

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DA ATOVAQUONA E DO
ASTEMIZOL PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA**

PAULA LADEIA BARROS

**Salvador – Bahia
2022**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DA ATOVAQUONA E DO
ASTEMIZOL PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA**

PAULA LADEIA BARROS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia e Saúde e Medicina Investigativa do Instituto Gonçalo Moniz (IGM) para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães
Moreira

**Salvador – Bahia
2022**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

B277a Barros, Paula Ladeia

Avaliação farmacológica de derivados da Atovaquona e do
Astemizol para o tratamento da Malária. / Paula Ladeia Barros. –
Salvador, 2022.

113 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz,
Salvador, 2022.

1. Plasmodium. 2. Malária. 3. Triagem farmacológica 4.
Atovaquon. 5. Astemizol. I. Título.

CDU 615.2

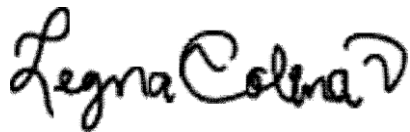
“AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE DERIVADOS DA ATOVAQUONA E DO ASTEMIZOL PARA O TRATAMENTO DA MALÁRIA”.

PAULA LADEIA BARROS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 30 de junho de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Legna Andreina Colina Vegas
Professora
UFRGS



Dra. Stefanie Costa Pinto Lopes
Pesquisadora
FIOCRUZ/MANAUS



Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

AGRADECIMENTOS

À minha família, que apesar de todas as dificuldades e anseios, esteve presente ao meu lado durante toda a trajetória.

Ao meu namorado, Paul Necochea, pelo esforço e todas as palavras de conforto que me ajudaram nos momentos de ansiedade e desespero.

Ao meu orientador, Dr. Diogo Moreira, que independente dos meus problemas pessoais, sempre se manteve forte, com todo suporte e apoio possível, me ajudando imensamente nessa caminhada.

Ao grupo Malária do LETI, que contribuiu imensamente para os resultados desse trabalho.

Ao grupo LETI, em especial Cássio, Gabriela, Renan, Larissa, Ivan, Breno, Dahara, dentre tantos outros pelo convívio e apoio durante essa jornada. Por tornarem os dias mais leves e agradáveis, mesmo diante de todas as dificuldades possíveis.

Por fim, um muito obrigada para toda a equipe da Fiocruz BA, e todos os setores que fizeram esse trabalho possível.

BARROS, Paula Ladeia. **Avaliação farmacológica de derivados da Atovaquona e do Astemizol para o tratamento da Malária.** 2022. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A malária é uma doença parasitária de evolução rápida, causada por parasitos do gênero *Plasmodium* e, como vetor, fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*. A doença pode ser manifestada como malária assintomática, não-complicada e complicada. Em 2020, houveram 241 milhões de casos e 627 mil mortes devido a malária. O tratamento convencional da doença já apresenta complicações devido a cepas resistentes, e a eficácia limitada para certos estágios evolutivos do parasito; justifica-se assim a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da malária. A atovaquona e o astemizol são duas moléculas com ação antimalárica, porém com mecanismos distintos: a atovaquona bloqueia o transporte de elétrons mitocondrial, enquanto que o astemizol presume-se que cause um bloqueio na detoxificação do heme no plasmódio. Considerando que ambos possuem atividade antimalárica, existe a possibilidade de potencializar os seus efeitos através da síntese química com metais de transição. Dessa forma, faz-se necessária a busca de novos derivados de ambas moléculas. **OBJETIVO:** Avaliar a atividade antimalárica dos fármacos atovaquona, astemizol e seus derivados. **MÉTODOS.** Os fármacos foram avaliados quanto a sua citotoxicidade *in vitro* frente as linhagens celulares J774 e HepG2, utilizando o ensaio de bioluminescência para medir a viabilidade celular após 72 h de tratamento. Já o Astemizol e seus derivados foram avaliados *in vivo* quanto a eficácia em reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevivência dos animais em camundongos Swiss Webster infectados com o *P. berghei* após o tratamento com doses entre 40 e 120 $\mu\text{mol/kg}$. A eficácia dos fármacos em reduzir a formação dos cristais de hemozoína foram quantificados, assim como a velocidade ação antiparasitária. **RESULTADOS/DISCUSSÃO:** Considerando o CC50, os derivados da atovaquona foram menos citotóxicos que a doxorrubicina, porém quando comparados a atovaquona, apenas os ATNK 1, 4 e 8 apresentaram citotoxicidade menor que seu precursor em ambas as linhagens (J774 e HepG2). Em relação ao Astemizol e seus derivados, o composto DM-253 foi capaz de reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevivência dos camundongos Swiss Webster infectados com o *P. berghei* com eficácia superior ao protótipo astemizol porém com eficácia menor que a cloroquina. Consistente com a eficácia observada com o DM-253, este foi capaz de reduzir a formação dos cristais de hemozoína no plasmódio, sugerindo que este atua na detoxificação do heme no plasmódio. Outrossim, o DM-253 apresentou uma velocidade ação antiparasitária que é relativamente mais rápido do que a atovaquona porém mais lento do que a cloroquina. **CONCLUSÃO:** Os derivados da atovaquona foram avaliados *in vitro* frente ao *P. falciparum* e os resultados mostraram que a síntese de novas moléculas da Atovaquona pode resultar em moléculas com potencial terapêutico contra a malária, tornando-se um método possível de identificar moléculas com perfil antiparasitário, com a identificação de derivados com potencial ação *in vivo*. Por outro lado, nós identificamos uma eficácia excelente *in vivo* e um perfil fenotípico de ação rápida e que envolve o bloqueio da detoxificação do heme no plasmódio para o derivado do astemizol DM-253.

Palavras-chave: *Plasmodium*. Malária. Triagem farmacológica. Atovaquona. Astemizol.

BARROS, Paula Ladeia Barros. **Pharmacological evaluation of Atovaquone's and Astemizol's derivatives for Malaria treatment.** 2022.113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2022.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Malaria is a rapidly evolving parasitic disease caused by parasites of the genus *Plasmodium* and, as a vector, female mosquitoes of the genus *Anopheles*. The disease can be manifested as asymptomatic, uncomplicated and complicated malaria. In 2020, there were 241 million cases and 627,000 deaths due to malaria. Conventional treatment of the disease already has complications due to resistant strains and a limited efficacy for certain evolutionary stages of the parasite, which justifies the research and development of new drugs for the treatment of malaria. Atovaquone and astemizole are two molecules with antimalarial action, but with different mechanisms: atovaquone blocks mitochondrial electron transport, while astemizole is presumed to block the detoxification of heme in plasmodium. Considering that both have antimalarial activity, there is the possibility of potentiating their effects through chemical synthesis with transition metals. Therefore, it is necessary to search for new derivatives of both molecules. **OBJECTIVE.** To evaluate the antimalarial activity of the drugs atovaquone, astemizole and their derivatives. **METHODS.** The drugs were evaluated for their in vitro cytotoxicity against J774 and HepG2 cell lines, using the bioluminescence assay to measure cell viability after 72 hours of treatment. Astemizole and its derivatives were evaluated in vivo for their efficacy in reducing parasitemia and increasing animal survival in Swiss Webster mice infected with *P. berghei* after the treatment with doses between 40 and 120 $\mu\text{mol/kg}$. The effectiveness of the drugs in reducing the formation of hemozoin crystals was quantified, as well as the speed of antiparasitic action. **RESULTS/DISCUSSION.** Considering CC50, atovaquone derivatives were less cytotoxic than doxorubicin, but when compared to atovaquone, only ATNKs 1, 4 and 8 showed lower cytotoxicity than their precursor in both strains (J774 and HepG2). Regarding Astemizole and its derivatives, the compound DM-253 was able to reduce parasitemia and increase the survival of Swiss Webster mice infected with *P. berghei* with superior efficacy to the prototype astemizole but with less efficacy than chloroquine. Consistent with the efficacy observed with DM-253, it was able to reduce the formation of hemozoin crystals in the plasmodium, suggesting that it acts in the detoxification of heme in the plasmodium. Furthermore, DM-253 showed a speed antiparasitic action that is relatively faster than atovaquone but slower than chloroquine. **CONCLUSION.** The atovaquone derivatives were evaluated in vitro against *P. falciparum* and the results showed that the synthesis of new atovaquone molecules can result in molecules with therapeutic potential against malaria, becoming a possible method to identify molecules with an antiparasitic profile, with the identification of derivatives with potential in vivo action. On the other hand, we have identified excellent in vivo efficacy and a fast-acting phenotypic profile that involves blocking *Plasmodium* heme detoxification for the astemizole derivative DM-253.

Keywords: Plasmodium. Metal complexes. Malaria. Pharmacological screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Incidência da transmissão da malária no mundo.	13
Figura 2	Esquematização do mecanismo de ação da Atovaquona.	17
Figura 3	Estrutura química da Atovaquona e do derivado rutênio-atovaquona desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisas.	18
Figura 4	Esquematização do mecanismo de ação da detoxificação do heme no plasmódio e do bloqueio com o Astemizol neste processo. I = anéis; II – trofozoítos; III – esquizontes.	20
Figura 5	Estrutura química do Astemizol e dos derivados MK-MD-24 e DM-253. CHO = linhagem de células epiteliais de ovário de hamster chinês. NF54 = cepa do <i>P. falciparum</i> sensível à Cloroquina. I.S. = índice de seletividade.	21
Figura 6	Estruturas químicas dos complexos metálicos contendo a Atovaquona (Ato), seus códigos, fórmula química e classificação do complexo metálico quanto a esfera de coordenação.	25
Figura 7	Avaliação do derivado do Astemizol DM-253 no protocolo de Peters de supressão da malária em roedores.	35
Figura 8	Avaliação do derivado do Astemizol DM-253 em reduzir a parasitemia em camundongos Swiss Webster machos (n=4/grupo) infectados com a cepa <i>P. berghei</i> -GFP.	38
Figura 9	Avaliação do derivado do Astemizol DM-253 em reduzir a formação de cristais de hemozoína em camundongos Swiss Webster machos (n=4/grupo) infectados com a cepa <i>P. berghei</i> -GFP.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Citotoxicidade da Atovaquona e seus derivados frente as linhagens de macrófagos murino J774 e hepatocarcinoma humano HepG2 e a atividade antimalárica Atovaquona e seus derivados frente as cepas CQ-sensível (3D7) e CQ-resistente (W2) do <i>P. falciparum</i>	31
Tabela 2	Citotoxicidade e índice de seletividade dos derivados da Atovaquona em fases intraeritrocíticas do <i>P. falciparum</i>	32
Tabela 3	Citotoxicidade do Astemizol e seus derivados frente a linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2.	34
Tabela 4	Sumário da atividade in vivo do Astemizol e derivados em modelo murino de infecção em camundongos Suíços infectados pelo <i>P. berghei</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Do inglês: <i>Adenosine TriPhosphate</i>
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% da população celular
DMSO	Dimetilsufóxido
h	Hora
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
SBF	Soro bovino fetal
WHO	Do inglês: <i>World Health Organization</i>
μL	Microlitro
μM	Micromolar
° C	Grau Celcius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	A MALÁRIA	14
2.2	DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS: A ATOVAQUONA	16
2.3	DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS: ASTEMIZOL	19
3	HIPÓTESE E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	OBJETIVO GERAL	23
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	FÁRMACOS E COMPOSTOS QUÍMICOS	24
5.2	DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE CÉLULAS MURINAS	25
5.3	CRESCIMENTO PARASITÁRIO DE CEPAS DO P. FALCIPARUM	26
5.4	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA IN VITRO DOS COMPOSTOS DA ATOVAQUONA	26
5.5	AVALIAÇÃO DA HEMÓLISE DOS COMPOSTOS DA ATOVAQUONA	27
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA IN VIVO DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL	27
5.7	AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA IN VIVO DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL	28
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE CRISTAIS DE HEMOZOÍNA	29
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6	RESULTADOS	31
6.1	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS DAS ATOVAQUONA FRENTE CÉLULAS DE MAMÍFEROS	31
6.2	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL	33
6.3	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL NA VELOCIDADE DE AÇÃO DE REDUÇÃO DA PARASITEMIA	37
7	DISCUSSÃO	40
8	CONCLUSÃO	43
9	REFERÊNCIAS	44
10	ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A malária consiste em uma doença parasitária de evolução rápida e potencialmente fatal que possui como agente etiológico protozoários do gênero *Plasmodium* e, como vetor, fêmeas dos mosquitos do gênero *Anopheles*. Entre as espécies causadoras da malária humana, podemos citar *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo essa última a causadora da forma mais severa da malária (BRASIL, 2020a; MERCK SHARP; DOHME CORP., 2020; PAMELA LANG, 2020; WHO, 2020a).

Encontrada em áreas tropicais e subtropicais (**Figura 1**), a malária é dependente de fatores climáticos, como umidade e temperatura, para que completem o ciclo no mosquito e passem a ser transmitida (UNITED STATES, 2020a).

O ciclo da malária é dito heteroxênico, devido a inclusão de mais de um hospedeiro (um intermediário e um definitivo) para que se complete. No hospedeiro intermediário, no caso em humanos, o ciclo é dividido em dois períodos diferentes: o ciclo exoeritrocítico, onde ocorrem os estágios no fígado e o ciclo eritrocítico, que ocorrem nas hemácias (MERCK SHARP & DOHME CORP., 2020; UNITED STATES, 2020b).

Durante o repasto sanguíneo do vetor, os esporozoítos inoculados passam por formas como esquizonte e merozoíto, esse último infectando os eritrócitos. Após o rompimento das hemácias, novos merozoítos são liberados, sendo esse a forma de relevância clínica, pois são responsáveis pela manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado.

A malária pode ser dividida em três categorias quando relacionados aos seus sintomas: a malária assintomática, a não-complicada e a complicada, onde pode apresentar variações de acordo com a espécie. As manifestações clínicas da doença ocorrem durante o paroxismo malárico, que iniciam-se após um ciclo completo do estágio eritrocítico e, caso a doença não seja identificada e tratada rapidamente, o quadro tende a agravar e torna-se possivelmente fatal (UNITED KINGDOM, 2020; WHO, 2020a).

Em 2020, houve 241 milhões de casos e 627 mil mortes devido a malária. Além dos números alarmantes, a taxa de incidência aumentou em comparação ao ano de 2010 nas regiões Mediterrâneo Ocidental e Américas, onde a última teve o aumento considerado moderado (WHO, 2019; BRASIL, 2020a; WHO, 2020b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

A alta taxa de mortalidade está associada à gravidade da doença e a resistência do parasito frente ao tratamento atualmente utilizado na clínica, como a cloroquina e mefloquina, tornando o tratamento defasado e ineficaz, o que motiva a busca de novas moléculas com potencial antiparasitário (UNITED STATES (US), 2019).

O estudo em desenvolvimento objetiva avaliar o potencial antimalárico de novos compostos derivados da Atovaquona e do Astemizol, com o intuito de identificar possíveis novos fármacos mais seguros e eficazes do que os utilizados na terapêutica atual. Para tal, será aplicado um ensaio de luminescência para triagem dos compostos em células e em estágios sexuais (gametócitos) e assexuais (esquizontes) do *P. falciparum*. Os compostos mais promissores em termos de potência e seletividade foram testados *in vivo* no modelo experimental de malária em animais infectados com o *P. berghei*.

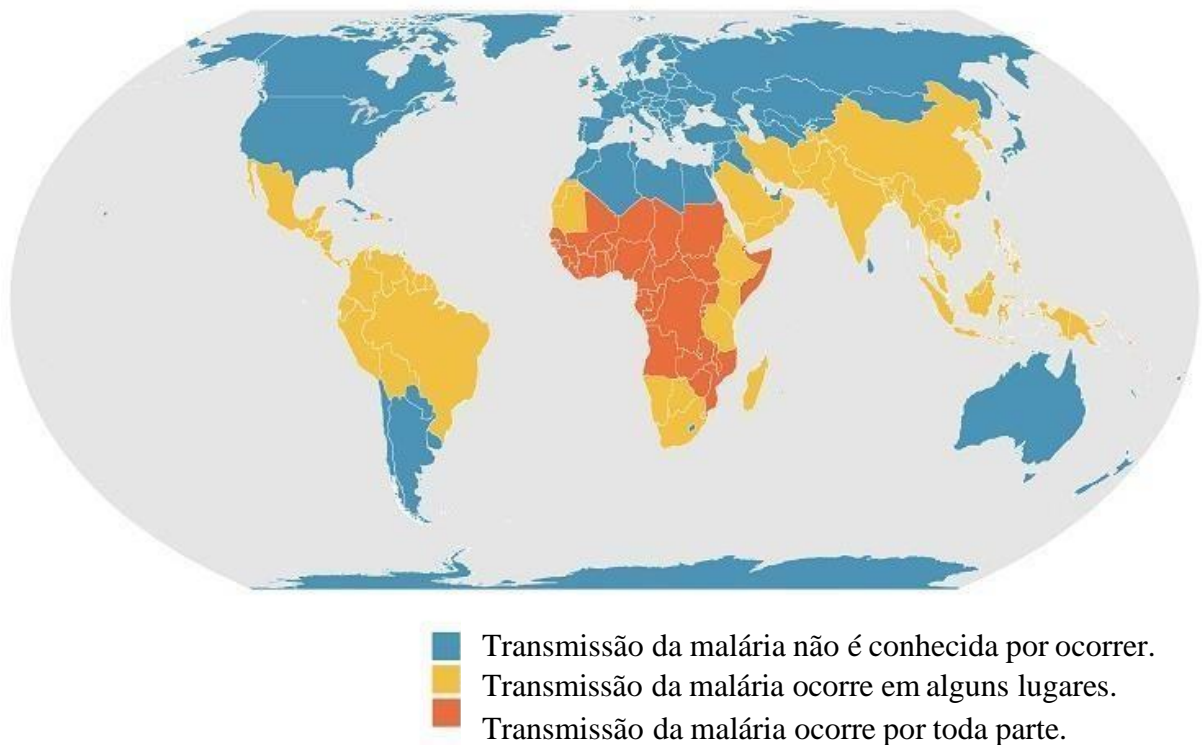


Figura 1 – Incidência da transmissão da malária no mundo.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2019).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A MALÁRIA

A malária, doença parasitária que possui como agente etiológico os protozoários do gênero *Plasmodium*, consiste em uma doença infecciosa febril aguda, de evolução rápida e potencialmente fatal, que afeta principalmente o fígado e as hemácias do hospedeiro humano. Seu vetor e hospedeiro definitivo são as fêmeas dos mosquitos hematófagos do gênero *Anopheles*. Entre as espécies causadoras da malária humana, podemos citar *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo os dois últimos as espécies mais comuns que são encontradas nos pacientes e o *P. falciparum* o principal causador da forma mais severa da malária (BRASIL, 2020a; MERCK SHARP; DOHME CORP., 2020; MMV, 2020; PAMELA LANG, 2020; WHO, 2020a).

O ciclo da malária é dito heteroxênico, devido a inclusão de mais de um hospedeiro (um intermediário e um definitivo) para que se complete. Em humanos, o ciclo é dividido em dois ciclos diferentes: inicialmente, o ciclo exoeritrocítico, onde ocorrem os estágios no fígado; e em seguida, o ciclo eritrocítico, onde ocorrem os estágios nos eritrócitos (MERCK SHARP; DOHME CORP., 2020; UNITED STATES, 2020b).

No ciclo exoeritrocítico, ocorre a inoculação dos esporozoítos durante o repasto sanguíneo do vetor, que infectam as células do fígado, onde amadurecem para a forma esquizonte. Vale ressaltar que existe o hipnozoíto, um estágio pouco ativo que o *P. vivax* e o *P. ovale* possuem durante a infecção dos hepatócitos (SCHÄFER et al., 2021), podendo persistir nas células (caso não tratado), onde poderá reativar, replicar e vir a se formar em esquizontes e causar a reinfecção semanas ou anos após a inoculação do parasito. Após o amadurecimento, os esquizontes se rompem, liberando os merozoítos em formas de vesícula para o sangue, onde se rompem e infectam os eritrócitos, dando início ao ciclo eritrocítico.

No ciclo eritrocítico, ocorre a multiplicação assexuada do parasito. Após infecção dos eritrócitos, os merozoítos amadurecem para trofozoítos imaturos (estágio em anel), que se diferenciam em duas formas diferentes: trofozoítos maduros e gametócitos. Quando se diferenciam para trofozoítos maduros, eles amadurecem para esquizontes que rompem os eritrócitos liberando os merozoítos, infectando novas hemácias e reiniciando o ciclo eritrocítico. No momento da ruptura dos eritrócitos ocorre o paroxismo malárico, onde as manifestações clínicas da doença ocorrem. O período do início da infecção dos eritrócitos até a sua ruptura é variável entre 48 à 72 horas, alterando de acordo com a espécie causadora da doença. Em

relação a diferenciação em gametócitos (início do estágio sexual do parasito), os microgametócitos (masculinos) e macrogametócitos (femininos) são ingeridos pelo mosquito fêmea do *Anopheles* durante o repasto sanguíneo, dando início ao ciclo esporogônico.

O ciclo esporogônico ocorre no vetor, onde os gametas masculinos e femininos passam por amadurecimento e, ao final do ciclo, os parasitos, na forma de esporozoítos, migram para a glândula salivar do mosquito para que, no repasto sanguíneo, possa ter um novo ciclo da malária (JOSLING; LLINÁS, 2015).

A malária possui três categorias quando relacionados aos seus sintomas: a malária assintomática, a não-complicada e a complicada (MMV, 2020). As manifestações clínicas da doença ocorrem durante o paroxismo malárico, no estágio sanguíneo do parasito, onde sintomas como febre, calafrios, dores de cabeça e astenia podem ser observados. Esses sintomas não específicos caracterizam principalmente a malária não-complicada. É válido ressaltar que a depender da espécie que infectou o hospedeiro, os sintomas podem apresentar mudanças (PRADO et al., 2014; UNITED KINGDOM 2020; WHO, 2020a).

A malária não-complicada pode desenvolver para a complicada caso não haja o tratamento adequado em tempo viável. Causada principalmente pelo *P. falciparum*, os principais sintomas da malária complicada são a anemia grave, complicações pulmonares, malária cerebral e o coma. Normalmente está associada ao aumento da mortalidade e hiperparasitemia (MMV, 2020; WICHT; MOK; FIDOCK, 2020).

