IBE), reforçando que os compostos inibidores CYP51 precisam de mais tempo de exposição para melhor atuar sobre o parasito após sua depleção de reservas intracelulares (Doyle et al., 2010; Moraes et al., 2014; Molina et al., 2015). Esses resultados demonstraram superior ação sobre a forma multiplicativa em relação a extracelular, corroborando dados da literatura que hipotetizam que esta diferença está relacionada a uma ação mais potente sobre as formas mais metabolicamente ativas, e portanto requerem maior produção e uso de esteróis para manutenção de membranas e para divisão celular (Urbina et al., 2003; Soeiro et al., 2013). Os ensaios de toxicidade *in vitro* mostram que os compostos **1b** e **1e** não induzem perda de viabilidade celular mesmo após incubação até $200 \mu\text{M}$. Os compostos **1c** e **1f** apresentaram toxicidade com valores LC_{50} de ≈ 93 e $66 \mu\text{M}$, respectivamente. Devido sua atividade sobre as duas cepas do parasito, e melhor perfil de seletividade e de propriedades de solubilidade, o composto **1f** foi seguida para estudos *in vivo*. Infelizmente, o composto **1f** não foi capaz de reduzir a carga parasitária dos animais infectados com a cepa Y e também não promoveu ganho de sobrevivência, enquanto Bz foi capaz de suprimir completamente a parasitemia, bem como garantir 100 % de sobrevivência dos animais tratados. Nossos resultados corroboram o trabalho de Moraes e colaboradores (2014) que revelou que os inibidores de CYP51 são menos

eficazes que os compostos nitroderivados como Bz. Apesar dos dados *in vivo* não terem sido satisfatórios, os achados *in vitro* justificam o desenho e síntese de novos IBEs visando promover potência e eficácia *in vivo* e contribuir para identificação de novos medicamentos para portadores chagásico.

5 CONCLUSÕES

➤ A partir de estudos preditivos, 100 moléculas foram selecionadas e testadas sobre *T.cruzi* (Silvio X10/7), 05 delas apresentaram ação tripanocida, sendo a pirazolo tiazepina (composto **1**) a que exibiu melhor perfil de inibição sobre a enzima e de potência fenotípica *in vitro* (distintas formas e cepas do parasito), com atividade semelhante aos fármacos de referência para a doença de Chagas (Bz e Nf)

➤ O composto **1** apresentou *in vivo* efeito dose resposta reduzindo parcialmente a parasitemia (43% de redução), porém, infelizmente não foi capaz de garantir a sobrevivência dos animais no curso da infecção experimental por *T.cruzi*.

➤ Os inibidores de CYP51 **1b**, **1c**, **1e**, **1f** e **1k** foram os mais ativos *in vitro* sobre *T.cruzi* dentre os 17 análogos do composto **1**, ressaltando a potência das moléculas **1e** e **1f** sobre amastigotas (Tulahuen), sendo similar ao Bz. Infelizmente, sobre tripomastigotas sanguíneas (cepa Y) os compostos revelaram-se menos ativos que o fármaco de referência, corroborando dados da literatura acerca da diferencial ação de IBEs sobre a forma não proliferativa do parasito (metabolicamente menos ativos) em relação às multiplicativas (metabolicamente ativas).

➤ Dados da relação estrutura/atividade revelaram que entre os 5 compostos mais ativos (**1b**, **1c**, **1e**, **1f** e **1k**), as moléculas com os substituintes inseridos nas posições *orto*- e *meta*- foram mais potentes sobre *T.cruzi* em relação aos compostos com substituições na posição *para*-, demonstrando que a atividade da molécula está relacionada à posição na qual é inserido o substituinte.

➤ O análogo **1f** que apresentou promissora atividade antiparasitária *in vitro* sobre diferentes cepas e formas do parasito, não foi capaz de suprimir a carga parasitária, bem como garantir a sobrevivência dos animais frente à infecção experimental no modelo murino.