Em alguns casos, o paciente não possui sintomas, sendo identificados por exames sanguíneos e diagnóstico molecular, caracterizando a malária assintomática. Apesar de não haver sintomas, o paciente assintomático se torna um problema de saúde pública por ser um potencial reservatório com parasitos, a partir do momento que o mesmo não realiza o tratamento (SUMARI et al., 2017).

De acordo com o World Health Organization (WHO) em 2020, houveram 241 milhões de casos e 627 mil mortes devido a malária. A maior morbidade é encontrada na região Africana, com 228 milhões de casos (94,6%), seguido pelo Mediterrâneo Oriental, 5.7 milhões (2,4%), Sudeste da Ásia, 5 milhões (2,1%), Pacífico Ocidental, 1.705 milhões e as Américas com 653 mil casos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Além dos números alarmantes, a taxa de incidência aumentou em comparação ao ano de 2010 nas regiões Africanas e Mediterrâneo Oriental, onde a última teve o aumento considerado moderado (WHO, 2019). No Brasil, os casos são concentrados na região Amazônica, que englobam os estados do Tocantins, Roraima, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Maranhão, Amazonas, Acre e Amapá (BRASIL, 2020b). Os outros estados e o Distrito Federal compõem a região extra-Amazônica que, apesar

do baixo índice de notificações, não pode ser negligenciada, devido à alta taxa de letalidade (BRASIL, 2020b).

Os tratamentos atualmente utilizados na clínica, fármacos à base de quinolinas, como a cloroquina e mefloquina, são a primeira linha de tratamento. Alguns problemas estão associados à utilização desses compostos, como a resistência do parasito frente ao atual tratamento e o agravamento da doença, tópicos que se correlacionam com a alta taxa de mortalidade. Dessa forma, o tratamento torna-se defasado e ineficaz, o que motiva a procura de novas substâncias com potencial antimalárico (UNITED STATES, 2019).

2.2 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS: A ATOVAQUONA

Apesar de fármacos antimaláricos já serem bem estabelecidos no mercado e possuírem bons resultados, já foram identificadas cepas de *P. falciparum* resistentes ao tratamento usual e, devido à resistência, o tratamento torna-se ineficaz, agravando a doença (UNITED STATES, 2019). Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes contra o parasito (resistentes ou não), que possuam atividade profilática, de toxicidade baixa ao paciente e de baixo custo, é necessário.

A Atovaquona é um fármaco pertencente à classe das naftoquinonas que possui amplo espectro de ação frente a doenças infecciosas. Dentre algumas delas, podemos citar atividade antifúngica e antiprotozoária, quando combinado com Proguanil para tratamento e, principalmente, profilática da Malária; e quando combinado com Azitromicina para tratamento da Babesiose (BAGGISH; HILL, 2002; PubChem, 2005; LiverTox, 2012; ChEBI, 2017). Porém, a Atovaquona, quando utilizada como monoterapia, possui algumas limitações como baixa solubilidade (BAGGISH; HILL, 2002; NIXON et al., 2013), absorção oral baixa (GNANADESIGAN et al., 2019), efeitos colaterais indesejados (LiverTox, 2012; NIXON et al., 2013; MedlinePlus, 2017; WebMD, 2020) e contraindicação em alguns casos (CDC, 2018). Mais especificamente, a Atovaquona é uma hidroxinaftoquinona, estruturalmente semelhante a ubiquinona, que tem seu mecanismo de ação inibindo seletivamente o transporte de elétrons na mitocôndria no complexo citocromo *bc1* (**Figura 2**). Tal inibição resulta na perda da função mitocondrial do parasito, já que este processo ocorre no estágio proliferativo do plasmódio, tais como os estágios sanguíneo assexuado, estágios hepáticos (esporozoítos) e no hospedeiro invertebrado, sendo essa função importante e crucial para sobrevivência.

Durante o estágio eritrocítico, a mitocôndria tem como principal função o fornecimento de orotato para síntese de pirimidina através da atividade da diidroorotato desidrogenase

(DHODH). Por se assemelhar estruturalmente com a ubiquinona, a Atovaquona acaba por inibir o complexo *bc1* do parasito, tendo como alvo o compartimento de oxidação do ubiquinol(Q0) (SIREGAR et al., 2015). Conseqüentemente, o complexo *bc1* é bloqueado, resultando na inibição de metabólitos necessários para a síntese da pirimidina, uma molécula essencial ao parasito (MATHER et al., 2005; PAINTER et al., 2007).

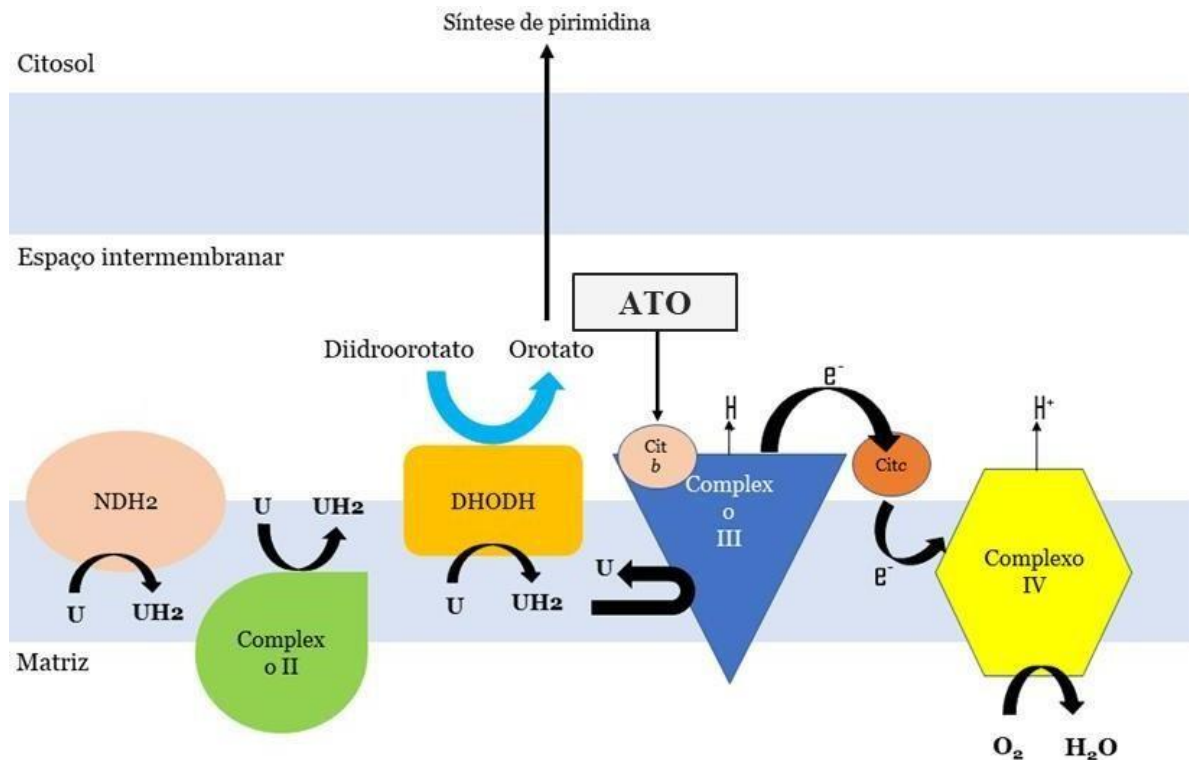


Figura 2 – Esquemática do mecanismo de ação da Atovaquona.
Fonte: Adaptado de Sousa (2020).

Considerando as informações citadas acima, reforça-se que ao mesmo tempo que a Atovaquona possui um grande potencial antimalárico – principalmente por possuir ação antimalárica frente aos estágios evolutivos que as quinolinas Cloroquina e Mefloquina não possuem, isto é, estágios hepáticos (esporozoítos) e no hospedeiro invertebrado (AZEVEDO et al., 2017), o requerimento da Atovaquona de ser utilizado em terapia com o Proguanil, além dos problemas de toxicidade e solubilidade, denotam que o desenvolvimento de novos fármacos derivados da Atovaquona é necessário.

Desde 2009, nosso grupo vem trabalhando com o planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades de fármacos anti-*P. falciparum* (BAHL et al., 2010; MOREIRA et al., 2015; FU et al., 2016; MACEDO et al., 2016). Dentre as classes de moléculas com potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos, os compostos de

coordenação com metais de transição apresentam atividades terapêuticas (SÁNCHEZ-DELGADO et al., 1996; MARTÍNEZ et al., 2009; GLANS et al., 2012; SUPAN et al., 2012).

Na química medicinal, um complexo de coordenação consiste em um átomo metálico de transição, circundado quimicamente por moléculas orgânicas ou inorgânicas, conhecidas como ligantes. Metais de transição são comumente usados complexados com moléculas com a finalidade de potencializar seus efeitos farmacológicos. Tem-se como exemplos clássicos a Cisplatina, a Carboplatina e o Glucantime (ZHANG; LIPPARD, 2003; DUNCAN; WHITE, 2012; CLAVEL et al., 2015; FARRELL, 2015). O complexo metálico pode apresentar maior solubilidade em água, coeficiente de partição mais adequado, aumento da biodisponibilidade oral, proteção metabólica ou ganho de afinidade pelo receptor. Classicamente, o ligante utilizado é uma molécula sintética contendo par de elétrons livres, tais como nitrogênio, enxofre ou fósforo. Dentre os metais de transição comumente estudados na química bioinorgânica, o cobre e o zinco se tornam adequados do ponto de vista químico-farmacêutico para o desenvolvimento de fármacos. Esta descoberta abriu a hipótese que complexos de zinco e cobre com outros antimaláricos poderiam melhorar suas propriedades farmacológicas (IRVING; WILLIAMS, 1953; MESHNICK et al., 1990; SAKURAI et al., 2002; ZHANG; LIPPARD, 2003; DUNCAN; WHITE, 2012; O. O. OGUNLANA, 2012; HUBIN et al., 2014; ARISE et al., 2017).

A escolha da Atovaquona como ligante para preparação de complexos metálicos deve-se ao seu amplo espectro de ação antiparasitária (BAGGISH; HILL, 2002; PubChem, 2005; LiverTox, 2012; ChEBI, 2017), tornando-a uma molécula de interesse e uma candidata à ligante dos metais de transição citados anteriormente.



Atovaquona

CI₅₀ = 1,2±0,1 nM (cepa 3D7, *P. falciparum*)
 CC₅₀ = 27800±800 nM (HEPG2)
 I.S. = 19142

Rutênio-Atovaquona. Fórmula: [RuCl(terpy)(Ato)]PF₆

CI₅₀ = 12 ± 0,7 nM (cepa 3D7, *P. falciparum*)
 CC₅₀ = 30000 nM (HEPG2)
 I.S. = 6666

Figura 3 – Estrutura química da Atovaquona e do derivado rutênio-atovaquona desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisas. HEPG2 = linhagem de células hepatocarcinoma humano. 3D7 = cepa do *P. falciparum* sensível à Cloroquina. I.S. = índice de seletividade.

Fonte: Dados extraídos de Sousa (2021).

Na **Figura 3**, nós apresentamos os resultados do potencial antiplasmodial de complexos metálicos baseados em rutênio-atovaquona que foram recentemente desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar/São Paulo) e da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/Minas Gerais) (SOUSA, 2021). Os resultados mostraram que a conjugação do rutênio à Atovaquona resultou em um composto com potência maior frente ao estágio intraeritrocítico do *P. falciparum* quando comparado à Atovaquona, e com baixa toxicidade frente às células de mamíferos (HEPG2 e J774) e com seletividade alta para o parasito similares ao seu precursor. No entanto, nos ensaios *in vivo* usando o modelo de camundongos infectados pelo *P. berghei*, o derivado rutênio-atovaquona exibiu eficácia superior a Cloroquina em inibir a parasitemia e aumentar a sobrevivência dos animais, porém exibiu eficácia inferior a Atovaquona, denotando assim a necessidade investigar novas variantes de complexos metálicos contendo a Atovaquona na sua composição.

Dessa forma, novos compostos derivados da Atovaquona foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa liderado pela Prof^a. Maribel Navarro do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG, Brasil) para realização de novos experimentos e investigação do potencial antimalárico.

2.3 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS: ASTEMIZOL

O Astemizol (AST) é um fármaco antialérgico da classe química dos benzoimidazol no qual possui a classe farmacológica como fármaco anti-histamínico não-sedativo. Em 2006, pesquisadores da Universidade Johns Hopkins (Baltimore, Maryland, EUA) identificaram o AST como um fármaco com atividade antimalárica potente frente ao estágio sanguíneo assexuado do *P. falciparum*, inclusive frente a cepas resistentes a Cloroquina. Além disso, o tratamento com o AST foi capaz de reduzir a parasitemia em camundongos infectados pelo *P. vinckeii* (CHONG et al., 2006). Embora o AST possua potencial antimalárico, o uso do mesmo como fármaco antialérgico foi interrompido em diversos países devido ao risco de induzir problemas cardíacos (CATALDI et al., 2019).

A literatura indica que o Astemizol atua inibindo a detoxificação do heme, processo em que o parasito utiliza o heme livre para a formação dos cristais de hemozoína (**Figura 4**), substrato esse que não é tóxico para o parasito (DE VILLIERS; EGAN, 2021). Esse mecanismo de ação se difere dos fármacos já utilizados na clínica, como a Cloroquina, contribuindo para a utilização do Astemizol como terapia conjunta com outros fármacos que

possuam mecanismos de ação diferentes, como a Atovaquona.

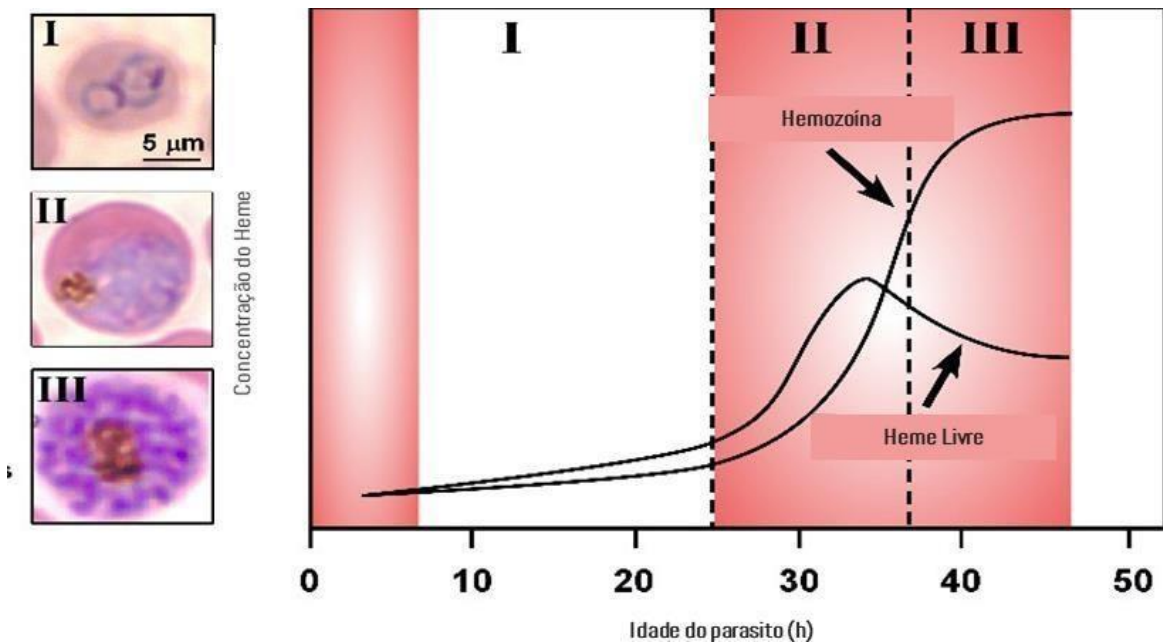


Figura 4 – Esquematização do mecanismo de ação da detoxificação do heme no plasmódio e do bloqueio com o Astemizol neste processo. I = anéis; II – trofozoítos; III – esquizontes. Ao passo que o parasito cresce, ocorre a digestão da hemoglobina e a liberação do heme livre. O heme livre é então convertido nos cristais de hemozoína. A conversão do heme livre em cristais de hemozoína é o principal evento da detoxificação do heme no plasmódio. O bloqueio com o Astemizol neste processo pode se dar ao passo que o Astemizol se liga ao heme ou aos cristais de hemozoína, impedindo as etapas subsequentes.

Fonte: Elaboração da autora

Diante do exposto acima, esforços têm sido realizados desde então na tentativa de identificar derivados do AST desprovidos de efeito cardiotoxico ao mesmo tempo que aumentar a potência e a eficácia da classe química do AST como antimalárico (MUSONDA et al., 2009; ROMAN; CRANDALL; SZAREK, 2013; TIAN et al., 2017). Dentre estes esforços, cabe-se aqui destacar o trabalho realizado por pesquisadores da Universidade da Cidade do Cabo (África do Sul), no qual mapearam os grupos químicos responsáveis pela atividade antimalárica, ao mesmo tempo que identificaram variantes químicas do AST desprovidos de efeito cardiotoxico (KUMAR et al., 2019). Este trabalho culminou com a identificação de dois derivados do AST, denominados MK-DM-24 e DM-253. Na **Figura 5**, nós apresentamos os resultados do potencial antiplasmodial dos derivados otimizados do AST, as moléculas MK-DM-24 e DM-253, nos quais exibiram potência frente ao estágio assexuado e sexuado do *P. falciparum*, com citotoxicidade baixa frente às células de mamíferos e com seletividade alta para o parasito.

Estudos de mecanismo de ação frente ao plasmódio indicam que tanto o AST quanto seus derivados otimizados MK-DM-24 e DM-253 atuam como inibidores da formação dos cristais de hemozoína, bloqueando o processo de detoxificação do heme, um processo vital para a sobrevivência do plasmódio (DE VILLIERS; EGAN, 2021).

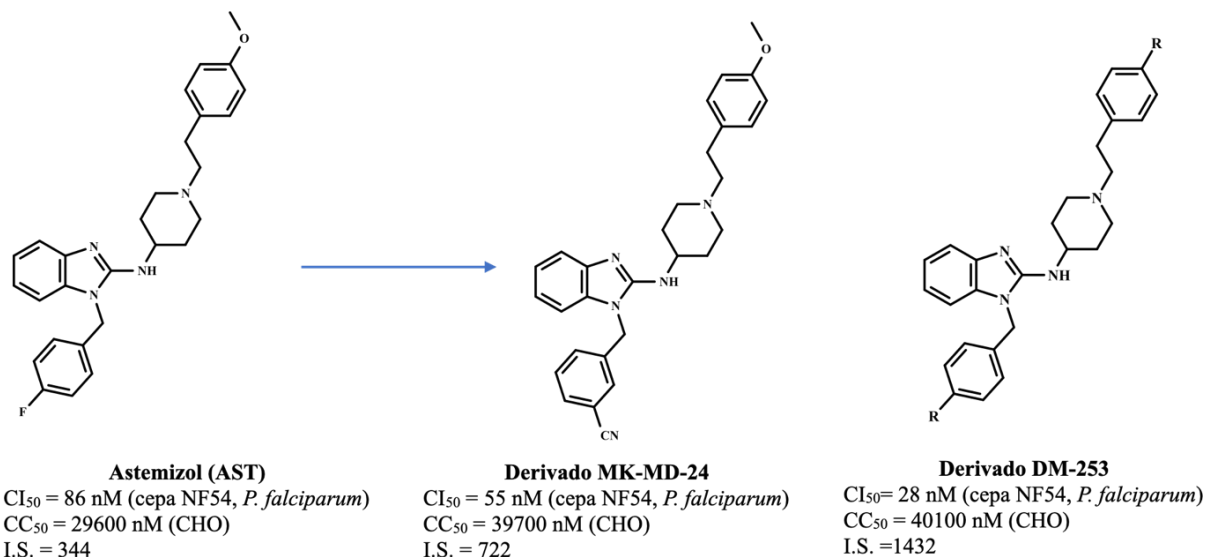


Figura 5 – Estrutura química do Astemizol e dos derivados MK-MD-24 e DM-253. CHO = linhagem de células epiteliais de ovário de hamster chinês. NF54 = cepa do *P. falciparum* sensível à Cloroquina. I.S. = índice de seletividade.

Fonte: Dados extraídos de Kumar et al. (2019).

Embora apresentem um potencial antimalárico *in vitro*, pouco se sabe ainda sobre a eficácia do tratamento tanto do AST quanto seus derivados otimizados MK-DM-24 e DM-253 no modelo experimental de malária em roedores, denotando assim a necessidade investigar a eficácia destes compostos no modelo experimental de malária em roedores.

Dessa forma, novos compostos derivados da Atovaquona foram desenvolvidos pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Kelly Chibale do Departamento de Química da Universidade da Cidade do Cabo (Cidade do Cabo, África do Sul).

3 HIPÓTESE E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Dado o exposto acima, pesquisas que propõem o desenvolvimento e descobertas de novos fármacos que possam ser implementadas na terapia contra a malária são de importância no combate desta doença.

Tanto a Atovaquona quanto o Astemizol possuem grande potencial terapêutico na malária. Em comum, ambos possuem ação frente a múltiplos estágios do ciclo evolutivo do plasmódio, uma característica no qual a Cloroquina e a Mefloquina são desprovidas.

No caso da Atovaquona, a hipótese é a identificação de novos derivados menos susceptíveis ao rápido processo de indução a resistência ao fármaco Atovaquona quando usado como monoterapia. Vislumbra-se a identificação de derivados da Atovaquona que atuem no alvo farmacológico da Atovaquona mas possivelmente interagindo com outros sítios ativos do complexo *bc1* do plasmódio, ampliando o bloqueio do complexo *bc1* do plasmódio impedindo o rápido processo de indução a resistência ao fármaco Atovaquona. Sendo assim, neste trabalho planeja-se realizar uma triagem de complexos metálicos da Atovaquona, investigando diferentes composições químicas, a fim de identificar possíveis derivados otimizados da Atovaquona.

No caso do Astemizol, a hipótese é a comprovação da eficácia antimalárica em modelos experimentais de infecção pelo plasmódio dos derivados MK-DM-24 e DM-253 menos susceptíveis a exibirem efeitos cardiotoxicos do Astemizol. Sendo assim, neste trabalho planejou-se realizar o estudo farmacológico do tratamento tanto do Astemizol quanto dos derivados MK-DM-24 e DM-253 no modelo de supressão da parasitemia de Peters usando camundongos infectados pelo *P. berghei*, a fim de comparar a eficácia do tratamento e superioridade dos derivados em relação ao fármaco protótipo Astemizol.

Por fim, os tratamentos antimaláricos utilizados atualmente são através de terapia combinada, onde mais de um fármaco é utilizado para o tratamento. Por tanto, a utilização de dois fármacos com mecanismos de ação diferentes pode contribuir para um tratamento mais eficaz. Dessa forma, a análise dos derivados do Astemizol e Atovaquona para possível terapia combinada, se tornam necessários.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Triar e avaliar a possível ação farmacológica de novas substâncias potencialmente úteis ao tratamento da malária.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antiparasitária *in vitro* frente ao *P. falciparum* e dicitotoxicidade em células murinas da Atovaquona e derivados;
- Triar, dentre os derivados da Atovaquona, os mais potentes para posterior estudo da comprovação da eficácia em suprimir a parasitemia em camundongos infectados com o
- *P. berghei*;
- Avaliar o perfil farmacológica do Astemizol e derivados em suprimir a parasitemia em camundongos infectados com o *P. berghei*;
- Avaliar o perfil farmacológica do Astemizol e derivados em suprimir o processo de detoxificação do heme em camundongos infectados com o *P. berghei*;
- Contribuir com a descoberta de novos antiparasitários provenientes da Atovaquona e contribuir com entendimento do perfil farmacológica do Astemizol.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 FÁRMACOS E COMPOSTOS QUÍMICOS

A Atovaquona (número catálogo PHR1591) foi adquirida pela Sigma-Aldrich (San Louis, Missouri, EUA). O Astemizol (número catálogo AAJ60339-MF) foi adquirido pela VWR International (Radnor, Pensilvânia, EUA). O cloridrato de doxorubicina (Glenmark Pharmaceuticals Ltd., Maharashtra, Índia) foi utilizado como controle positivo nos testes de citotoxicidade, diluído de forma seriada a partir de 80 μ M. Os derivados da Atovaquona foram sintetizados pelo grupo de pesquisa liderado pela Prof^a. Maribel Navarro do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (MG, Brasil). Os derivados do Astemizol foram sintetizados pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Kelly Chibale do Departamento de Química da Universidade da Cidade do Cabo (Cidade do Cabo, África do Sul).

Todos os compostos foram fornecidos após caracterização química e com grau de pureza superior a 95%. Na **Figura 5**, nós apresentamos as estruturas químicas dos derivados do Astemizol. Na **Figura 6**, nós apresentamos as estruturas químicas dos derivados da Atovaquona.

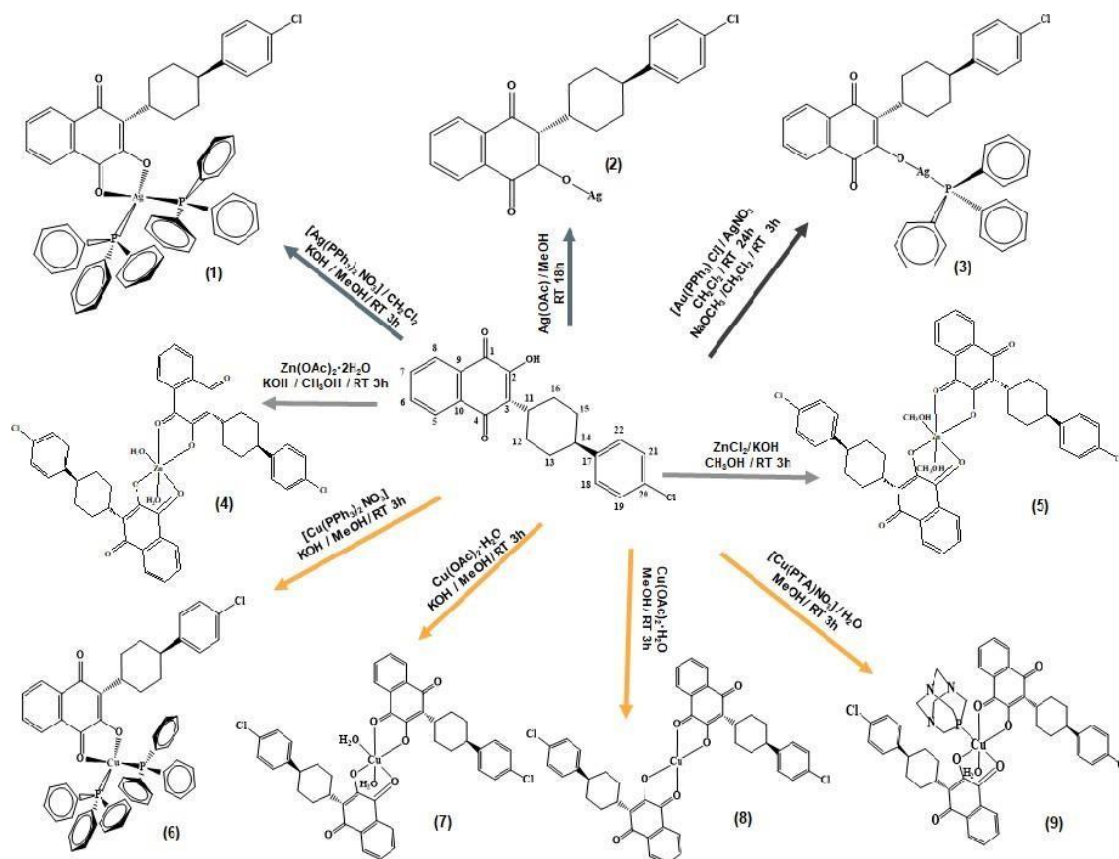


Figura 6 – Estruturas químicas dos complexos metálicos contendo a Atovaquona (Ato), seus códigos, fórmula química e classificação do complexo metálico quanto a esfera de coordenação.

Fonte: Elaboração autora

5.2 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE FRENTE CÉLULAS MURINAS

A concentração citotóxica para 50% das células (CC50) foi obtida em ensaios utilizando as linhagens de macrófagos murinos J774 e de hepatocarcinoma humano HepG2. As duas linhagens foram plaqueadas separadamente em placas brancas de fundo transparente de 96 poços na densidade de 2×10^4 células/poço em 100 μ L de meio RPMI-1640, pH 7,2 ~ 7,4, (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de Gentamicina e cultivados a uma temperatura de 37° C e 5% de CO₂ por 24 h. Após este tempo de incubação, 100 μ L de meio contendo os compostos foram adicionados. Os compostos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e testados nas concentrações de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,625 μ M. O cloridrato de doxorubicina foi utilizado como controle de citotoxicidade as concentrações de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 μ M.

Após 72 h de incubação na estufa, a viabilidade das células foi avaliada a partir da quantificação de adenosina trifosfato (ATP) presente, que indicam células metabolicamente ativas, através do kit CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay G7570 (Promega

Corporation, Madison, WI, EUA) utilizando os reagentes disponibilizados no kit, de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram tratadas durante 72 h. Após esse período, o reagente foi adicionado (100 µL diluído em 10 mL e adicionado 100 µL por poço) e, em seguida, foi realizado a leitura. A análise da luminescência foi realizada em um espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5.3 CRESCIMENTO PARASITÁRIO DE CEPAS DO *P. FALCIPARUM*

As cepas de *P. falciparum* sensíveis à cloroquina (D10 e 3D7) e resistente à cloroquina (W2) foram mantidas em frascos de cultura de células de 25 cm². As cepas D10 e W2 foram cultivadas em 5% (v/v) de hematócrito (hemáticas humanas tipo A positivo) em meio RPMI- 1640 (EuroClone, Celbio) contendo 8 mg/mL de AlbuMax (Invitrogen, Milan, Italy), 0,1 mg/mL de hipoxantina, 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas a 37°C em uma mistura de gás de 1% de O₂, 5% de CO₂ e 94% de N₂.

A cepa 3D7 foi cultivada em 5% (v/v) de hematócrito (hemácias humanas do tipo O positivo) em meio RPMI-1640 (EuroClone, Celbio) contendo 5% (v/v) de plasma humano O positivo, 0,37 mM de hipoxantina, 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina. A cultura mantida nas condições mencionadas acima.

5.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO* DOS COMPOSTOS DA ATOVAQUONA

Duas cepas foram selecionadas para os testes, a cepa sensível à cloroquina, a 3D7 (isolada na região oeste da África; obtida do MR4, VA, USA), e a cepa resistente à cloroquina, a W2 (isolada na Indochina, obtida do MR4, VA, USA). Ambas foram mantidas em cultura em RPMI 1640 (Invitrogen, Paisley, UK), suplementada com 10% de sêrum humano (Abcys S.A. Paris, France), 25 mM de HEPES e 25 mM de NaHCO₃. Os parasitas foram cultivados em sangue humano A positivo (Etablissement Français du Sang, Marseille, France) dentro de condições específicas, que foram 10% O₂, 5% CO₂ e 85% N₂ a 37°C, com umidade de 95%.

As duas cepas foram sincronizadas duplamente com sorbitol antes do uso e a clonalidade foi analisada a cada 15 dias através de genotipagem por PCR dos marcadores genéticos polimórficos *msp1* e *msp2* e locais de microsatélite. Ademais, a clonalidade também foi verificada a cada ano pelo laboratório independente do Worldwide Anti-malarial Resistance Network (WWARN). A cloroquina difosfato (ou Chloroquine Diphosphate – CQDP) foi comprada da Sigma (Saint Louis, MO). CQDP foi ressuspensa em água em concentrações de

5 a 3200 nM. Os compostos sintéticos foram ressuspensos em DMSO e, então, diluídos em RPMI-DMSO (99v/v) para obter as concentrações finais de 0.1 nM a 100 µM. Para os microtestes *in vitro*, 25 µL/poço do composto antimalárico e 200 µL/poço de hemácias parasitadas assíncronas em suspensão (parasitemia final, 0.5%; hematócrito final, 1.5%) foram distribuídas em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas à 37°C. Após o tempo de incubação, o crescimento do parasito foi determinado através da mensuração do kit HRP2 ELISA-based assay Malaria Ag Celisa 16 kit (ref KM2159, Cellabs PTY LDT, Brookvale, Austrália) por espectrofotometria. Os resultados foram analisados e expressos como a concentração inibitória de 50% em relação aos poços (CI50). Três experimentos independentes foram realizados.

5.5 AVALIAÇÃO DA HEMÓLISE DOS COMPOSTOS DA ATOVAQUONA

Os eritrócitos O+ não infectados de humanos foram lavados três vezes com tampão fosfato salina (ou phosphate-buffered saline – PBS), ajustados para 1% de hematócrito e 100 µL foram colocados em uma placa de 96 poços de fundo redondo. Então, 100 µL dos compostos previamente diluídos em DMSO e ressuspensos em PBS foram colocados em seus respectivos poços. Cada composto foi testado em sete concentrações (0.312- 20 µM), em triplicata. Células não tratadas receberam 100 µL de PBS contendo 1 % (v/v) DMSO (controle negativo), enquanto o controle positivo recebeu saponina (Sigma-Aldrich) a 1 % (v/v). As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, com 5 % de CO₂. As placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e 100 µL do sobrenadante foi transferido para outra placa, onde a absorbância de 540 nm foi avaliada utilizando o equipamento SpectraMax 190. A % da hemólise foi calculada da seguinte maneira: [(absorbância média da amostra – absorbância média do controle negativo)/(absorbância média do controle positivo – absorbância média do controle negativo)] × 100, e plotado versus a concentração do composto utilizando o GraphPad Prism 5.01. Dois experimentos independentes foram realizados.

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VIVO* DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL

Para a avaliação da atividade antiparasitária *in vivo*, foi adotada a metodologia de Peters (PETERS et al., 1975). O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética do Uso no Animais (CEUA) do Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz Bahia), número de protocolo 008/2020.

Camundongos Swiss Webster, machos, com peso entre 18 – 22 gramas ($n=5$ /grupo), foram infectados com o *P. berghei* da cepa GFP (5×10^7 de células infectadas) por via intraperitoneal. Os compostos foram dissolvidos em DMSO, diluídos em uma solução dispersante (kolliphor cremophor a 4 %, tween 80 a 5 %, sorbitol a 5 %, glicose a 5 %, tween 20 a 5 % em salina 0,9 a 75 % v/v) e o tratamento foi realizado com 100 μ L do Astemizol à 55 mg/kg (120 μ mol/kg) por via oral (gavagem), DM-AST à 18 mg/kg e 54 mg/kg (40 μ mol/kg e 120 μ mol/kg, respectivamente) por via intraperitoneal, MK-DM-24 à 19 mg/kg e 57 mg/kg (40 μ mol/kg e 120 μ mol/kg, respectivamente) por via intraperitoneal e oral (gavagem), DM-253 à 19 mg/kg e 57 mg/kg (40 μ mol/kg e 120 μ mol/kg, respectivamente) por via intraperitoneal e oral (gavagem) e o veículo contendo solução dispersante/DMSO (80:20, v/v) por via intraperitoneal ou oral. O tratamento farmacológico foi realizado por 4 dias consecutivos de tratamento, uma vez ao dia, após 3 h (tratamento oral por gavagem) ou 24 h (tratamento injetável intraperitoneal) da infecção. A parasitemia foi monitorada por citometria de fluxo após o fim do tratamento, nos dias 5, 8, 10 e 12, enquanto a sobrevivência dos animais foi monitorada por 30 dias após infecção.

Para avaliar a parasitemia dos animais infectados, foram coletados 10 μ L de sangue da cauda de cada camundongo em tubos contendo 100 μ L de heparina (Hemofol). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 1500 rpm, foi retirado o sobrenadante contendo heparina, centrifugados com solução salina (0,9%). Logo após, o sobrenadante foi retirado e adicionado às amostras uma solução de Mitotracker™ Deep Red FM (67 nM) (Life Technology, Carlsbad, CA, EUA) e armazenada à 37°C por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, os pellets coletados e centrifugados novamente para retirada de resíduos do reagente. As amostras foram analisadas no citômetro BD LSRFortessa através da leitura de 500.000 eventos no canal do isotiocianato de fluoresceína (FITC) (green laser – 400 – 530 nm) e alofocianina (APC) (Red Laser – 640 nm).

5.7 AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *IN VIVO* DOS DERIVADOS DOASTEMIZOL

Para a avaliação da velocidade da atividade antiparasitária *in vivo*, camundongos Swiss Webster, machos, com peso entre 18 – 22 gramas ($n=5$ /grupo) foram infectados com o *P. berghei* da cepa GFP (5×10^7 de células infectadas) por via intraperitoneal. Após 5 dias de infecção, os animais foram tratados uma única vez por via oral com o fármaco experimental DM-253 à 57 mg/kg (120 μ mol/kg). A parasitemia foi monitorada por citometria de fluxo antes

e após o fim do tratamento, nos intervalos de 8 horas. Para avaliar a parasitemia dos animais infectados, foram coletados 10 µL de sangue da cauda de cada camundongo em tubos contendo 100 µL de heparina (Hemofol). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 1500 rpm, foi retirado o sobrenadante contendo heparina, centrifugados com solução salina (0,9%). Logo após, o sobrenadante foi retirado e adicionado às amostras uma solução de Mitotracker™ Deep Red FM (67 nM) (Life Technology, Carlsbad, CA, EUA) e armazenada à 37°C por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas, os pellets coletados e centrifugados novamente para retirada de resíduos do reagente. As amostras foram analisadas no citômetro BD LSRFortessa através da leitura de 500.000 eventos no canal do isotiocianato de fluoresceína (FITC) (green laser – 400 – 530 nm) e alofocianina (APC) (Red Laser – 640 nm).

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE CRISTAIS DE HEMOZOÍNA

Camundongos suíços (n=4 para grupo dos animais tratados e n=3 para o grupo veículo), machos, pesando entre 20 – 25 gramas, foram infectados com *P. berghei* GFP. O percentual da parasitemia foi acompanhado por citometria de fluxo até alcançar 8 – 10%. Quando atingida a faixa de parasitemia desejada, iniciou-se o tratamento, por via oral, com: DM-253 (120 µmol/kg), cloroquina difosfato (60 µmol/kg) e a solução dispersante/DMSO (70:30, v/v). Para acompanhar a parasitemia, foi realizada a coleta sanguínea e confecção das lâminas nos tempos de 24, 72 e 168 horas após o tratamento.

Para avaliar a parasitemia dos animais infectados, foram coletados 10 µL de sangue da cauda de cada camundongo em eppendorfs contendo 100 µL de heparina (Hemofol). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 1500 rpm. Em seguida, retirou-se o sobrenadante contendo heparina, homogeneizou com a solução salina (0,9%) e centrifugou novamente as amostras. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente retirado e foi adicionado às amostras uma solução de Mitotracker™ Deep Red FM (67 nM) (Life Technology, Carlsbad, CA); em seguida, foram armazenadas a 37°C por 20 minutos. Após o tempo de armazenamento, as amostras foram centrifugadas, os pellets coletados e centrifugados, novamente, para a retirada de resíduos do reagente. A análise das amostras foi realizada através do citômetro BD LSRFortessa, através da leitura de 250.000 eventos, pelos canais do isotiocianato (FITC) (green laser – 400 – 530 nm) e alofocianina (APC) (Red Laser – 640 nm).

Foi realizado a montagem das lâminas através de distensão sanguínea, utilizando 10 µL de sangue da cauda dos animais, onde foram montadas 2 lâminas por animal. A fixação foi realizada com o álcool metílico P.A. e, posteriormente, adicionado o DAPI, para análise no

microscópio invertido, para investigação da presença de parasitos viáveis por fluorescência e de cristais de hemozoína por microscopia de luz polarizada. O número de cristais de hemozoínas foram determinados em ao menos 20 campos para cada grupo experimental. A contagem foi realizada de maneira duplo cego e randômica.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram realizadas utilizando o *software* Graph Pad Prism® versão 5.0.1 (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA). Os cálculos de CC50 foram realizados por regressão não linear a partir do Log das concentrações testadas e da porcentagem de viabilidade celular. As diferenças foram estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS DAS ATOVAQUONA FRENTE CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Na **Tabela 1**, encontra-se compilados os resultados de CC50 com duas linhagens celulares (J774 e HepG2, respectivamente) e CI50 com duas linhagens de cepas do *P. falciparum* (3D7 – sensível à cloroquina e W2 – resistente à cloroquina, respectivamente) dos derivados da Atovaquona citados anteriormente. A doxorubicina é o controle positivo, enquanto a Atovaquona é o fármaco de referência.

Tabela 1 – Citotoxicidade da Atovaquona e seus derivados frente as linhagens de macrófagos murino J774 e hepatocarcinoma humano HepG2 e a atividade antimalárica Atovaquona e seus derivados frente as cepas CQ-sensível (3D7) e CQ-resistente (W2) do *P. falciparum*.

Compostos	CC50 (\pm E.P.M.) em μ M ^[a]		parum, CI50 (\pm E.P.M.)em nM ^[b]	
	J774	HepG2	cepa 3D7	cepa W2
Atovaquona (ATN)	19.8 \pm 1.6	32.4 \pm 4.8	2.4 \pm 1.2	2.1 \pm 0.9
Cloroquina (CQ)	50.5 \pm 8.9	~ 80	23.8 \pm 5.5	526 \pm 126
ATNK5 (1) Ag	9.5 \pm 2.2	14.6 \pm 0.91	30.5 \pm 9.7	26.5 \pm 7.8
ATNK10 (2) Ag	5.9 \pm 1.0	5.3 \pm 0.9	3.0 \pm 2.1	2.1 \pm 0.25
ATNK9 (3) Au	10.8 \pm 3.4	8.9 \pm 2.7	8.1 \pm 2.7	5.2 \pm 2.2
ATNK2 (4) Zn	5.5 \pm 1.1	14.0 \pm 1.6	9.2 \pm 5.1	7.1 \pm 2.1
ATNK7 (5) Zn	18.1 \pm 1.2	34.2 \pm 2.0	7.6 \pm 3.3	8.2 \pm 1.6
ATNK1 (6) Cu	36.1 \pm 3.9	44.3 \pm 7.7	30.7 \pm 10.7	26.3 \pm 6.9
ATNK4 (7) Cu	30.9 \pm 5.2	42.4 \pm 4.8	15.8 \pm 4.4	19.4 \pm 5.0
ATNK11 (8) Cu	14.7 \pm 2.8	27.8 \pm 3.6	5.0 \pm 2.7	3.3 \pm 0.9
ATNK8 (9) Cu	26.4 \pm 2.9	45.3 \pm 4.3	8.1 \pm 2.7	5.2 \pm 2.2
Doxorrubicina	0.44 \pm 0.31	< 0.12	N.D.	N.D.

^a Valores representam a média \pm E.P.M obtidos de pelo menos três experimentos independentes. Concentração citotóxica para 50 % (CC50) determinada após 72 h de incubação com os compostos usando o kit CellTiter-Glo.

^b Valores representam a média \pm E.P.M obtidos de pelo menos três experimentos independentes. Concentração inibitória para 50 % (CI50) determinada após 72 h de incubação com os compostos frente ao *P. falciparum* usando o kit ELISA HRP. W2 = Cloroquina Resistente. 3D7 = Cloroquina Sensível. ATO = Atovaquona. DOXO = doxorubicina. CQ = Cloroquina. DP = desvio padrão. E.P.M. = erro padrão da média.

Fonte: Elaboração da autora

Com base nos dados demonstrados na **Tabela 1**, considerando os resultados apresentados para o CC50, o cloridrato de doxorubicina, utilizado como o controle positivo, apresentou toxicidade na faixa de nanomolar em ambas as linhagens celulares. Ponderando os derivados

da Atovaquona, alguns apresentaram citotoxicidade similar ao seu precursor na linhagem da J774, sendo eles os ATNK 5, 10, 9, 2, 7 e 11. Em contrapartida, os compostos ATNK 1, 4 e 8 obtiveram citotoxicidade menor na linhagem J774 que seu precursor, a Atovaquona.

Acerca da HepG2, três compostos se destacaram com CC50 maiores que a Atovaquona, sendo eles os ATNK 1, 4 e 8. Considerando os outros compostos, eles permaneceram com valores de citotoxicidade menores ou próximos ao do precursor, Atovaquona.