➤ IBEs apresentam potente atividade tripanocida *in vitro* porém, parcialmente ativos ou inativos sobre infecção experimental por *T.cruzi*. A promissora ação *in vitro*

das moléculas testadas e a parcial proteção sobre infecção *in vivo* justifica a otimização e mesmo síntese de novas moléculas que possibilitem potencializar sua atividade e seletividade, bem como conferir melhores características de solubilidade para continuação de ensaios pré-clínicos visando contribuir para conhecimento e identificação de novos fármacos para tratamento dos milhões de portadores da doença de Chagas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

About Chagas disease [homepage on the Internet] Switzerland: Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). [Cited 2017 Nov 20]. Disponível em: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-disease-background/>.

Bern, C. A New Epoch in Antitrypanosomal Treatment for Chagas Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69(8):948-950. doi: 10.1016/j.jacc.2016.

Bern, C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2011; 364(26):2527-34. doi: 10.1056/NEJMct1014204.

Bern, C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015; 373 (5): 456 – 466.

Chagas, C. Nova tripanosomíaze humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909; 1:159-218.

Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9:4807-23. doi: 10.2147/DDDT.S90208

Chatelain E. Chagas disease research and development: is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J.* 2017; 14(15): 98-103. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.002

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(1): 3-24.

Coura JR, Viñas PA, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014; 109(7): 856-862.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - a comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110(3): 277-82.

De Souza W, De Carvalho TMU, and Barrias ES. Review on Trypanosoma cruzi: host cell interaction. Int. J. Cell Biol. 2010; 2010:295394. doi: 10.1155/2010/295394

Diseases & projects, completed projects [homepage on the Internet] Switzerland: Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). [2014]. Disponível em: <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/azoles-e1224/>

Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology. 2014 ;141(1):140-6. doi: 10.1017/S003118201300142X.

Doyle OS, Chen CK, Johnston JB, Hopkins SD, Leung SS, Jacobson MP, Engel JC, McKerrow JH, Podust LM. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(6):2480-8. doi: 10.1128/AAC.00281-10

Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela JG, Kamhawi S, Ortega J, de Leon Rosales SP, Lee BY, Bacon KM, Fleischer B8, Slingsby BT, Cravioto MB, Tapia-Conyer R, Hotez PJ. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. Expert Rev Vaccines. 2012; 11(9):1043-55. doi: 10.1586/erv.12.85.

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, da Silva CF, Meuser MB, Simões-Silva MR, de Araújo JS, Ferreira CG, Moreira OC, Britto C, Lepesheva GI, Soeiro Mde N. Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(12):7564-70. doi: 10.1128/AAC.01294-15

Guedes-da-Silva FH, Batista DG, da Silva CF, Meuser MB, Simões-Silva MR1, de Araújo JS, Ferreira CG, Moreira OC, Britto C, Lepesheva GI, Soeiro Mde N. Antitrypanosomal activity of sterol 14 α - demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the Swiss mouse models of Chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(4). pii: e02098-16. doi: 10.1128/AAC.02098-16.

Hargrove TY, Kim K, de Nazaré Correia Soeiro M, da Silva CF, Batista DD, Batista MM, Yazlovitskaya EM, Waterman MR, Sulikowski GA, Lepesheva GI. CYP51 structures and structure-based development of novel, pathogen-specific inhibitory scaffolds. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2012; 2:178-186.

Hoekstra WJ, Hargrove TY, Wawrzak Z, da Gama Jaen Batista D, da Silva CF, Nefertiti AS, Rachakonda G, Schotzinger RJ, Villalta F, Soeiro Mde N, Lepesheva GI. Clinical Candidate VT-1161's Antiparasitic Effect *In Vitro*, Activity in a Murine Model of Chagas Disease, and Structural Characterization in Complex with the Target Enzyme CYP51 from *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(2): 1058-66. doi: 10.1128/AAC.02287-15

Hotez PJ, Pecoul B. “Manifesto” for Advancing the Control and Elimination of Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(5): e718.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14(11):751-8. doi: 10.1038/nrd4683

Kropf S, Sá M. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos.* 2009; 6(1): 13-34.

Lepesheva GI, Hargrove TY, Rachakonda G, Wawrzak Z, Pomel S, Cojean S, Nde PN, Nes WD, Locuson CW, Calcutt MW, Waterman MR, Daniels JS,

Loiseau PM, Villalta F. VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2015; 212(9): 1439-48. doi: 10.1093/infdis/jiv228

Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, Nes WD, Hill GC, Villalta F, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chem Biol.* 2007; 14(11): 1283-93.

Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1814(1):88-93. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.06.006.

Lepesheva GI. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? *Expert Opin Drug Discov.* 2013; 8(12): 1479-89. doi: 10.1517/17460441.2013.845554.

Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015; 151:166–177.

Malafaia M, Rodrigues ASL. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. *Rev. da Soc. Brasileira de Medicina Tropical.* 2010; 43(5): 483-485.

Martin-Plaza J, Chatelain E. Novel therapeutic approaches for neglected infectious diseases. *J Biomol Screen.* 2015; 20(1):3-5. doi: 10.1177/1087057114559907.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica* 2014; 130: 167–174.

Media center – Chagas disease [homepage on the Internet] Switzerland: World Health Organization (WHO) [updated 2017 march and cited 2017 Nov 20]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014; 370(20): 1899-908. doi: 10.1056/NEJMoa1313122.

Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2015; 28(5): 397-407. doi: 10.1097/QCO.0000000000000192.

Moraes CB, Giardini MA, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, Chatelain E, Freitas-Junior LH. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep.* 2014 ;4:4703. doi: 10.1038/srep04703.

Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, Apt W, Beloscar J, Gascon J, Molina I, Echeverria LE, Colombo H, Perez-Molina JA, Wyss F, Meeks B, Bonilla LR, Gao P, Wei B, McCarthy M, Yusuf S; STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69(8): 939-947. doi: 10.1016/j.jacc.

Morillo CA. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015; 373 (14): 1295-306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574

Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* 2014; 30(6): 289-98. doi: 10.1016/j.pt.2014.04.003

Pedrique B, Strub-Wourgaft N, Some C, Olliaro P, Trouiller P, Ford N, Pécoul B, Bradol JH. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment. *Lancet Glob Health* 2013; 1: e371–79.

Pereira DG. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Química Nova*. 2007; 30(1), 171-177. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000100029>

Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2017 jun; published online [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)

Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin*. 2011; 7(11):1184-91. doi: 10.4161/hv.7.11.17016

Rassi A Jr, Marin Neto JA, Rassi Anis. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2017; 112 (3): 224-235. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160334>.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26: 275-91.

Romanha AJ, Castro SL, Soeiro Mde N, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, Bourdin B, Blum B, Olivieri B, Zani C, Spadafora C, Chiari E, Chatelain E, Chaves G, Calzada JE, Bustamante JM, Freitas-Junior LH, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Andrade SG, Armstrong T, Degraive W, Andrade Zde A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 ;105(2):233-8.

Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, Carneiro CM. Experimental and Clinical Treatment of Chagas

Disease: A Review. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(5):1289-1303. doi: 10.4269/ajtmh.16-0761

Soeiro MN, de Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. Expert Opin Ther Targets. 2009; 13(1):105-21. doi: 10.1517/14728220802623881.

Soeiro MN, Werbovets K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. Parasitology. 2013 ;140(8):929-51. doi: 10.1017/S0031182013000292.

Spósito PÁ, Mazzeti AL, de Oliveira Faria C, Urbina JA, Pound-Lana G, Bahia MT, Mosqueira VF. Ravuconazole self-emulsifying delivery system: *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes and *in vivo* toxicity. Int J Nanomedicine. 2017; 12:3785-3799. doi: 10.2147/IJN.S133708.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(8): e1749. Sanmartino, M. et al. Hablamos de Chagas: aportes para re-pensar la problemática con una mirada integral / - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: CONICET - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 2015. Libro digital

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. International Journal for Parasitology. 2001; 31: 472- 481.

Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. Antimicrob Agents Chemother. 1998 ;42(7):1771-7.

Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 21(1):27-38.

Urbina JA. Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 (1):349-55.

Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol*. 2015; 62(1): 149-56. doi: 10.1111/jeu.12184.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2009 nov; 104(7): 1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol*. 2012; 12: 240–253.

Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I; Drugs for Neglected Disease Initiative; Chagas Clinical Research Platform Meeting. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109(6):828-33.