Destacando o CI50, quando há comparação da Cloroquina com os derivados da Atovaquona nota-se que, para a cepa sensível (3D7), apenas os derivados ATNK 5 e 1 apresentaram valores de CI50 acima da Cloroquina. Todos os outros derivados e o seu precursor, Atovaquona, apresentaram valores abaixo da Cloroquina.

Considerando a cepa resistente à Cloroquina (W2), os dados expressam que a Atovaquona e seus derivados apresentaram valores de CI50 abaixo do que o fármaco de referência utilizado para tratamento atualmente.

Tabela 2 – Citotoxicidade e índice de seletividade dos derivados da Atovaquona em fases intraeritrocíticas do *P. falciparum*.

Compostos	Células de mamíferos, CC50(±S.E.M.) em µM		Índice de seletividade(I.S.)	
	J774	HepG2	3D7	W2
Atovaquona (ATN)	19.8±1.6	2.1±0.9	8250	9428
Cloroquina (CQ)	50.5±8.9	526±126	2121	96
ATNK5 (1) Ag	9.5±2.2	26.5±7.8	311,4	358
ATNK10 (2) Ag	5.9±1.0	2.1±0.25	1966	2809
ATNK9 (3) Au	10.8±3.4	5.2±2.2	1333	2076
ATNK2 (4) Zn	5.5±1.1	7.1±2.1	597,8	774
ATNK7 (5) Zn	18.1±1.2	8.2±1.6	2381	2207
ATNK1 (6) Cu	36.1±3.9	26.3±6.9	1175	1372
ATNK4 (7) Cu	30.9±5.2	19.4±5.0	1955	1592
ATNK11 (8) Cu	14.7±2.8	3.3±0.9	2940	4454
ATNK8 (9) Cu	26.4±2.9	5.2±2.2	3259	5076
Doxorrubicina	0.44±0.31	N.D.	N.D.	N.D.

^a Valores representam a média ± D.P. (desvio padrão). Concentração inibitória para 50 % (CI50) determinada após 72 h de incubação com os compostos usando o kit CellTiter-Glo. ^b Valores representam a média ± D.P. obtidos de dois experimentos independentes. O índice de seletividade foi determinado como CC50/CI50. DP = desvio padrão. I.S. = Índice de Seletividade. CQR = Cloroquina Resistente. CQS = Cloroquina Sensível. ATO = Atovaquona. CQ = Cloroquina.

Fonte: Elaboração da autora

A **Tabela 2** apresenta os resultados da atividade antiparasitária dos derivados da Atovaquona frente as cepas resistentes (W2) e sensível (3D7) à Cloroquina, os respectivos CC50 com as duas linhagens celulares (J774 e HepG2, respectivamente) e seu índice de seletividade, determinado frente a cepa W2. A Cloroquina é o controle positivo, enquanto a Atovaquona é ofármaco de referência.

Com base nos dados obtidos referentes ao índice de seletividade (Tabela 2), tanto o fármaco de referência, Atovaquona, quanto seus derivados apresentaram o IS maior que o controle positivo, a Cloroquina, quando comparados em relação à cepa W2.

Considerando a cepa 3D7, os derivados ATNK 11 e 8 apresentaram, junto ao seu precursor Atovaquona, valores maiores de IS quando comparados ao controle positivo, Cloroquina.

6.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL

Avaliamos a atividade citotóxica do Astemizol e seus derivados frente à linhagem HepG2 (Tabela 3). É possível observar que os fármacos DM-253 e DM-130 apresentaram valores de CC50 menores que o controle positivo, a Violeta de Genciana. O DM-337 apresentou valores parecidos ao fármaco de referência, Astemizol. Já o DM-254 e o DM-20-030 apresentaram valores duas vezes e quatro vezes maiores que o Astemizol, respectivamente.

Os valores encontrados para DM-253 e DM-130 podem estar correlacionados ao número de experimentos realizados, indicando a necessidade de novos experimentos que confirmem o resultado, visto que estudos com o DM-253 apresentaram resultados de IS que justificaram a utilização do mesmo em experimentos *in vivo* (KUMAR *et al.*, 2019; DE VILLIERS, 2021).

Tabela 3 – Citotoxicidade do Astemizol e seus derivados frente a linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2.

Compostos	CC50 ± D.P. (µM) ^a
	HepG2
AST	16,10 ± 0,1332
DM-253	8,010 ± 0,02390
DM-254	32,81 ± 0,1201
DM-337	16,07 ± 0,02121
DM-130	8,046 ± 0,01652
DM-20-030	63,68 ± 0,02646
V.G.	10,49 ± 0,8096

^a Valores representam a média ± D.P. obtidos de pelo menos três triplicatas. Concentração citotóxica para 50 % (CC50) determinada após 72 h de incubação com os compostos usando o kit CellTiter-Glo. DP = desvio padrão. AST = Astemizol. V.G. = Violeta de Genciana (controle positivo).

Fonte: Elaboração da autora

Baseado nos resultados *in vitro* da atividade antimalárica frente ao *P. falciparum* e do índice de seletividade dos derivados do Astemizol, denominados MK-DM-24 e DM-253 (KUMAR et al., 2019; DE VILLIERS; EGAN, 2021), justifica-se a avaliação destes derivados em modelos experimentais de malária. Outrossim, diante da relativa escassez de dados de eficácia do Astemizol em modelos experimentais de malária, nós decidimos avaliar também a eficácia do Astemizol e do seu principal metabólito biologicamente ativo, o desmetil-Astemizol(DM-AST).

No modelo de supressão da parasitemia de Peters, os animais do grupo veículo desenvolvem parasitemia, com pico da parasitemia entre 10 a 15 dias após infecção. Conseqüentemente, a mediana da sobrevivência é em torno de 10 a 20 dias após o pico da parasitemia (**Figura 7**). O tratamento com a dose de 40 µmol/kg de animal (20 mg/kg de animal) do fármaco de referência (Cloroquina) administrado por via intraperitoneal é capaz desuprimir a parasitemia e aumentar a mediana da sobrevivência.

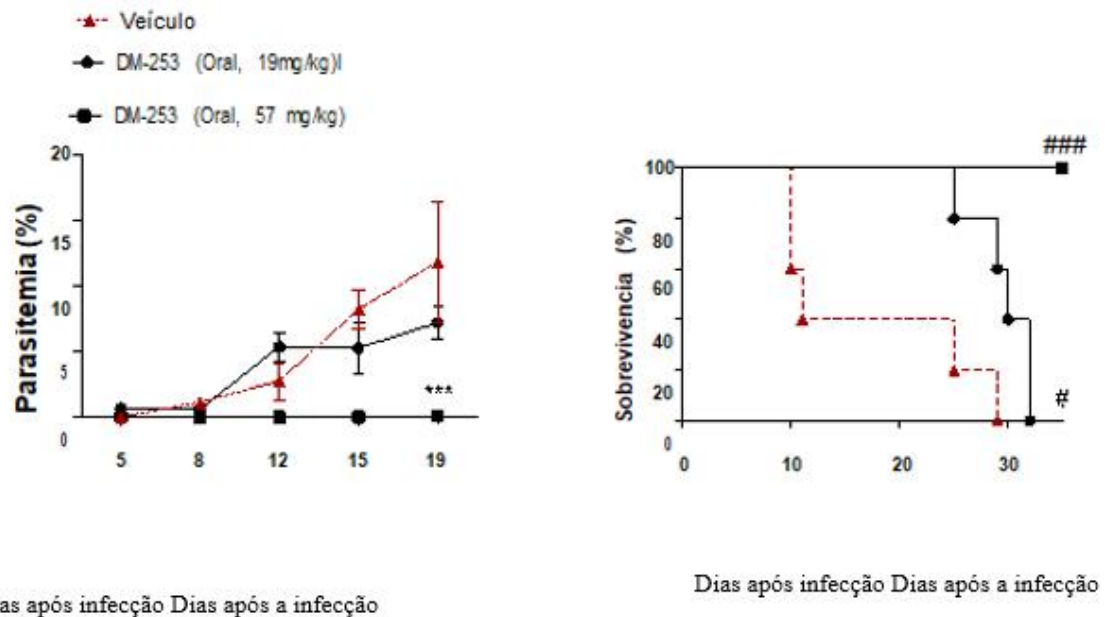


Figura 7 – Avaliação do derivado do Astemizol DM-253 no protocolo de Peters de supressão da malária em roedores. Camundongos Swiss Webster machos (n=5/grupo) foram infectados com a cepa *P. berghei*-GFP e tratados após 24 h de infecção por 4 dias consecutivos (via oral por gavagem) na dose indicada na legenda. Esquerda: Curso da parasitemia sanguínea. Direita: Sobrevivência dos animais. ***p<0,005 em comparação com o grupo veículo (One-Way ANOVA e pós-teste de Turkey). ##p<0,005 (em comparação com o grupo veículo) e #p<0,05 (em comparação com o grupo veículo) Log-rank (Mantel- Cox). Valores referentes à mediana ± desvio padrão.

Fonte: Elaboração da autora

Os resultados encontrados no experimento *in vivo* através da metodologia de Peters foi representado através da **Tabela 4**. Em comparação com a Cloroquina, o Astemizol apresentou uma eficácia baixa em suprimir a parasitemia na dose de 120 $\mu\text{mol/kg}$ de animal administrado por via oral e não aumentou a mediana da sobrevivência.

Tabela 4 – Sumário da atividade in vivo do Astemizol e derivados em modelo murino de infecção em camundongos Suíços infectados pelo *P. berghei*.

Tratamento	Via de administração	Dose (µmol/kg animal)	% de inibição de parasitemia D.P.	Mediana de sobrevivência (dias)	Nº animais vivos (% de sobrevivência)
Veículo	Oral / I.P.	-	-	14, 18, 21	0/15 (0)
Astemizol	Oral	120	30±15	26	0/5 (0)
DM-AST	I.P.	120	18,6±3,5	30 [#]	0/5 (0)
DM-AST	I.P.	40	2,0±5,5	24	0/5 (0)
MK-DM-24	I.P.	120	21,9±9,2	22	0/5 (0)
MK-DM-24	I.P.	40	6,5±1,0	21	0/5 (0)
DM-253	I.P.	120	>99 %	>30 [#]	2/5 (40) ^b
DM-253	I.P.	40	70,6±5,5	30 [#]	0/5 (0)
DM-253	Oral	120	>99 %	>30 [#]	5/5 (100)
DM-253	Oral	40	21,9±9,2	30 [#]	0/5 (0)
CQ	I.P.	40	>99 %	30 [#]	3/5 (60)

^aValor da mediana ±D.P. determinado em comparação ao veículo. Valores obtidos entre os dias 12 à 15 após infecção. ^b Três animais foram a óbito durante o tratamento, indicando toxicidade do fármaco. CQ = cloroquina difosfato. [#]*p*<0,05 versus veículo usando o Log-rank (Mantel-Cox). Oral = tratamento realizado por gavagem; I.P. = injeção intraperitoneal.

Fonte: Elaboração da autora

Em seguida, nós avaliamos o principal metabólito bioativo do Astemizol, o desmetil-Astemizol (DM-AST). O DM-AST testado na maior dose (120 µmol/kg) reduziu a parasitemia e aumentou a mediana da sobrevivência, entretanto com eficácia inferior a Cloroquina.

Avaliamos os derivados do Astemizol, o MK-DM-24 e o DM-253. O derivado MK-DM-24 nas doses testadas não foi capaz de reduzir a parasitemia e como consequência, não aumentou a sobrevivência.

Em contraste com o Astemizol, o seu derivado DM-253 apresentou eficácia em suprimir a parasitemia e em aumentar a mediana da sobrevivência dos animais. Na maior dose, tanto por via oral quanto injetável, o DM-253 foi capaz de suprimir a parasitemia e curar os animais. Na menor dose, tanto por via oral quanto injetável, o DM-253 foi capaz de suprimir a parasitemia e aumentar a mediana da sobrevivência, entretanto o nível de supressão da parasitemia não foi capaz de curar os animais (**Figura 7**).

Através da **Tabela 4**, podemos analisar a sobrevivência e a parasitemia dos animais, onde é possível observar que o composto DM-253 apresentou bons resultados em diminuir a

parasitemia e manter os animais vivos nas duas vias de administração; porém, devemos considerar um possível potencial tóxico para a via intraperitoneal, onde o grupo dos animais da dosagem de 120 $\mu\text{mol/kg}$ foram a óbito antes do pico da parasitemia. Em contrapartida, quando aplicado pela via oral (gavagem), a sobrevivência foi de 100%, tornando-o um possível candidato a fármaco antimalárico. Em doses menores (40 $\mu\text{mol/kg}$) do DM-253, a redução da parasitemia foi maior quando aplicado via injetável que oral, o que necessita de estudos mais aprofundados de farmacocinética para descrevê-lo melhor.

6.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS DERIVADOS DO ASTEMIZOL NA VELOCIDADE DE AÇÃO DEREDEUÇÃO DA PARASITEMIA.

A velocidade de ação de um antimalárico é um fator importante, já que a infecção pode rapidamente se tornar grave e com risco de vida. A cloroquina, ao mesmo tempo que possui uma longa duração, atua de maneira rápida em matar o parasito. O uso de fármacos com ação rápida se justifica com a objetivo de maximizar a eficácia terapêutica e minimizar a disseminação de parasitos resistentes (MURITHI *et al.*, 2020).

Em virtude disso, nós decidimos investigar se a velocidade de ação antimalárica do DM-253 causa uma redução rápida no crescimento do plasmódio como é característico com a cloroquina, ou se possui uma ação relativamente lenta, como observado com a atovaquona (MURITHI *et al.*, 2020). Como observado na **Figura 8**, o tratamento com o DM-253 foi capaz de inibir o crescimento do *P. berghei* após 4 a 8 h de incubação com eficácia similar a cloroquina. Contrariamente, a atovaquona, no qual foi testado em paralelo, reduziu a parasitemia apenas após 24 h de tratamento. Portanto, podemos inferir que o DM-253 causa uma redução relativamente rápida na parasitemia em comparação com a atovaquona.

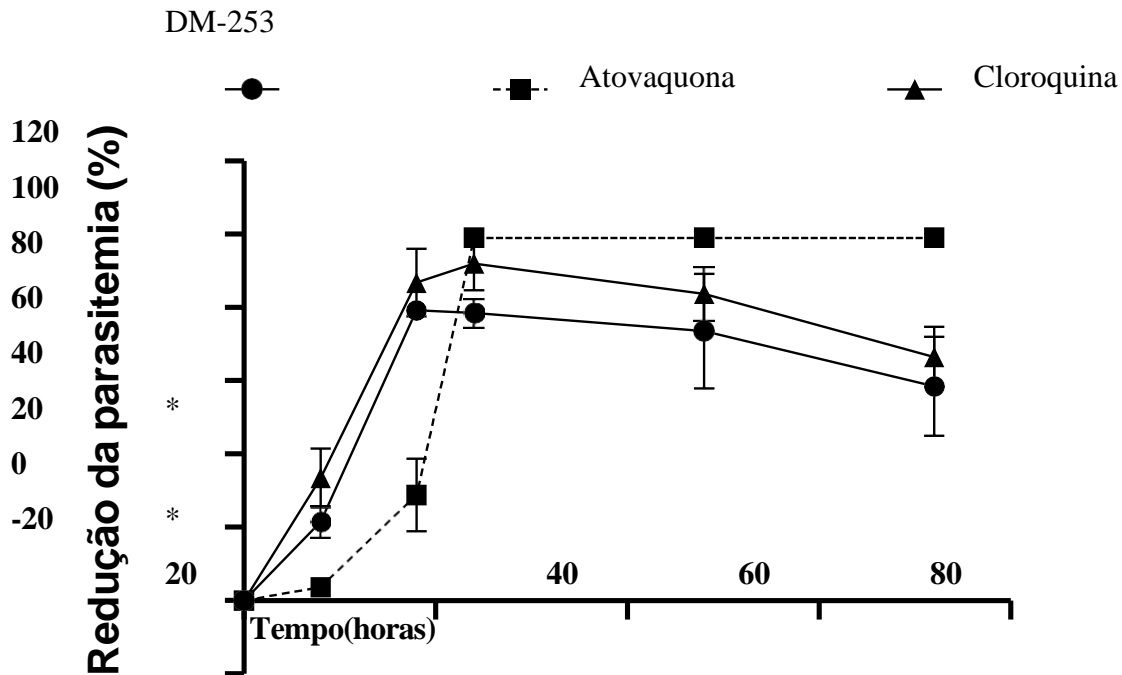


Figura 8 - Avaliação do derivado do Astemizol DM-253 em reduzir a parasitemia em camundongos Swiss Webster machos (n=4/grupo) infectados com a cepa *P. berghei*-GFP. A redução da parasitemia foi determinado em comparação com o grupo veículo não tratado. Tratamento por via oral (gavagem). Cloroquina difosfatona dose de 30 mg/kg. Atovaquona nadose 22 mg/kg. DM-253 na dose 57 mg/kg; 120 umol/kg). Valores referentes à mediana \pm desvio padrão. **p<0,005 Atovaquona em comparação com os dois demais grupos (One-Way ANOVA e pós- teste de Turkey).

Fonte: Elaboração da autora

Além de apresentar uma velocidade de ação relativamente mais rápido do que a Atovaquona, nós decidimos estudar se o DM-253 é capaz de inibir a formação dos cristais de hemozoína no *P. berghei*, uma vez que estudos prévios indicam que o Astemizol é capaz de bloquear a detoxificação do heme.

A quantificação dos cristais de hemozoína foi realizado no esfregaço sanguíneo em camundongos infectados com o *P. berghei* após o tratamento com o DM-253 ou a Cloroquina (fármaco de referência). Como observado na **Figura 9**, o tratamento com o DM-253 foi capaz de diminuir a formação dos cristais de hemozoína quantificados por microscopia de luz polarizada após 24 a 48 h de tratamento em comparação com o controle não tratado. A eficácia em diminuir a formação dos cristais de hemozoína foi maior no grupo tratado com a Cloroquina em relação com o grupo tratado com o DM-253. Portanto, podemos inferir que o DM-253 causa uma redução relativamente rápida na parasitemia em partes devido a diminuir a formação dos cristais de hemozoína.

Veículo (Não-tratado)DM-253

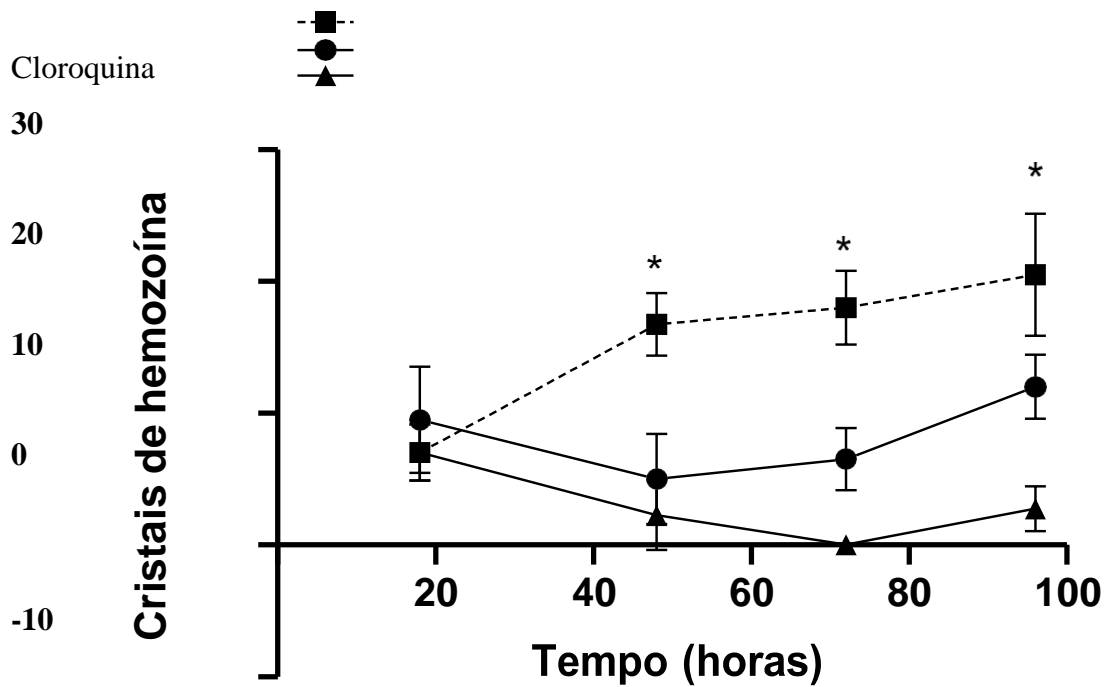


Figura 9 - Avaliação do derivado do Astemizol DM-253 em reduzir a formação de cristais de hemozoína em camundongos Swiss Webster machos ($n=4$ /grupo) infectados com a cepa *P. berghei*-GFP. Valores são o número de cristais de hemozoína em cada campo determinado em ao menos 5 lâminas de cada grupo e 20 campos por lâmina. Tratamento por via oral (gavagem). Cloroquina difosfato na dose de 30 mg/kg. DM-253 na dose 57 mg/kg (120 μ mol/kg). Valores referentes à mediana \pm desvio padrão. ** $p < 0,005$ em comparação com não-tratado (One-Way ANOVA e pós-teste de Turkey).

Fonte: Elaboração da autora

7 DISCUSSÃO

Neste estudo experimental, nós descrevemos a atividade antiparasitária como antimaláricos de duas fármacos: a Atovaquona e o Astemizol. Os dados encontrados aqui sugerem o potencial antimalárico destas classes de fármacos, que podem contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos úteis a terapia.

Com base nos dados apresentados durante o trabalho, os derivados da Atovaquona que apresentaram os melhores resultados frente ao CC50 foram os ATNK 1, 4 e 8, para ambas as linhagens celulares J774 e HepG2. Dessa forma, esses derivados foram selecionados para seguir com os experimentos *in vitro* para análise da atividade antiparasitária e definição do índice de seletividade. É válido ressaltar que serão necessários a repetição de ensaios pontuais com ambas as linhagens em alguns compostos ATNK citados, devido aos altos desvios padrões encontrados nos valores de CC50.

Apresentamos os dados encontrados de CI50 dos derivados selecionados, frente às cepas W2 e 3D7 (resistente e sensível à cloroquina, respectivamente). Foi determinado o índice de seletividade a partir à cepa W2, onde observou-se que tanto a Atovaquona quanto os seus derivados apresentaram IS maiores que a Cloroquina, fármaco utilizado na clínica. Esses resultados corroboram com a possibilidade desses derivados serem bons candidatos antimaláricos.

Dessa forma, para os derivados da Atovaquona, possuímos três compostos (ATNK 1, 4 e 8) que destacam-se entre os derivados com bons resultados, tornando-se fortes candidatos à antimaláricos e que devem prosseguir para os ensaios *in vivo*.

Em relação à avaliação do Astemizol e seus derivados, foram analisados a atividade citotóxica frente à linhagem HepG2 (Tabela 3), onde os fármacos DM-253 e DM-130 apresentaram-se mais citotóxicos que o Violeta de Genciana, o controle. Esses dados podem estar correlacionados com o número de experimentos realizados com os fármacos, sendo necessários novos ensaios para confirmação de tal resultado. É válido ressaltar que estudos anteriores (KUMAR et al., 2019) demonstraram que o índice de seletividade para o DM- 253 justificava o prosseguimento dos experimentos para ensaios com modelos murinos para a Malária, o que reforça a necessidade de novos experimentos relacionados ao CC50 do derivado DM-253.

Concomitantemente, é possível observar na Tabela 3 que o derivado DM-337 apresentou valores parecidos ao Astemizol, enquanto o DM-254 e DM-20-030 apresentou

valores duas e quatro vezes maiores que o fármaco de referência, respectivamente. Esses dados indicam que os derivados DM-254 e DM-20-030 são bons candidatos à fármacos antimaláricos, porém ainda há a necessidade de realizar experimentos com as linhagens J774 e consolidar os dados de CC50 encontrados com a linhagem HepG2.

Na Tabela 4, temos os resultados expressos no ensaio *in vivo* com a metodologia de Peters. Observa-se que o Astemizol apresentou uma eficácia baixa para suprimir a parasitemia na dose oral de 120 $\mu\text{mol/kg}$ de animal e não aumentou a mediana da sobrevivência (quando comparados a Cloroquina). De fato, embora haja literatura demonstrando que o Astemizol reduz a parasitemia (CHONG et al., 2006), não tinha sido demonstrado a taxa de sobrevivência dos animais nem a comparação da eficácia do Astemizol com um fármaco de referência. Nosso trabalho demonstrou que o Astemizol possui eficácia inferior a Cloroquina em suprimir a parasitemia e aumentar a sobrevivência na malária experimental.

Em relação ao DM-AST, a maior dose (120 $\mu\text{mol/kg}$ de animal) reduziu a parasitemia e aumentou a mediana de sobrevivência, porém apresentou eficácia inferior à Cloroquina.

O Astemizol e seu principal metabólito bioativo (DM-AST) quando comparados à Cloroquina, apresentaram baixa eficácia nas dosagens utilizadas, indicando uma eficácia limitada.

Com relação aos derivados do Astemizol, o MK-DM-24 não foi capaz de reduzir a parasitemia e aumentar a sobrevivência nas doses testadas. Embora o MK-DM-24 apresente potência *in vitro* frente ao estágio sanguíneo do *P. falciparum* superior ao Astemizol (KUMAR et al., 2019), este aumento da potência *in vitro* não foi capaz de resultar em um derivado com eficácia na malária experimental.

O DM-253 apresentou eficácia em suprimir a parasitemia e aumentar a mediana da sobrevivência dos animais, quando comparados com o Astemizol. Na maior dose (120 $\mu\text{mol/kg}$ de animal) em ambas as vias de administração, ele foi capaz de suprimir a parasitemia e curar os animais, enquanto na menor dose (40 $\mu\text{mol/kg}$ de animal), em ambas as vias de administração, ele suprimiu a parasitemia e aumentou a mediana de sobrevivência, porém a supressão da parasitemia não foi capaz de curar os animais (Figura 5), demonstrando uma resposta dose-dependente.

Analisando a sobrevivência dos animais e correlacionando-a com o composto DM-253 (Tabela 4), em ambas as vias de administração o fármaco apresentou bons resultados. Há a necessidade de ponderar um possível potencial tóxico para a via intraperitoneal, devido ao grupo dos animais com a maior dosagem virem a óbito antes do pico da parasitemia. Em alternativa, através da via oral, a sobrevivência alcançou 100%, o que torna o DM-253 um

possível candidato a fármaco antimalárico. Por fim, ressalta-se aqui que o DM-253 tem uma ação antimalárica relativamente rápida em comparação com a Atovaquona, no qual é uma vantagem clara.

8 CONCLUSÃO

No intuito de identificar novos derivados da Atovaquona como potencial fármacos antimaláricos, nós iniciamos a triagem da citotoxicidade em células murinas da Atovaquona e seus derivados denominados ATNK.

Em comparação com a doxorrubicina, a Atovaquona e seus derivados foram menos citotóxicos. Em comparação com a Atovaquona, observamos derivados que foram tão citotóxicos ou mais citotóxicos do que a Atovaquona. Todavia, nenhum derivado foi tão citotóxico quanto a doxorrubicina. Consequentemente, justificou-se a avaliação da atividade antimalárica *in vitro* frente ao *P. falciparum* para todos os derivados, onde todos os compostos ATNK apresentaram os índices de seletividade frente à cepa resistente à Cloroquina maior que o fármaco de referência (Cloroquina) em ambas as linhagens (J774 e HepG2), o que indica que são possíveis candidatos antimaláricos.

Através dos dados apresentados do CC50 do Astemizol e seus derivados, conseguimos observar que há certa disparidade quanto aos resultados na literatura encontrados. O CC50 apresentado para o DM-253 pode não estar correspondendo a realidade devido a quantidade de experimentos realizados para a análise do mesmo, o que indica a necessidade de novos ensaios com os derivados. Em contrapartida, foi possível identificar dois novos derivados que apresentaram CC50 maiores que o Astemizol, o DM-254 e o DM-20-030; esses compostos necessitam de análises com as linhagens J774, porém com os resultados preliminares obtidos nesse estudo, indicam que são possíveis candidatos à fármacos antimaláricos.

Em relação ao trabalho de avaliação da atividade antimalárica do Astemizol e derivados, observamos que o Astemizol possui eficácia inferior ao fármaco de referência. Entretanto, o composto DM-253, derivado do Astemizol, apresentou taxa de sobrevivência de 100% quando administrado via oral em sua dose mais alta (120 $\mu\text{mol/kg}$), além de reduzir a parasitemia em >99 %. Esses resultados promissores indicam um candidato à fármaco antimalárico. Estudos serão realizados para compreender o mecanismo de ação do DM-253 (etapa em andamento).

Podemos indicar que ambos os grupos de derivados possuem candidatos para fármacos antimaláricos e, devido aos mecanismos de ação diferentes apresentados pelos seus fármacos de origem, existe a possibilidade de utilizá-los como terapia combinada.

REFERÊNCIAS

- ARISE, R. O. et al. Mechanochemical Synthesis, In Vivo Anti-Malarial and Safety Evaluation of Amodiaquine-Zinc Complex. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, v. 34, n. 3, p. 221–233, 1 set. 2017.
- AZEVEDO, R. et al. Bioluminescence Method for *In Vitro* Screening of Plasmodium Transmission-Blocking Compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, jun. 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02699-16>>. Acesso em: 3 jul. 2021.
- BAGGISH, A. L.; HILL, D. R. Antiparasitic Agent Atovaquone. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 11, 2002.
- BAHL, D. et al. Structure–Activity Relationships of Mononuclear Metal–Thiosemicarbazone Complexes Endowed with Potent Antiplasmodial and Antiamoebic Activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6857–6864, set. 2010.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. . **Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção: o que é malária?**. b. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>. Acesso em: 20 maio 2020.
- BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde (Opas). Organização Mundial da Saúde (Oms). **Malária**. a. Atualizado em abril de 2016. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5287:malaria-2&Itemid=875. Acesso em: 19 maio 2020.
- CATALDI, M. et al. Cardiac Safety of Second-generation H₁ -antihistamines When Updosed in Chronic Spontaneous Urticaria. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 49, n.12, p. 1615–1623, dez. 2019.
Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI). **CHEBI:575568 - atovaquone**. 2017. The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:575568>. Acesso em: 03 fev. 2020.
- CHONG, C. R. et al. A Clinical Drug Library Screen Identifies Astemizole as an Antimalarial Agent. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 8, p. 415–416, ago. 2006.
- CLAVEL, C. M. et al. Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium (II)–Arene Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 3356–3365, 23 abr. 2015.
- DE VILLIERS, K. A.; EGAN, T. J. Heme Detoxification in the Malaria Parasite: A Target for Antimalarial Drug Development. **Accounts of Chemical Research**, v. 54, n.11, p. 2649–2659, 1 jun. 2021.
- DUNCAN, C.; WHITE, A. R. Copper Complexes as Therapeutic Agents. **Metallomics**, v. 4, n. 2, p. 127–138, 2012.

FARRELL, N. P. Multi-Platinum Anti-Cancer Agents. Substitution-Inert Compounds for Tumor Selectivity and New Targets. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 24, p. 8773–8785, 2015.

FU, Y. et al. The S2 Cu(I) Site in CupA from *Streptococcus Pneumoniae* Is Required for Cellular Copper Resistance. **Metallomics**, v. 8, n. 1, p. 61–70, 2016.

GLANS, L. et al. Ruthenium (II) Arene Complexes with Chelating Chloroquine Analogue Ligands: Synthesis, Characterization and in Vitro Antimalarial Activity. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 9, p. 2764, 2012.

GNANADESIGAN, M. et al. Nano Drugs for Curing Malaria. In: **Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 451–467.

HUBIN, T. J. et al. Synthesis and Antimalarial Activity of Metal Complexes of Cross-Bridged Tetraazamacrocyclic Ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 13, p. 3239–3244, jul. 2014.

IRVING, H.; WILLIAMS, R. J. P. 637. The Stability of Transition-Metal Complexes. **Journal of the Chemical Society (Resumed)**, p. 3192, 1953.

JOSLING, G. A.; LLINÁS, M. Sexual Development in Plasmodium Parasites: Knowing When It's Time to Commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 573–587, set. 2015.

Kumar M, Okombo J, Mambwe D, Taylor D, Lawrence N, Reader J, van der Watt M, Fontinha D, Sanches-Vaz M, Bezuidenhout BC, Lauterbach SB, Liebenberg D, Birkholtz LM, Coetzer TL, Prudêncio M, Egan TJ, Wittlin S, Chibale K. Multistage Antiplasmodium Activity of Astemizole Analogues and Inhibition of Hemozoin Formation as a Contributor to Their Mode of Action. **ACS Infect Dis**. 2019 Feb 8;5(2):303-315. doi: 10.1021/acsinfecdis.8b00272.

LiverTox. **Atovaquone**. In: LIVER TOX (Maryland). National Library Of Medicine (NIH). **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury** [Internet]. Bethesda: National Institute of Diabetes And Digestive And Kidney Diseases (NIDDK), 2012. p. 1-6. Atualizada em 02 fev. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31643176>. Acesso em: 04 fev. 2020.

MACEDO, T. S. et al. Chloroquine-Containing Organoruthenium Complexes Are Fast-Acting Multistage Antimalarial Agents. **Parasitology**, v. 143, n. 12, p. 1543–1556, out. 2016.

MARTÍNEZ, A. et al. The Antimalarial Activity of Ru–Chloroquine Complexes against Resistant *Plasmodium Falciparum* Is Related to Lipophilicity, Basicity, and Heme Aggregation Inhibition Ability near Water/n-Octanol Interfaces. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 6, p. 863–871, ago. 2009.

MEDICINES FOR MALARIA VENTURE (MMV) (comp.). **Malaria & medicines: definitions and symptoms**. Definitions and symptoms. Fonte: Philips et al, “Malaria,” *Nature Reviews Disease Primers*, 2017. Disponível em: <https://www.mmv.org/malaria-medicines/definitions-and-symptoms>. Acesso em: 22 maio 2020.

MEDLINEPLUS. **Atovaquone**. 2017. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a693003.html>>. Acesso em: 05 fev. 2020.

MERCK SHARP & DOHME CORP. (MSD) (Kenilworth). Merck & Co.. **Ciclo de vida do Plasmodium**. Disponível em: https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/figure/inf_plasmodium_life_cycle_pt. Acesso em: 18 maio 2020.

MESHNICK, S. R. et al. Antimalarial Activity of Diethyldithiocarbamate. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 213–216, jul. 1990.

MOREIRA, D. R. M. et al. Evaluation of Naphthoquinones Identified the Acetylated Isolapachol as a Potent and Selective Antiplasmodium Agent. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 615–621, 4 jul. 2015.

Murithi JM, Owen ES, Istvan ES, Lee MCS, Otilie S, Chibale K, Goldberg DE, Winzeler A, Llinás M, Fidock DA, Vanaerschot M. Combining Stage Specificity and Metabolomic Profiling to Advance Antimalarial Drug Discovery. **Cell Chem Biol**. 2020 Feb 20;27(2):158-171.e3. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.11.009

MUSONDA, C. C. et al. Chloroquine–Astemizole Hybrids with Potent in Vitro and in Vivo Antiplasmodial Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n.2, p. 481–484, jan. 2009.

NIXON, G. L. et al. Antimalarial Pharmacology and Therapeutics of Atovaquone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 5, p. 977–985, 1 maio 2013.

O. O. OGUNLANA. Antiplasmodial Activity of Quinine-Zinc Complex and Chloroquine: A Comparative in Vitro Assessment. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 8, 29 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJPP/abstracts/abstracts/abstract%202012/29%20Feb/Ogunlana%20et%20al.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2020.

PAMELA LANG (Rio de Janeiro). Agência Fiocruz de Notícias. **Malária: Fiocruz se destaca na produção de antimaláricos e em estudos sobre a doença**: doenças negligenciadas. Doenças Negligenciadas. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/malaria-fiocruz-se-destaca-na-producao-de-antimalaricos-e-em-estudos-sobre-doenca>. Acesso em: 19 maio 2020.

PETERS, W. The Chemotherapy of Rodent Malaria, XXII. The Value of Drug-Resistant Strains of *P. Berghei* in Screening for Blood Schizontocidal Activity. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 69, n. 2, p. 155–171, jun. 1975.

PubChem. **Atovaquone**. 2005. National Library of Medicine (NIH). Modificada em 04 abr. 2020. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atovaquone>. Acesso em: 06 abr. 2020.

- ROMAN, G.; CRANDALL, I. E.; SZAREK, W. A. Synthesis and Anti- *Plasmodium* Activity of Benzimidazole Analogues Structurally Related to Astemizole. **ChemMedChem**, v. 8, n. 11, p. 1795–1804, nov. 2013.
- RUIZ LOPEZ DEL PRADO, G. et al. Malaria in Developing Countries. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 01, p. 001–004, 15 jan. 2014.
- SAKURAI, H. et al. Antidiabetic Vanadium (IV) and Zinc (II) Complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 226, n. 1–2, p. 187–198, mar. 2002.
- SÁNCHEZ-DELGADO, R. A. et al. Toward a Novel Metal-Based Chemotherapy against Tropical Diseases. 2. Synthesis and Antimalarial Activity *in Vitro* and *in Vivo* of New Ruthenium– and Rhodium–Chloroquine Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1095–1099, jan. 1996.
- SCHÄFER, C. et al. *Plasmodium Vivax* Latent Liver Stage Infection and Relapse: Biological Insights and New Experimental Tools. **Annual Review of Microbiology**, v. 75, n. 1, p. annurev-micro-032421-061155, 8 set. 2021.
- SOUSA, C. C. Avaliação das propriedades farmacológicas de complexos de rutênio (III) conjugados com as naftoquinonas lapachol ou atovaquona como candidatos a fármacos antimaláricos. p. 91, 2021.
- SUMARI, D. et al. Malaria Prevalence in Asymptomatic and Symptomatic Children in Kiwangwa, Bagamoyo District, Tanzania. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, p. 222, dez. 2017.
- SUPAN, C. et al. Pharmacokinetics of Ferroquine, a Novel 4-Aminoquinoline, in Asymptomatic Carriers of *Plasmodium Falciparum* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3165–3173, jun. 2012.
- TIAN, J. et al. Astemizole Analogues with Reduced HERG Inhibition as Potent Antimalarial Compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6332–6344, dez. 2017.
- WICHT, K. J.; MOK, S.; FIDOCK, D. A. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in *Plasmodium Falciparum* Malaria. **Annual Review of Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 431–454, 8 set. 2020.
- UNITED KINGDOM (UK). UNITED KINGDOM NATIONAL HEALTH SERVICE (NHS). **Malária: symptoms**. Symptoms. Última revisão: 22 de Agosto de 2018. Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/malaria/symptoms/>. Acesso em: 19 maio 2020.
- UNITED STATES (US). U. S. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Treatment Guidelines: treatment of malaria (guidelines for clinicians)**. : U. S. Centers for Disease Control and Prevention, 2019. 8 p.
- UNITED STATES (US). Centers For Disease Control and Prevention (CDC). U.s. Department of Health & Human Services. **Where Malaria Occurs**. a. Fonte: Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria. Revisado em: 9 de Abril de 2020.

Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html>. Acesso em: 18 maio 2020.

UNITED STATES (US). Centers For Disease Control and Prevention (CDC). U.s. Department of Health & Human Services. **Lifecycle**: biology. Biology. b. Fonte: Global Health, Division of Parasitic Diseases and Malaria. Revisado em: 16 de Julho de 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>. Acesso em: 22 jul. 2020.

WebMD. **Atovaquone**. Disponível em: <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-6077/atovaquone-oral/details>. Acesso em: 04 fev. 2020.

World Health Organization (WHO). **World Malaria Report 2019**. Geneva: WorldHealth Organization, 2019. 232 p.

World Health Organization (WHO). **Malaria**: disease information. a. Disponível em: <https://www.who.int/ith/diseases/malaria/en/>. Acesso em: 25 fev. 2020.

World Health Organization (WHO): **Malaria**. b. Disponível em: <https://www.who.int/malaria/en/>. Acesso em: 25/02/2020

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. Geneva: WorldHealth Organization, 2022.

ZHANG, C. X.; LIPPARD, S. J. New Metal Complexes as Potential Therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, n. 4, p. 481–489, ago. 2003.

Anexo A - Novel 3- Trifluoromethyl-1,2,4-oxadiazole Analogues of Astemizole with Multi-Stage Antiplasmodium Activity and In vivo Efficacy in a Plasmodium berghei Mouse Malaria Infection Model.

Journal of Medicinal Chemistry

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Novel 3-Trifluoromethyl-1,2,4-Oxadiazole Analogues of Astemizole with Multi-Stage Antiplasmodium Activity and In vivo Efficacy in a Plasmodium berghei Mouse Malaria Infection Model

Journal:	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>
Manuscript ID	jm-2022-015165
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	15-Sep-2022

Complete List of Authors:	<p>Chibale, Kelly; University of Cape Town, Department of Chemistry Mambwe, Dickson; University of Cape Town, Department of Chemistry Korkor, Constance; University of Cape Town, Chemistry Mabhula, Amanda; University of Cape Town, Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology Ngqumba, Zama; University of Cape Town, Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology Cloete, Cleavon; University of Cape Town, Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology Kumar, Malkeet; University of Cape Town, Department of Chemistry Barros, Paula; Instituto Gonçalo Moniz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz Leshabane, Meta; University of Pretoria, Department of Biochemistry, Genetics & Microbiology Coertzen, Dina; Institute for Sustainable Malaria Control, Biochemistry, Genetics & Microbiology Taylor, Dale; University of Cape Town, Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology Gibhard, Liezl; University of Cape Town, Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology Njoroge, Mathew; University of Cape Town, Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology Lawrence, Nina; Division of clinical pharmacology, Medicine Reader, Janette; Centre for Sustainable Malaria Control, Biochemistry Moreira, Diogo Rodrigo; FIOCRUZ Bahia, IGM / LETI Birkholtz, Lyn-Marie; University of Pretoria, Institute for Sustainable Malaria Control, Biochemistry, Genetics & Microbiology Wittlin, Sergio; Swiss Tropical and Public Health Institute Egan, Timothy; University of Cape Town, Department of Chemistry</p>
---------------------------	---

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Novel 3-Trifluoromethyl-1,2,4-Oxadiazole Analogues of**
4
5
6
7 **Astemizole with Multi-Stage Antiplasmodium Activity and**
8
9
10
11 **In vivo Efficacy in a *Plasmodium berghei* Mouse Malaria**
12
13
14 **Infection Model**

15
16
17
18 Dickson Mambwe,[†] Constance M. Korkor,[†] Amanda Mabhula,[§] Zama Ngqumba,[§]
19
20 Cleavon Cloete,[§] Malkeet Kumar,[†] Paula Ladeia Barros,[♦] Meta Leshabane,^Ω Dina
21
22 Coertzen,^Ω Dale Taylor,[§] Liezl Gibhard,[§] Mathew Njoroge,[§] Nina Lawrence,[§] Janette
23
24 Reader,^Ω Diogo Rodrigo Magalhães Moreira,[♦] Lyn-Marie Birkholtz,^Ω Sergio Wittlin,^{||,⊥}
25
26
27 Timothy J. Egan,^{†,‡} and Kelly Chibale^{†,§,||,‡,*}

28
29
30
31
32 [†]*Department of Chemistry, University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa.*

33
34 [§]*Drug Discovery and Development Centre (H3D), DMPK & Pharmacology, University of Cape*
35
36 *Town, Observatory 7925, South Africa.*

37
38 [♦]*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Instituto Gonçalo*
39
40 *Moniz, CEP 40296-710 Salvador, Brazil.*

41
42 ^Ω*Department of Biochemistry, Genetics & Microbiology, Institute for Sustainable Malaria*
43
44 *Control, University of Pretoria, Private Bag X20, Hatfield 0028, Pretoria, South Africa.*

45
46 ^{||}*Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 57, 4002 Basel, Switzerland.*

47
48 [⊥]*University of Basel, 4003 Basel, Switzerland.*

49
50 ^{||}*South African Medical Research Council Drug Discovery and Development Research Unit,*
51 *University of Cape Town, Rondebosch 7701, South Africa.*

52
53 [‡]*Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, University of Cape Town, Rondebosch*
54
55 *7701, South Africa.*

ABSTRACT: Iterative medicinal chemistry optimization of an ester containing astemizole (AST) analogue **1** with an associated metabolic instability liability led to the identification of a highly potent 3-trifluoromethyl-1,2,4-oxadiazole analogue **23** (*Pf*NF54 IC₅₀ = 0.012 μM; *Pf*K1 IC₅₀ = 0.040 μM) displaying high microsomal metabolic stability (HLM CL_{int} < 11.6 μl.min⁻¹.mg⁻¹), and >1,000-fold higher selectivity over hERG compared to AST. In addition to asexual blood stage activity, the compound also shows activity against liver and gametocyte life cycle stages and demonstrates *in vivo* efficacy in *P. berghei*-infected mice at 4 × 50 mg.kg⁻¹ oral dose. Preliminary interrogation of the mode of action using live-cell microscopy and cellular heme speciation revealed that the **23** could be affecting multiple processes in the parasitic digestive vacuole, with the possibility of a novel target at play in the organelles associated with it.

Keywords: Astemizole; repositioning; *Plasmodium falciparum*; *Plasmodium berghei*; human *ether-á-go-go*-related gene (hERG); Live-cell microscopy.

INTRODUCTION

Malaria is a life-threatening infectious disease, affecting almost half of the world's population. It is caused by *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*, *Pf*) parasites and transmitted to humans by the female *Anopheles* mosquito.¹ Approximately 241 million global cases of malaria were recorded in 2020, with a mortality of 627,000. The Sub-Saharan Africa region accounted for 96% of total reported deaths,² and children under the age of 5 years were still among the most vulnerable groups. Notably, a steady decline in the global malaria mortality has been recorded between the year 2000 and 2019. This has been achieved through malaria elimination and prevention programs, increased investments in malaria research, improved diagnostic tools, and treatment among other malaria control initiatives.² However, malaria service disruptions during the COVID-19 pandemic resulted in a 12% rise in malaria deaths in 2020 compared to 2019.²

To date, the first line of treatment has been the effective artemisinin-based combination therapies (ACTs). However, reports of the emergence of resistance towards ACTs has continued to rise in western Cambodia to the Greater Mekong Subregion (GMS) and Africa, posing a serious threat to the global management and control of malaria.^{3,4} The development of novel, pan active and affordable chemotherapies with no cross resistance to existing medicines to contribute to the pipeline of drugs under development is therefore imperative.

Astemizole (AST, Figure 1) is a well-known second-generation antihistamine. However, it was withdrawn from the market in most countries due to its rare but fatal side effect, implicated by QTc prolongation, torsades de pointes, cardiac arrhythmia due to hERG K⁺ channel blockade.^{5,6} AST and its principle metabolite Desmethylastemizole (DMAST, Figure 1) were first identified to possess antimalarial properties by Chong and co-workers.⁷

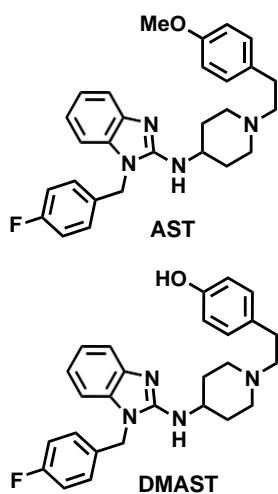


Figure 1: Chemical structures of astemizole (AST) and desmethylastemizole (DMAST)

Medicinal chemistry efforts aimed at addressing the hERG liability and optimising antimalarial activity have previously been undertaken by a few groups and ourselves. Musonda and co-workers demonstrated the potential to overcome *Pf* resistance to chloroquine (CQ) via a CQ-AST hybridization approach and identified hybrids with high *in vivo* efficacy in the *P. berghei*

1
2
3 (*Pb*) mouse infection model of malaria.⁸ Furthermore, Roman and co-workers (2013),⁹ and De
4
5 Jonghe and co-workers (2017),¹⁰ separately revealed crucial antiplasmodium structure-activity
6
7 relationships (SAR) of AST, in which the latter group identified a potent analogue (*Pf*3D7 IC_{50} =
8
9 0.030 μ M) with reduced hERG channel activity (hERG IC_{50} = 0.030 μ M; SI = 110). However,
10
11 the poor drug-likeness characterized by high lipophilicity and poor solubility of the analogues
12
13 would present development challenges.
14
15

16
17
18 To build on this work, our group initiated a project aimed at repositioning AST by expanding the
19
20 existing antiplasmodium SAR around AST and improving drug-like properties. Initially, we
21
22 reported AST analogues with improved potency, enhanced solubility and potential for multi-
23
24 stage activity against asexual blood stages (ABS, *Pf* NF54 IC_{50} 's = 0.033 – 1.9 μ M), liver stages
25
26 (*Pb* IC_{50} = 0.210 μ M), and late-stage gametocytes (stage IV/V; *Pf*LG IC_{50} 's = 1.9 – 4.1 μ M).¹¹
27
28 Furthermore, our work implicated intracellular inhibition of hemozoin formation by these
29
30 analogues within the parasite as a contributing mode of action, which supported previous
31
32 findings of interference of AST with the heme detoxification pathway.^{7,11} With the exception of
33
34 the hybridization work reported by Musonda and co-workers,⁸ all studies so far have not
35
36 progressed any analogues to proof-of-concept (PoC) *in vivo* efficacy studies. Herein, we report
37
38 SAR studies leading to novel structural analogues of AST with *in vivo* PoC in mice and
39
40 mechanistic insights using live-cell microscopy, providing significant advances over previous
41
42 studies.
43
44
45

46
47
48 An ester-containing AST analogue **1** (Figure 2) emerged with high *in vitro* *Pf* activity and
49
50 favourable solubility from our recent work; however, unsurprisingly it had poor microsomal
51
52 metabolic stability.¹² This prompted an optimization campaign to improve microsomal metabolic
53
54 stability towards identifying an AST analogue for PoC studies. While various strategies are
55
56
57

known to address ester group metabolic instability, bioisosterism is one of the most common approaches for hydrolysis-labile groups such as esters.¹³ In this regard, we focused on ring replacements for the ethyl ester group in compound **1**, particularly exploring 5-membered heterocycles to maintain spatial geometry and increase structural rigidity (Figure 2, SAR 1).^{14,15} Following the identification and fixing of a more stable ester surrogate in SAR 1, we then sought to explore other parts of the molecule in an effort to enhance potency, solubility as well as further reduce the hERG affinity and deliver a compound for *in vivo* efficacy studies.

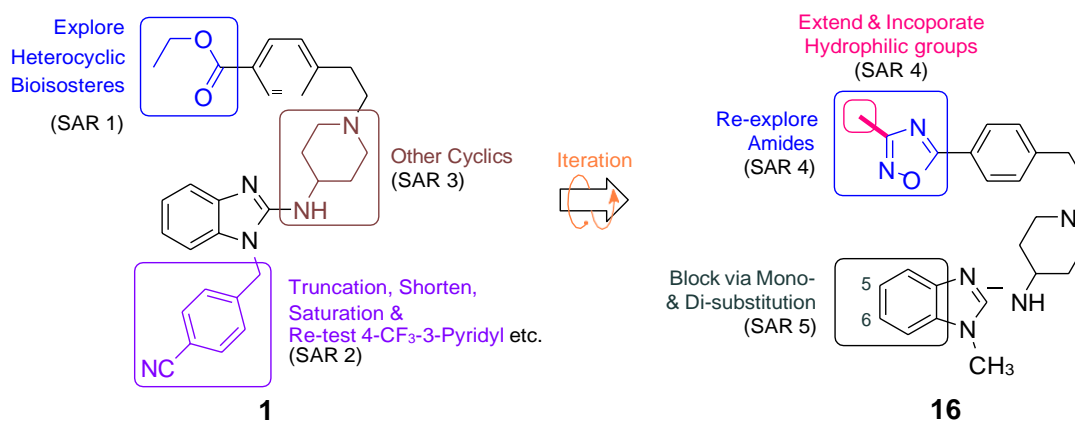
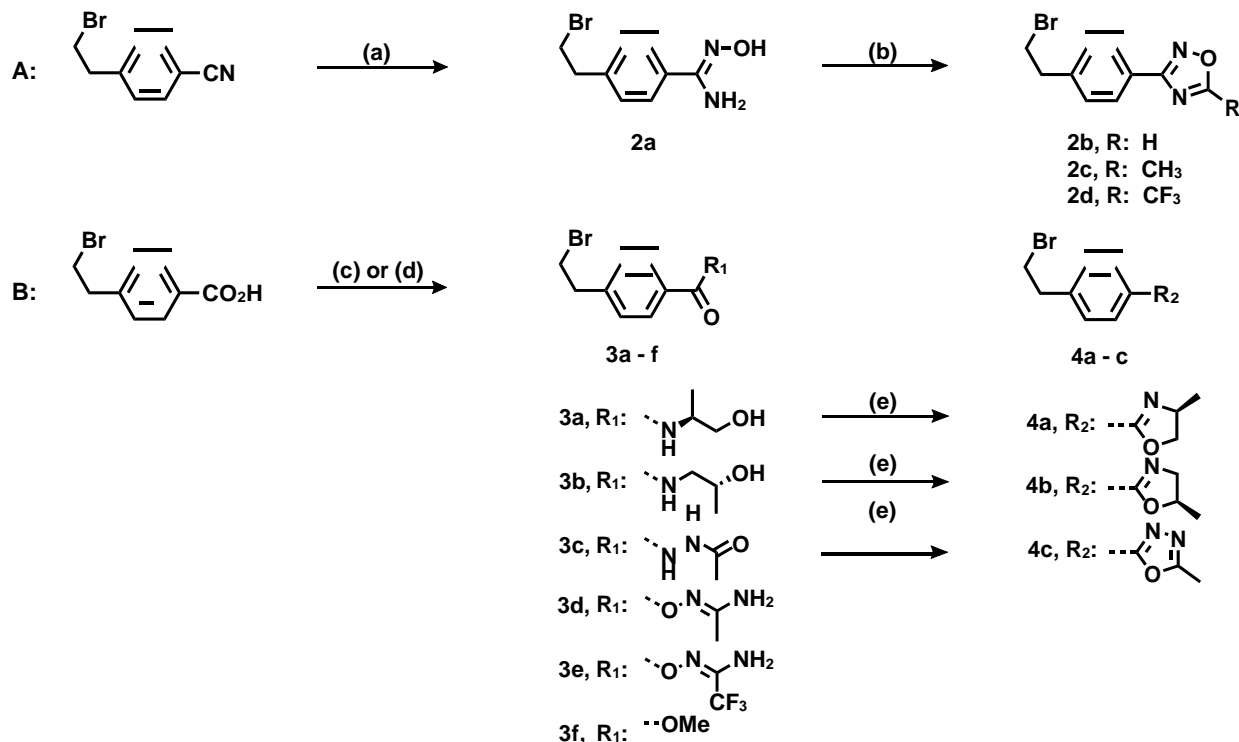


Figure 2: Progressive SAR design towards improving metabolic stability of compound **1**

In SAR 2, we revisited the previous SAR around the benzyl moiety, this time including ring saturation (Figure 2). In SAR 3, the 4-aminopiperidine linker was replaced with other cyclics not previously explored. Based on learnings from SARs 1 – 3, we iteratively replaced the 4-CN-benzyl group with *N*-methyl and explored SAR at the 3-position of the 1,2,4-oxadiazole moiety, including replacement with various amides (SAR 4, Figure 2). CYP-mediated hydroxylation of DMAST at benzimidazole position 6 is known to generate the 6-hydroxyldesmethylastemizole (6-OH-DMAST) metabolite *in vivo*, thereby contributing to the clearance of AST and DMAST.⁵ For this reason, we sought to either block or sterically hinder the 6-benzimidazole position by exploring various substituents at both positions 5 and 6 (SAR 5, Figure 2).

CHEMISTRY

The synthesis of target compounds commenced with the preparation of various phenethyl bromide intermediates (**2** – **4**) using modified literature methods (Scheme 1).^{16–20}

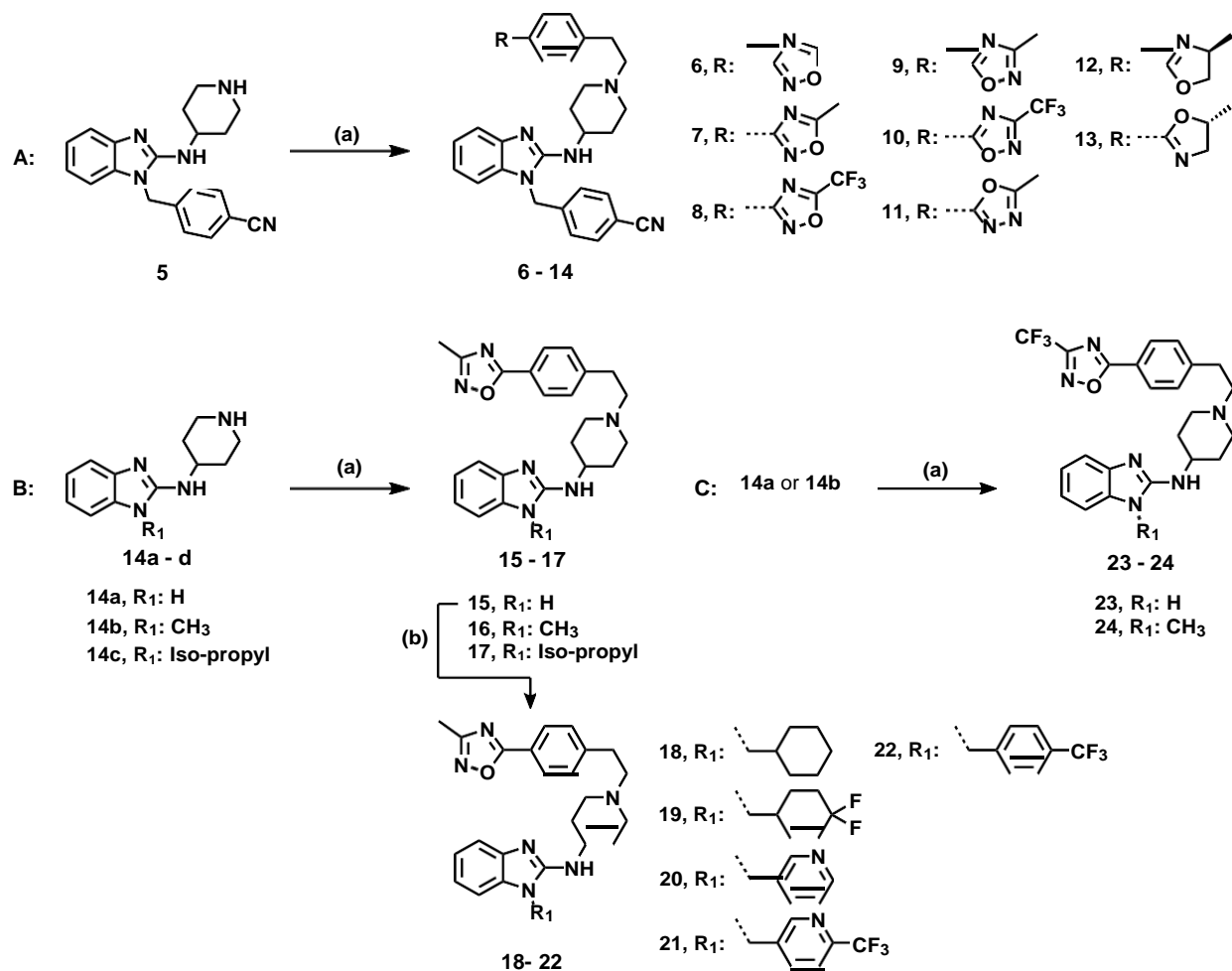
Scheme 1. Synthetic Approach for Intermediates **2** – **4**^a

Reagents and conditions: (a) (i) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 8-hydroxyquinolone, Et_2N , EtOH , 79°C , 1.5 h, (ii) 21°C , 10% HCl , pH 3 (82%); (b) for **2b**: $\text{CH}(\text{EtO})_3$, $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$, Pyridine, 80°C , 1 h (51%); for **2c**: Acetyl chloride, 50°C , 0.5 h (80%); for **2d**: $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$, DCM , Pyridine, 21°C , 20 min (76%); (c) Amine or amidoxime, EDCI, DMAP, DCM , 18°C , 2 h (65 – 91%); (d) TMS-CHN_2 , MeOH , Toluene, 21°C , 0.5 h (**3f**, 97%); (e) TsCl , Et_3N , DCM , 30°C , 0.5 h (**4a**, 70%; **4b**, 85%; **4c**, 88%).

Analogues **6** – **13** (SAR 1), and **15** – **24** (SAR 2) were synthesized by coupling phenethyl bromides **2** – **4**, or commercially sourced alkylating agents to previously reported amine intermediates **5** and **14a** – **b**, respectively (Scheme 1).¹² Compound **17** was prepared from

isopropyl intermediate **14c**, which had been synthesized following previously reported synthetic procedures.¹²

Scheme 2. Synthetic Approach for Analogues 6 – 25 (SAR 1 & 2)

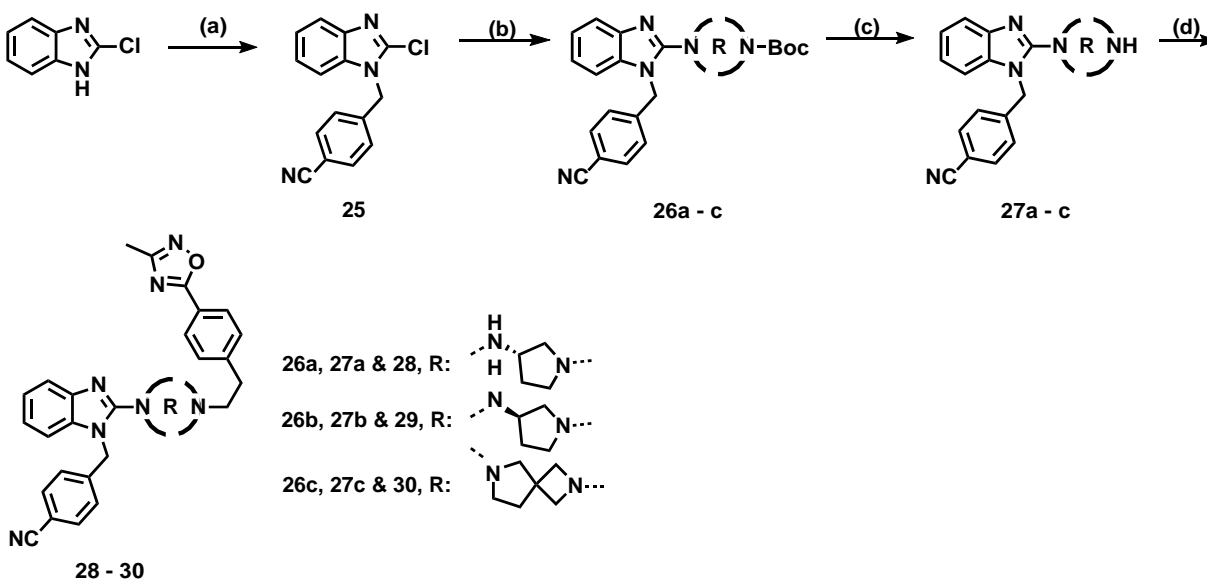


Reagents and conditions: (a) Phenethyl bromide (**2b-d**, **3d-e**, or **4a-c**), K₂CO₃, 80 °C, 5 – 12 h (48 – 91%); (b) Alkyl bromide, K₂CO₃, DMF, 70 °C, 12 h (58 – 80%).

Coupling of 2-chlorobenzimidazole and 4-(bromomethyl)benzointrile, followed by microwave-assisted nucleophilic aromatic substitution (S_NAr) with a series of commercially sourced mono *N*-Boc-protected diamines produced intermediates **26** in good yields (Scheme 3). *N*-Boc

deprotection of **26** resulted in free amine intermediates **27**, which were subjected to a final *N*-alkylation step with **3d** to afford analogues **28 – 30** in high yields.

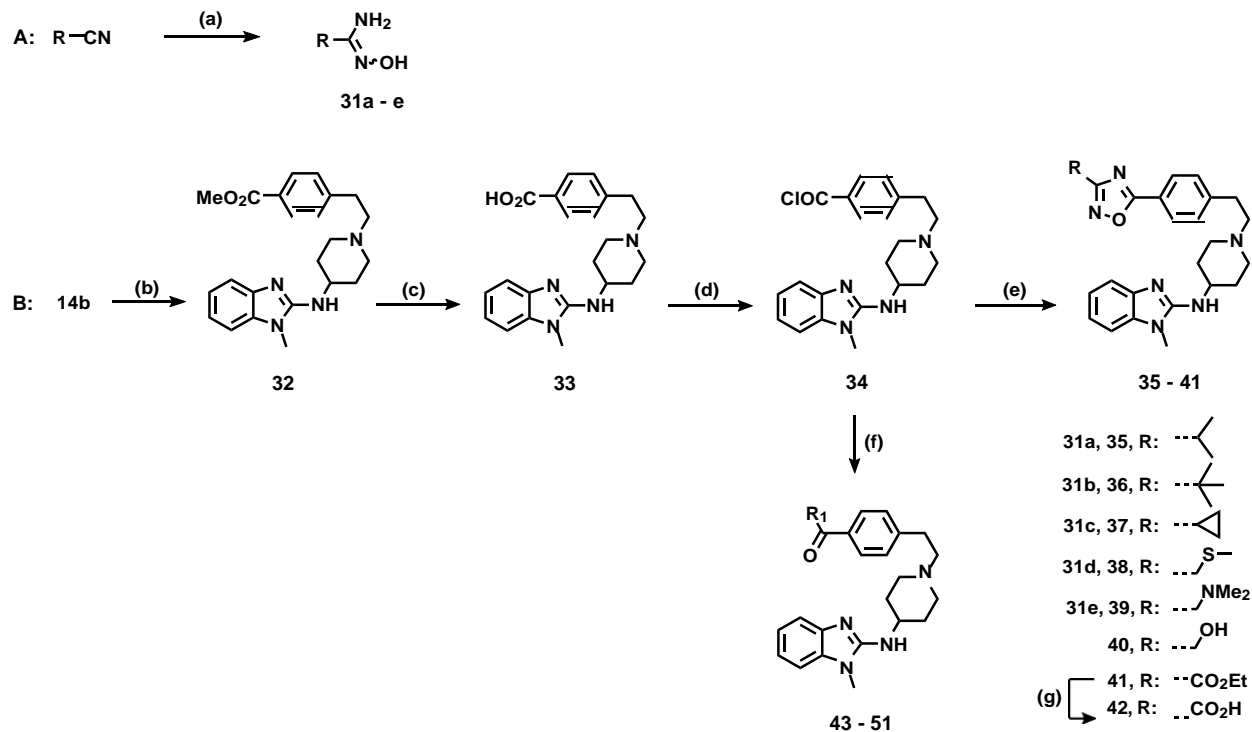
Scheme 3. Synthetic Approach for Analogues **28 – 30** (SAR 3)



Reagents and conditions: (a) 4-(bromomethyl)benzonitrile, K_2CO_3 , acetone, 23 °C, 2 h (98%); (b) *N*-Boc-amine, Et_3N , Toluene, 150 °C, μW , 5 – 30 min (55 – 78%); (c) TFA, DCM, 23 °C, 2 h (75 – 98%); (d) **3d**, K_2CO_3 , 80 °C, 10 – 24 h (67 – 80%).

In SAR 4, various amidoximes (**31**) were initially prepared from the respective nitriles using hydroxylamine hydrochloride in EtOH (Scheme 4A). Secondly, a nucleophilic substitution reaction between **14b** and **3f** afforded ester **32**, which was hydrolysed to **33**, followed by treatment with thionyl chloride to give acyl chloride **34**, quantitatively. Amidoximes (**31**) and amines were coupled to **34** in the presence of Et_3N to produce *O*-acyl amidoximes and amides (**43 – 51**), respectively. The 3-substituted-1,2,4-oxadiazoles (**35 – 41**) were directly obtained from the respective *O*-acyl amidoximes via K_2CO_3 -mediated cyclo-condensation in MeCN at 85 °C, while acid **42** was prepared from hydrolysis of ester **41** (Scheme 4B).

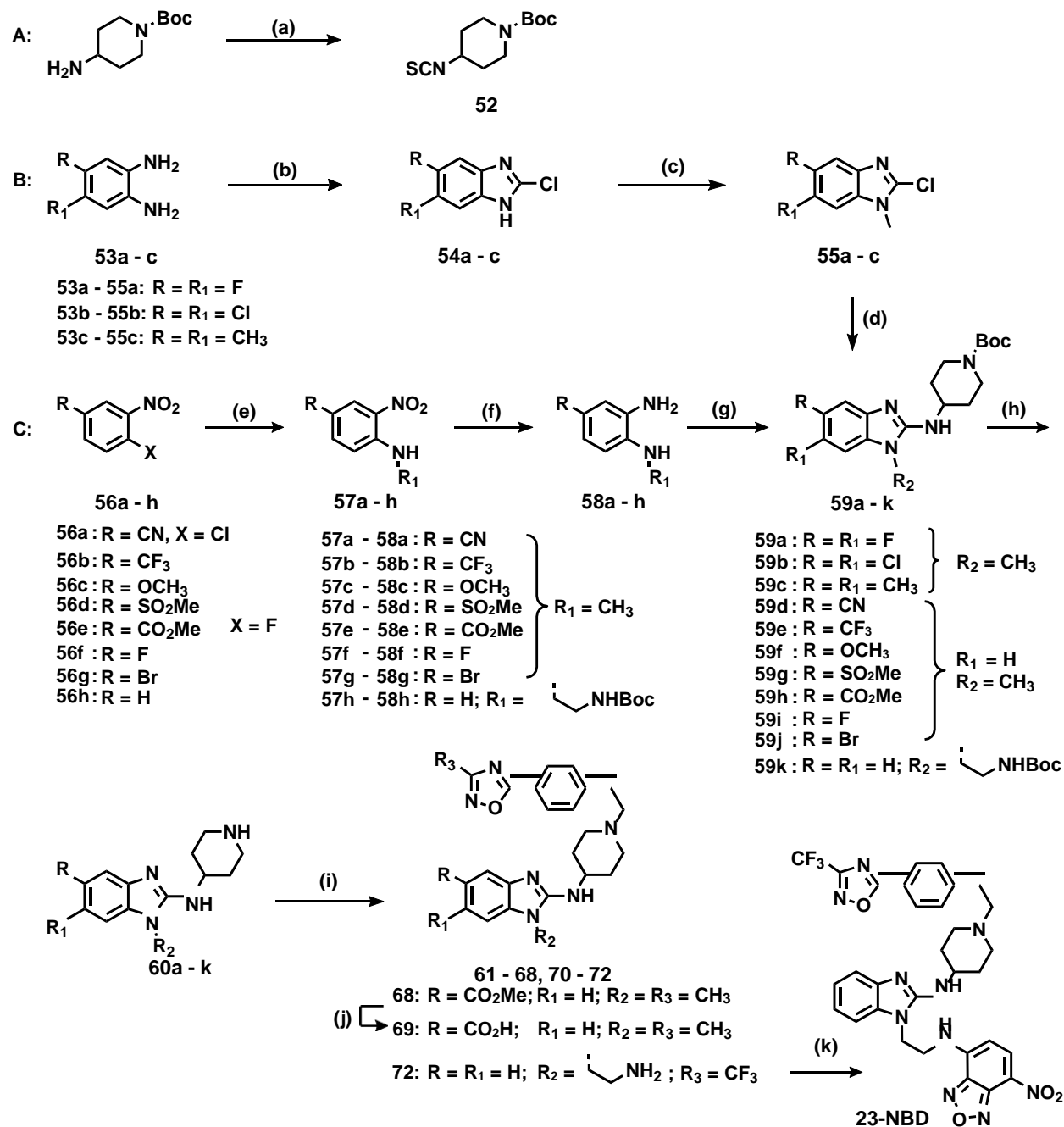
Scheme 4. Synthetic Approach for Analogues 35 – 50 (SAR 4)



Reagents and conditions: (a) $NH_2OH \cdot HCl$, 8-hydroxyquinolone, Et_3N , Ethanol, $79^\circ C$, 2 h, (70 – 95%); (b) **3f**, K_2CO_3 , $80^\circ C$, 5 h (68%); (c) 2M NaOH, MeOH, $78^\circ C$, 2 h, then 3N HCl, pH 2, $20^\circ C$ (98%); (d) $SOCl_2$, $80^\circ C$, 2 h (99%); (e) (i) Amidoxime, Et_3N , dry THF, $20^\circ C$, 2 – 10 h; (ii) K_2CO_3 , MeCN, $85^\circ C$, 16 h (44 – 60% over two steps); (f) Amine, Et_3N , dry THF, $23^\circ C$, 6 – 10 h (66 – 98%); (g) 2N NaOH, EtOH, $80^\circ C$, 2 h; then 3N HCl, pH 2, $20^\circ C$ (96%).

SAR 5 analogues were prepared *via* two converging synthetic routes (Scheme 5B and 5C) to access 5,6-disubstituted and 5-substituted benzimidazole analogues. For 5,6-disubstituted analogues, cyclization of commercially sourced 4,5-disubstituted-1,2-diamines (**53a–c**) with 1,1-carbonyldiimidazole (CDI), followed by chlorination using $POCl_3$ produced corresponding 5,6-disubstituted-2-chloro-1*H*-benzimidazoles **54a–c**.

Scheme 5. Synthetic Approach for Analogues 61 – 71 & 23-NBD (SAR 5)



Reagents and conditions: (a) 1,1-Thiocarbonyldiimidazole, DMF, 23 °C, 12 h (97%); (b) (i) CDI, DMAP, THF, 20 °C, 12 h (quant'); (ii) POCl₃, 110 °C, 12 h (58–93%); (c) CH₃I, Acetone, K₂CO₃, 23 °C, 2 h (90–97%); (d) *tert*-butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate, Et₃N, 150 °C, 2–12 h (66–85%); (e) 2M CH₃NH₂ in THF (for **57a-g**) or *N*-Boc-ethylenediamine (for **57h**), Et₃N, MeCN, 65 °C, 4–18 h, (66–96%); (f) H₂,

1
2
3 balloon, 10% Pd/C, 1:1 MeOH/EtOAc, 21 °C, 12 h (89–96%); (g) **52**, DCC, TEA, MeCN, 85 °C, 12 h
4
5 (80–95%); (h) TFA, DCM, 21 °C, 3 h (71–98%); (i) **3d** (for **61 – 71**) or **3e** (for **72**), MeCN, 85 °C, 8–12 h
6
7 (46–78%); (j) 2M NaOH, EtOH, 25 °C, 12 h; then 3N aq. HCl, pH 2, 20 °C (94%); (k) 4-Chloro-7-
8
9 nitrobenzoxadiazole, NaHCO₃, 1:1 MeCN/H₂O, 65 °C, 12 h (68%).

10
11
12 *N*-Methylation of **54a–c** using methyl iodide afforded 5,6-disubstituted-1-methyl-2-
13
14 chlorobenzimidazoles **55a–c**, which were subjected to S_NAr coupling with *N*-Boc-4-
15
16 aminopiperidine in Et₃N at 150 °C, to give **59a–c** in good yields (Scheme 5B).

17
18
19
20 On the other hand, preparation of 5-substituted analogues was initiated by S_NAr reaction between
21
22 methylamine (2M in THF) or *N*-Boc-ethylenediamine and an appropriately substituted *o*-halo-
23
24 nitrobenzene (**56a–h**) in the presence Et₃N at 65 °C in MeCN. The resulting 1-amino-2-
25
26 nitrobenzenes (**57a–h**) were subjected to a reduction [H₂, Pd/C] step to afford 1,2-diamines **58a–**
27
28 **h** in high yields (Scheme 5C). *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)-mediated cyclization of
29
30 the diamines **58a–h** with previously prepared isothiocyanate **52** (Scheme 5A) in MeCN produced
31
32 2-amino benzimidazoles **59d–k** in moderate yields (48 – 79%). *N*-Boc deprotection of **59a–k**
33
34 using TFA afforded free amines **60a–k**, which were subsequently coupled (S_N2) with **3d** to
35
36 afforded final compounds **61–68** and **70–71** in good yields. Carboxylic acid analogue **69** was
37
38 obtained *via* hydrolysis of ester **68**, while 7-nitrobenzoxadiazole (NBD) tagged fluorescent probe
39
40 **23-NBD** was prepared *via* S_NAr between corresponding amine **72** and 4-chloro-7-
41
42 nitrobenzoxadiazole (NBD-Cl).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

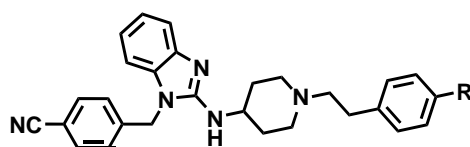
RESULTS AND DISCUSSION

In vitro Asexual Blood-Stage Antiplasmodium Activity and Solubility

All target compounds were evaluated for their *in vitro* antiplasmodium activity (Table 1) against the drug-sensitive strain of *P. falciparum* NF54 (*Pf*NF54) and aqueous turbidimetric kinetic solubility at pH 7.4. Compounds showing high activity ($IC_{50} < 0.20 \mu M$) were further screened against the multi-drug resistant (MDR) strain *Pf*K1, to assess the potential of cross-resistance with existing antimalarial drugs.

Bioisosteric Replacement of Ester Group (SAR 1). Heterocyclic 1,2,4-oxadiazole and oxazoline isosteres produced analogues with general retention of potency (*Pf*-NF54 IC_{50} 's = 0.021 – 0.104 μM , Table 1) relative to the ester compound (**1**, *Pf*-NF54 IC_{50} : 0.043 μM).

Table 1: *In vitro* antiplasmodium activity and solubility of SAR 1 analogues.



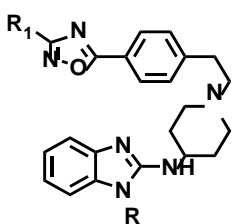
Compound	R	$PfIC_{50}$ (μM) ^a			Sol. ^c (μM)	Compound	R	$PfIC_{50}$ (μM) ^a			Sol. ^c (μM)
		NF54	K1	RI ^b				NF54	K1	RI ^b	
AST		0.086	0.370	4.3	40	9		0.097	0.178	1.8	20
1		0.043	0.052	1.2	40	10		0.022	0.027	1.2	10
6		0.089	0.399	4.5	40	11		0.519	ND		20
7		0.051	0.174	3.4	40	12		0.074	0.263	3.6	20
8		0.021	0.049	2.3	20	13		0.104	0.352	3.4	60
CQ		0.004	0.14	35	-						


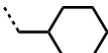
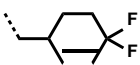
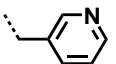
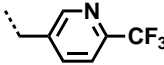
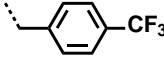
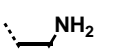
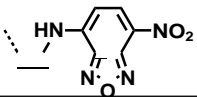
^aMean from $n \geq 2$ independent experiments with sensitive (NF54) and multidrug-resistant (K1) strains of *P. falciparum*; ^bResistance Index (RI) = [(PfK1 IC₅₀)/(PfNF54 IC₅₀)]; ^cTurbidimetric kinetic solubility at pH 7.4; ND = not determined; CQ = Chloroquine.

Interestingly, a 2-fold increase in potency was consistently observed following the introduction of methyl (5-CH₃, **7**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.051 μM) and trifluoromethyl (5-CF₃, **8**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.021 μM) substituents relative to 5-unsubstituted 1,2,4-oxadiazole analogue **6** (IC₅₀ = 0.089 μM). Similarly, reversed 3-substituted-1,2,4-oxadiazoles displayed a 4-fold potency difference between 3-CH₃ (**9**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.097 μM) and 3-CF₃ (**10**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.022 μM) analogues.

Compared to 1,2,4-oxadiazoles, activity was diminished by 12-fold in 1,3,4-oxadiazole analogue **11** (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.519 μM), an observation that may be attributed to the differences in the level of aromaticity between 1,2,4-oxadiazoles and 1,3,4-oxadiazoles. Being less aromatic, 1,2,4-oxadiazoles are more closely related to esters than 1,3,4-oxadiazole congeners are, and as a result, this potentially translates into differences in intrinsic biomacromolecule interaction between the two isomeric forms.²¹ 4-Methyl-oxazoline **12** (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.074 μM) displayed comparable activity with the 5-methyl-oxazoline congener **13** (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.104 μM). All analogues from this SAR displayed low to moderate solubility (10 – 60 μM).

Benzyl Group and Diamine Linker (SARs 2 and 3). Next, we retained the 3-CH₃-1,2,4-oxadiazole ring (**9**) and re-explored the SAR at the benzimidazole N-1 position. Consistently, activity was retained following replacement of the 4-CN-benzyl group with 4-CF₃-containing aromatic moieties (**21**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.044 μM and **22**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.030 μM), and saturated (cyclohexyl)methyl (**18**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.093 μM, Table 2).

Table 2: *In vitro* antiplasmodium activity and solubility of SAR 2 analogues and NBD-probe **72**.


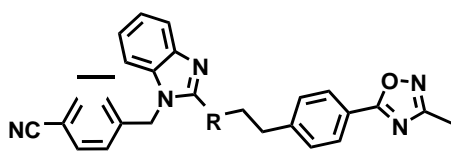
Compound	R	R ₁	<i>Pf</i> IC ₅₀ (μM) ^a		RI ^b	Sol. ^c (μM)
			NF54	K1		
15	H		0.055	0.176	3.2	80
16	CH ₃		0.033	0.082	2.5	160
17			0.702	-	1.3	20
18			0.093	0.156	1.7	80
19		CH ₃	0.460	-		20
20			0.304	-		ND
21			0.044	0.173	3.9	40
22			0.030	0.104	3.5	10
23	H		0.012	0.040	3.3	100
24	CH ₃		0.066	0.048	0.7	160
71^d		CF ₃	0.090	0.036	0.40	>200
23-NBD^d			0.140	0.370	2.64	120
CQ			0.004	0.14	35.0	-

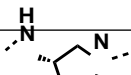
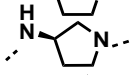
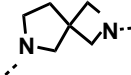
^aMean from $n \geq 2$ independent experiments with sensitive (NF54) and multidrug-resistant (K1) strains of *P. falciparum*; ^bResistance Index (RI) = [(*Pf*K1 IC₅₀)/(*Pf*NF54 IC₅₀)]; ^cTurbidimetric kinetic solubility at pH 7.4; ^dthese compounds were tested at Swiss TPH using the 72 h [³H] hypoxanthine incorporation assay, ND = not determined; CQ = Chloroquine.

1
2
3 Interestingly, *N*-methyl analogue (**16**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.033 μM) and truncation of the benzyl
4
5 group (**15**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.055 μM) produced compounds with high activity and solubility
6
7 (>80 μM). Previously, this change drastically reduced activity in analogues containing a cyano
8
9 (CN) group in place of the oxadiazole ring.¹²
10

11
12 Conversely, isopropyl (**17**) and (4,4-difluorocyclohexyl)methyl (**19**) analogues displayed reduced
13
14 activities (Table 2) and low solubility (20 μM). Inspired by the identification of **15** and **16**, and
15
16 the superior activity of 3-/5-CF₃ containing 1,2,4-oxadiazole analogues (**8** and **10**), we
17
18 synthesized compounds **23** and **24**. Gratifyingly, **23** demonstrated a significant (4.6-fold)
19
20 increase in potency (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.012 μM) compared to **15**, while a 2-fold potency drop was
21
22 observed in **24** (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.066 μM) relative to **16**, albeit maintaining high solubility
23
24 profiles (160 μM).
25
26
27

28
29 Using **9** as the benchmark, we next re-explored the 4-aminopiperidine linker SAR by
30
31 replacement with (R)- and (S)-3-amino pyrrolidine, and 2,6-diazaspiro[3.4]octane (**28** – **29**,
32
33 Table 3). All three analogues had comparable activities (**28** – **30**, Table 3), albeit ~5-fold lower
34
35 compared to **9**. Additionally, all analogues in this SAR showed low to moderate solubility (40 –
36
37 80 μM).
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 3: *In vitro* antiplasmodium activity and solubility of SAR 3 analogues.


Compound	R	<i>Pf</i> -NF54 IC ₅₀ (μM) ^a	Sol. ^c (μM)
28		0.515	80
29		0.448	80
30		0.446	40
CQ		0.004	-

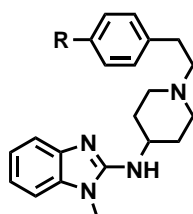
^aMean from $n \geq 2$ independent experiments with sensitive (NF54) and multidrug-resistant (K1) strains of *P. falciparum*; ^bTurbidimetric kinetic solubility at pH 7.4; ND = not determined; CQ = Chloroquine.

Exploring 3-position of 1,2,4-oxadiazole Moiety and Amidation (SAR 4): In this SAR, compound **16** was iteratively used as a template to derive further analogues. We envisaged that *N*-methyl containing analogues would possess lower molecular weight, aromatic character, and lipophilicity ($\text{clog}P$), which would potentially translate into favorable solubilities, and reduced hERG channel inhibition.

Functionalization of the 1,2,4-oxadiazole moiety at the 3-position by introducing both alkyl and polar atom (group)-containing moieties produced analogues with up to >15-fold lower activity (**35**, *Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.492 μM , Table 4), compared to **16**. However, the *tert*-butyl analogue **36** (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.064 μM) retained high activity and was equipotent to **24** (*Pf*-NF54 IC₅₀ = 0.066 μM). This is not entirely surprising as the *tert*-butyl group has been widely used as an effective CF₃-group surrogate. No apparent difference in activity was observed between cyclopropyl and isopropyl (**35** and **37**) groups, attributable to subtle steric differences between

the two groups.^{22,23} Incorporation of a carboxylic acid moiety at this position was detrimental to activity (**42**, *Pf*-NF54 IC₅₀ > 6.0 μM), a consistent trend observed for all carboxylic acid-containing analogues of AST (i.e., **33**). Solubility was consistently lower in analogues containing alkyl groups compared to those with polar atoms (Table 4).

Table 4: *In vitro* antiplasmodium activity and solubility of SAR 4 analogues.



Compound	R	<i>Pf</i> IC ₅₀ (μM) ^a		RI ^b	Sol. ^c (μM)	Compound	R	<i>Pf</i> NF54 IC ₅₀ (μM) ^a	Sol. ^c (μM)
		NF54	K1						
32		1.450	-		120	42		4.17	120
32b		>6	-		160	43		1.73	60
34		0.492	-		60	44		>6	100
35		0.064	0.30	4.6	60	45		2.61	80
36		0.484	-		60	46		3.99	80
37		0.383	-		80	47		>6	80
38		0.831	-		120	48		>6	80
39		0.567	-		100	49		3.41	120
41		>6	-		120	50		1.28	60
CQ		0.004	0.14	35	-				

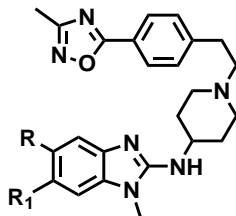
^aMean from n ≥ 2 independent experiments with sensitive (NF54) and multidrug-resistant (K1) strains of *P. falciparum*; ^bResistance Index (RI) = [(*Pf*K1 IC₅₀) / (*Pf*NF54 IC₅₀)]; ^cTurbidimetric kinetic solubility at

pH 7.4; ND = not determined; CQ = Chloroquine.

1
2
3 All amides displayed low antiplasmodium activities (**42** – **50**, *Pf*-NF54 $IC_{50} > 1.70 \mu M$), with an
4 unclearly discernable antiplasmodium SAR within the set of analogues prepared. Coupled with
5 the observed high activity derived from analogues **15** and **16**, this suggested the apparent
6 existence of SAR between the presence (or absence) of the benzyl group at *N*-1, relative to an
7 appropriate functionality at the 4-position of the lateral phenyl group. All amides exhibited
8 moderate to high solubility (60 – 180 μM).
9
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **Benzimidazole Ring Substitution (SAR 5):** We next investigated substitution of the
19 benzimidazole ring at positions 5 and 6 in front runner **16**. Activity was generally diminished
20 across the SAR (Table 5).
21
22

23
24 Noteworthy, 5,6-dimethyl analogue **61** (*Pf*-NF54 $IC_{50} = 0.163 \mu M$) displayed the highest activity
25 overall, and in comparison, with halogen match pairs 5,6-F **62** (*Pf*-NF54 $IC_{50} = 1.16 \mu M$) and
26 5,6-Cl **63** (*Pf*-NF54 $IC_{50} = 0.514 \mu M$). Chloro substitution was better tolerated than fluoro
27 substitution, resulting in ~2-fold higher activity in both the mono- and disubstituted fluoro
28 congeners (**70**, *Pf*-NF54 $IC_{50} = 0.834 \mu M$ and **62**, *Pf*-NF54 $IC_{50} = 1.161 \mu M$). Consistently,
29 activity was lost in carboxylic acid derivative **69** (*Pf*-NF54 $IC_{50} > 6 \mu M$) albeit displaying high
30 solubility (Sol. = 160 μM).
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 5: *In vitro* antiplasmodium activity and solubility of SAR 5 analogues.

Compound	R	R ₁	<i>Pf</i> NF54 IC ₅₀ (μM) ^a	Sol. ^c (μM)	Compound	R	R ₁	<i>Pf</i> NF54 IC ₅₀ (μM) ^a	Sol. ^c (μM)
60	CH ₃	CH ₃	0.163	60	66	SO ₂ Me		4.651	60
61	F	F	1.161	80	67	CO ₂ Me		0.496	120
62	Cl	Cl	0.514	80	68	CO ₂ H	H	>6	160
63	CN		0.611	80	69	F		0.834	80
64	CF ₃	H	0.422	40	70	Br		0.720	80
65	OMe		0.309	80	CQ ^f			0.004	

^aMean from $n \geq 2$ independent experiments with sensitive (NF54) and multidrug-resistant (K1) strains of *P. falciparum*; ^bResistance Index (RI) = [(*Pf*K1 IC₅₀)/(*Pf*NF54 IC₅₀)]; ^cTurbidimetric kinetic solubility at pH 7.4; ND = not determined; CQ = Chloroquine.

No potential for cross-resistance with existing antimalarial drugs was observed in analogues from this work based on the low resistance indices (RI < 5) with the *Pf*K1 strain (Tables 1 – 2 and 4).

Metabolic Stability. Active compounds (*Pf*NF54-IC₅₀ < 0.10 μM) with moderate solubility (> 20 μM) were evaluated for their microsomal metabolic stability using mouse and human liver microsomes (MLM and HLM, Table 6).²⁴ Following the replacement of the labile ethyl ester (**1**, MLM CL_{int} = 323 μl.min⁻¹.mg⁻¹) group with heterocyclic surrogates, 3-unsubstituted 1,2,4-oxadiazole **6** (MLM CL_{int} = 266 μl.min⁻¹.mg⁻¹) still showed a high metabolic instability profile

1
2
3 compared to 3-CH₃-(**7**, MLM CL_{int} = 67.4 μl.min⁻¹.mg⁻¹) and 3-CF₃-(**8**, MLM CL_{int} = 26.4
4
5 μl.min⁻¹.mg⁻¹) substituted match pairs in which the 3-position is blocked. Oxazoline derivative
6
7 **12** (MLM CL_{int} = 71.3 μl.min⁻¹.mg⁻¹) also showed marked improvement, albeit sub-optimal
8
9 (MLM CL_{int} > 12 μl.min⁻¹.mg⁻¹; ≤ 95% remaining) especially in the rodent strain (MLM) across
10
11 the SAR. This was, however, circumvented following the truncation of the benzyl group and
12
13 retaining the 3-CF₃-1,2,4-oxadiazole moiety (**23** and **24**, MLM CL_{int} < 11.6 μl.min⁻¹.mg⁻¹).
14
15
16
17

18 **Table 6: In vitro Microsomal Metabolic Stability of Selected Analogues**
19

20

Compound	Intrinsic Clearance, CL _{int}		clogP ^a
	MLM	HLM	
AST	147	107	5.70
1	373.2	431.3	5.22
6	266	167.9	4.80
7	67.4	22.8	5.12
8	26.4	19.2	5.42
9	86.4	23	5.12
12	71.3	88.9	5.23
15	<11.6	<11.6	4.08
16	43.6	19.7	4.28
18	123.9	200.4	5.88
21	40.7	31.9	5.08
22	18.9	11.6	5.94
23	<11.6	<11.6	4.30
24	<11.6	<11.6	4.51
35	18.4	15.2	5.15

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 MLM = mouse liver microsomes; and HLM = human liver microsomes, expressed as percent (%) of drug
51 remaining after incubation with microsomes for 30 minutes. CL_{int} = predicted intrinsic clearance in
52 μl.min⁻¹.mg⁻¹. Mean from n ≥ 2 independent experiments. ^aDetermined using StarDrop Software, Version
53
54 6.11.
55
56
57

1
2
3 Unaided by metabolite identification experiments, this suggested that microsomal metabolism
4
5 (i.e., phase I) also occurred in the benzyl moiety, in addition to the ester group in compound **1**.
6
7 Consistent with literature, 3-/5-**CH**₃-1,2,4-oxadiazole containing analogues (i.e., **7** and **16**)
8
9 generally exhibited lower stability compared to 3-/5-**CF**₃-1,2,4-oxadiazole containing analogues
10
11 (i.e., **8** and **24**, Table 6).
12
13
14
15

16 ***In vitro* Antigametocytic and Liver-Stage Activity:** To assess activity of the analogues during
17
18 other *Plasmodium* life-cycle stages in line with target candidate profile 3 (TCP3) for new
19
20 antimalarials,²⁵ and based on previously observed multi-stage activity of AST and some of its
21
22 analogues,^{11,26} selected analogues from this series were assessed for their antiplasmodium sexual
23
24 (gametocyte) and liver-stage properties.
25
26

27
28 20 analogues representing the structural diversity of each SAR were subjected to a dual-point
29
30 screen against early and late-stage gametocytes (EGs, II/III; LGs, IV/V) at 1.0 μM and 5.0 μM
31
32 (Supporting Information Table S1) in a luciferase assay that allows for the determination of
33
34 stage-specific gametocytocidal activity. None of the tested compounds showed high inhibitory
35
36 activity (< 50% inhibition) in both EGs and LGs at 1.0 μM. However, 9 analogues showed
37
38 moderate (50 – 70% inhibition) to good activity (>70% inhibition) at 5 μM, and predominantly
39
40 against EGs (Table S1). IC₅₀ values were only determined for compounds showing activities
41
42 >80% in the dual point assay. Notably, compounds devoid of the 4-CN-benzyl (or an aromatic
43
44 moiety at benzimidazole *N*-1 position, i.e., AST) displayed higher activity against EG's than
45
46 against LGs. Structurally related frontrunners **23**, **24**, and **36** showed the highest activities with
47
48 IC₅₀'s in the low micromolar range (*Pf*EG IC₅₀ = 1.18 – 1.67 μM, Table 7) and > 2-fold higher
49
50 compared to AST's activity against LGs (*Pf*LG IC₅₀ = 3.35 μM, Supporting Information Table
51
52 S1).¹¹
53
54
55
56
57

Table 7: *In vitro* antiplasmodium Life-Cycle Stage Activity Data

Compound	IC ₅₀ , (μM)	
	<i>Pf</i> EG ^a	<i>Pb</i> HepG2 ^b
AST	-	0.59 ± 0.21
23	1.52 ± 0.25	0.49 ± 0.18
24	1.67 ± 0.28	0.21 ± 0.09
36	1.18 ± 0.28	-

^aEarly stage Gametocytes (EG Stages I/III), reference drug methylene blue (*Pf*EG IC₅₀ = 0.2 μM);

^b*Plasmodium berghei* (*Pb*)-infected HepG2 cells, reference drug Primaquine (IC₅₀ = 6.0±1.4 μM).

Activity against liver stage infection was assessed using *P. berghei* in the HepG2 cell line. A preliminary single-point (1.0 μM) screen of only compounds with high *in vitro* ABS activity (*Pf*-NF54 IC₅₀ < 0.1 μM) and high microsomal metabolic stability (**15**, **23**, **24**, and **36**) showed that only **23** and **24** exhibited >75% reduction of parasite load with IC₅₀'s of 0.49 and 0.21 μM, respectively (Table 7 and Figure 3). HepG2 cell confluency was assessed in parallel for each compound, as a measure of cytotoxicity (Supporting Information Table S2). Gratifyingly, no cytotoxicity was observed for all four compounds. (SI's > 80).

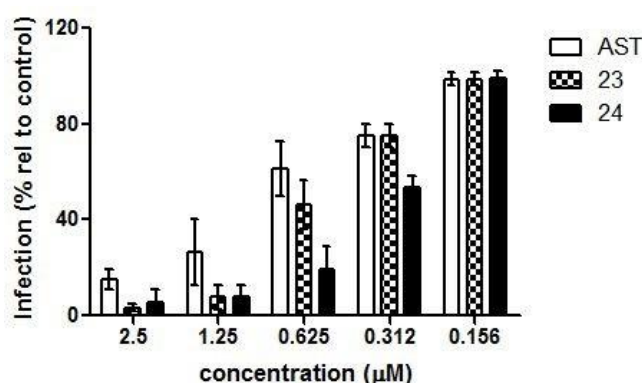


Figure 3. Concentration dependent inhibition of *P. berghei*-sporozoite infection in HepG2 cells. Values are mean, and error bars are standard deviation normalized from untreated cells (negative control)

1
2
3 ***In vitro* hERG Channel Inhibition Activity.** Representative analogues from the five SARs
4
5 were profiled for the potential for cardiotoxicity risk by assessing their hERG K⁺ channel
6
7 inhibitory activity (Supporting Information Table S3). The selection was made to best represent
8
9 the various approaches used towards attenuating the hERG liability.
10

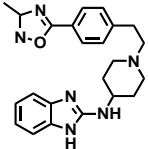
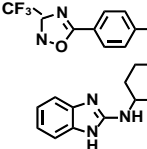
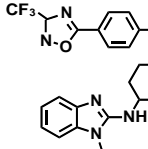
11
12
13 Although hERG inhibition is still an issue, all tested compounds showed lower hERG inhibitory
14
15 concentrations (IC₅₀ > 0.10 μM) compared to AST. Zwitterion furnishing compounds (**42**, **69**)
16
17 and amides (**44**, **50**: hERG IC₅₀ ≥ 30 μM) displayed the least hERG channel inhibitory activity,
18
19 albeit accompanied by poor selectivity's (hERG SI < 18), as a result of equally low *in vitro Pf*
20
21 activity. Similarly, removal of an aromatic moiety (i.e., **16**), ring saturation (i.e., **18**) and other
22
23 lipophilicity lowering strategies (i.e., **67**) proved ineffective towards achieving high selectivity
24
25 over hERG. Generally, high *Pf* inhibitors also produced relatively high hERG channel inhibition
26
27 and vice-versa. However, higher selectivity's (hERG SI ≥ 19) were generally achieved in
28
29 analogues with exceptional potency against *Pf*. These notably include 1,2,4-oxadiazole
30
31 derivatives containing a CF₃ (**23** and **10**) and *t*-butyl (**36**) groups. Frontrunner compound **23**
32
33 (hERG IC₅₀ = 0.63 μM; SI = 53) represents ~1,071-fold higher selectivity compared to AST
34
35 (hERG IC₅₀ = 0.0042 μM).
36
37
38
39
40
41

42 **Cytotoxicity.** Analogues showing high antiplasmodium activity (*Pf*NF54-IC₅₀ < 0.10 μM) were
43
44 profiled for cytotoxicity against the Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line. No cytotoxicity
45
46 was observed in this cell line, as all the tested compounds displayed ideal selectivity margins (SI
47
48 > 34, Supporting Information Table S3).
49

50
51 ***In vivo* Efficacy in Mice.** Compounds **15**, **23** and **24** (Table 8) were assessed for their *in vivo*
52
53 efficacy in the *P. berghei* mouse infection model of malaria based on their high *in vitro* activity
54
55 (*Pf*NF54 IC₅₀ < 0.10 μM), solubility and metabolic stability (MLMs CL_{int} < 11.6 μl.min⁻¹.mg⁻¹).
56
57

In a standard quadrupole oral dose regimen of 50 mg.kg⁻¹, **15**, **23** and **24** showed 40%, 99.5% and 90% reduction in parasitemia, respectively, relative to untreated mice (Table 8).

Table 8: In vivo Efficacy after Oral Dosing in *P. Berghei*-infected Mice at 4 × 50 mg.kg⁻¹

	15	23	24
Parameter			
dose (mg.kg ⁻¹)	4 × 50	4 × 50	4 × 50
activity (%)	40	99.5	90
MSD*	4 ^a	14	9

*MSD = mean survival days. ^aMice were euthanized on day 4 in order to prevent expected death otherwise occurring at day 6 due to high parasitemia.

The high efficacy of **23** correlated to its high *in vitro* potency (*Pf*NF54 IC₅₀ 0.012 μM), although curative effects were not observed at this dose (mouse mean survival of < 30 days, Table 8). Chloroquine (CQ) was used as the reference drug, achieving 99.9% reduction in parasitemia when dosed orally at 4 × 30 mg.kg⁻¹, with a mouse mean survival of 24 days.

Pharmacokinetic Studies in Mice. When dosed intravenously (IV, 3 mg.kg⁻¹), **15** showed low clearance from blood (16.6 ml.min⁻¹.kg⁻¹, Table 9) with moderate tissue distribution (13.6 L.kg⁻¹) resulting in a long half-life (11.6 h). Oral dosing of **15** at 10 mg.kg⁻¹ revealed rapid absorption (*T*_{max} = 1.5 h) with moderate bioavailability (29.3%).

Table 9: Mouse Pharmacokinetic Parameters of 15 and 23.

Parameter	15			23		
	iv	oral		iv	oral	
dose (mg.kg ⁻¹)	3	10	50	3	10	50
C _{max} (μM)	-	1	5.9	-	0.3	1.5
T _{max} (h)	-	1.5	3.0	-	0.7	1.7
apparent t _{1/2} (h)	11.6	10.3	9.2	4.2	1.1	10.2
CL _{int} (ml.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	16.6	-	-	71.7	-	-
V _d (L.kg ⁻¹)	13.6	-	-	26.6	-	-
AUC _{0-∞} (μM.min ⁻¹)	550	535	5548	93.4	48	1429
F (%)	-	29.3	61	-	15.6	93.3

On the other hand, IV dosing of **23** at 3 mg.kg⁻¹ showed rapid clearance (71.7 ml.min⁻¹.kg⁻¹), albeit tissue distribution was high (26.6 L.kg⁻¹) with a moderate half-life (4.2 h). Orally, **23** (T_{max} = 0.7 h) was absorbed 2-fold faster than **15** at 10 mg.kg⁻¹, and bioavailability was equally 2-fold lower and suboptimal (15.6%) at that dose. However, **23** displays a dose-dependent PK profile, as demonstrated by a greater than dose proportional increase in oral exposure at 50 mg.kg⁻¹ relative to the 10 mg.kg⁻¹ dose.

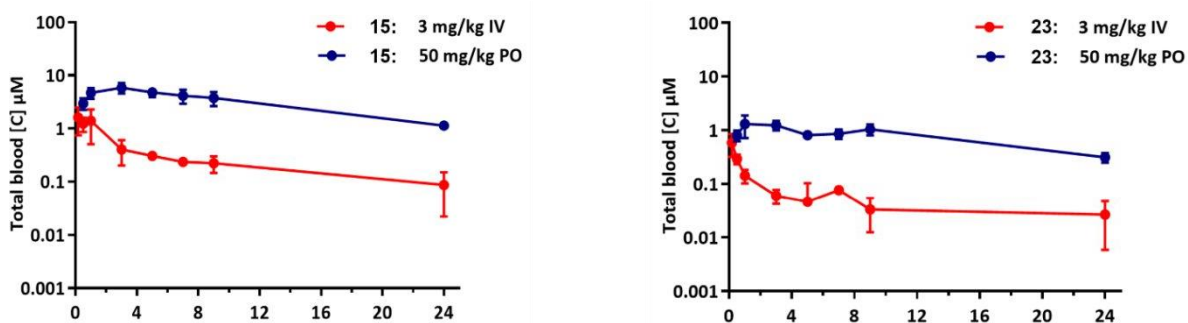


Figure 4: Blood concentrations of **15** and **23** following *intravenous* (iv) and oral (p.o.) dosing in healthy BalbC mice

This increased *in vivo* exposure, combined with the higher *in vitro* whole-cell *Pf* potency against ABS (**23** IC₅₀ = 0.012 μM vs **15** IC₅₀ = 0.055 μM) likely explains the better *in vivo* efficacy of **23**.

1
2
3 **Mechanistic Studies.** *Live-cell Microscopy Assay.* To shed light on the mechanism of action
4
5 (MoA) of this class of compounds, **23** was initially investigated for its intrinsic fluorescence for
6
7 *P. falciparum* live-cell imaging of using a fluorimeter. Excitation between 200 – 400 nm and
8
9 emission between 400 – 800 nm at 1.0 μM showed no significant response compared to the
10
11 blank in both DCM and DMSO (Figure S3). This prompted the attachment of an extrinsic
12
13 fluorophore to enable live-cell imaging. NBD was chosen based on its ready availability, small
14
15 size, and stability over a biologically relevant pH range.²⁷ Its attachment point to **23** at *N*-1 was
16
17 solely guided by SAR studies already described. Gratifyingly, the NBD-labeled derivative
18
19 (probe) retained sub-micromolar *in vitro Pf* activity (**23**-NBD, *Pf*-NF54 IC_{50} = 0.140 μM ; Table
20
21 2). The probe was subjected to super-resolution structured illumination microscopy (SR-SIM) to
22
23 assess sub-cellular accumulation in *Pf*-infected cells. This was carried out using commercially
24
25 available organelle trackers LysoTracker Red, MitoTracker Deep Red, DRAQ5, ER-Tracker Red
26
27 and Nile Red (Figure 4A – E).
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

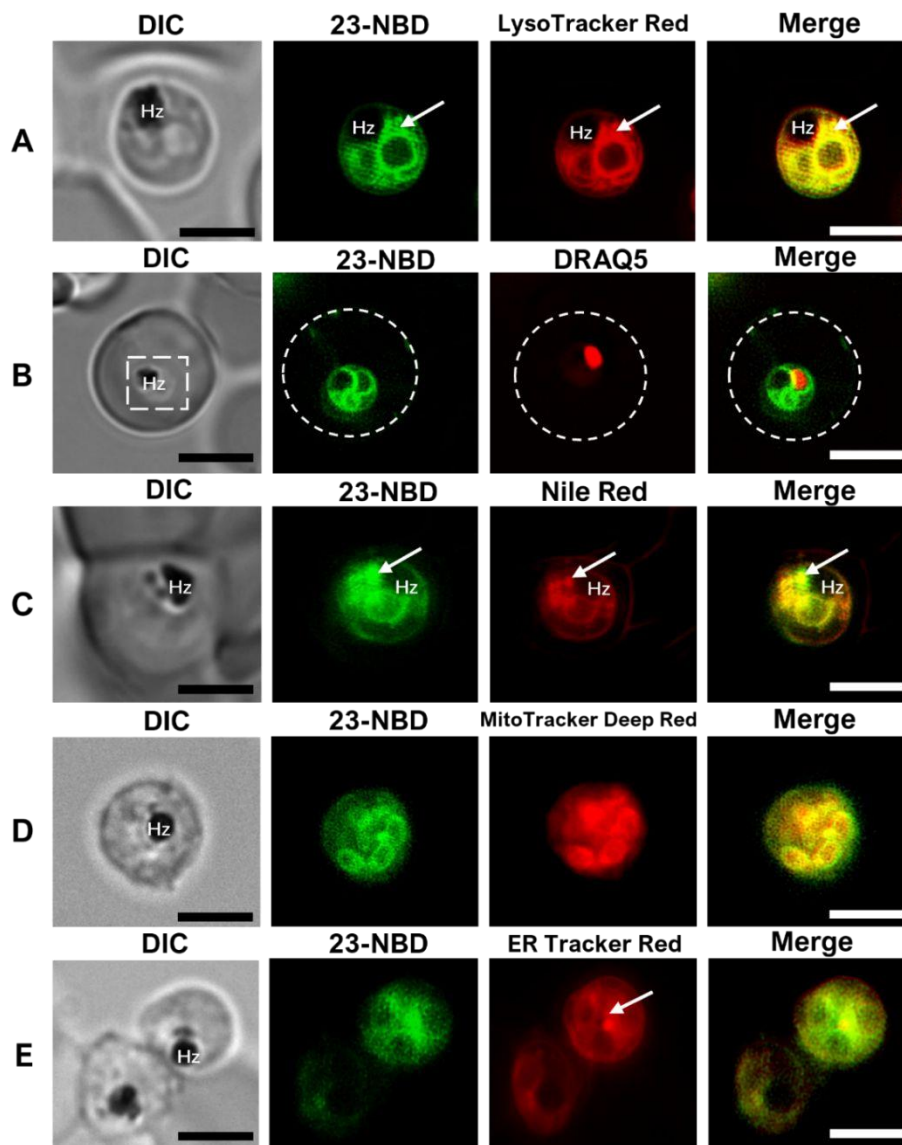


Figure 4: Live-cell SR-SIM of *P. falciparum*-infected erythrocyte treated with 23-NBD (Green, Panels A – E), with LysoTracker Red (Red, Panel A), with nuclear marker DRAQ5 (Red, Panel B), with Lipid Marker Nile Red (Red, Panel C), with MitoTracker Deep Red (Red, Panel D), and with ER Tracker Red (Red, Panel E). White arrows indicate areas of intense localization of the dye and regions of complete overlap are shown in the merged image (Yellow). Scale Bars: 5 micrometres (μm). Hz: Hemozoin; DIC: differential interference contrast.

1
2
3 These fluorescent dyes are capable of illuminating respective membranes of acidic organelles
4 like the parasite's digestive vacuole (DV), the mitochondrion, nucleus, endoplasmic reticulum,
5 and lipids, respectively.^{28–30}
6
7

8
9
10 The result revealed complete accumulation between **23**-NBD and the LysoTracker Red (Figure
11 4A). Regions of highest accumulation were observed around the hemozoin (Hz) crystals, thereby
12 implicating the parasite's digestive vacuole as a plausible site of action of **23**-NBD. Conversely,
13 no colocalization was observed between **23**-NBD and DRAQ5, eliminating the nucleus as a
14 possible site of action (Figure 4B).
15
16
17
18
19

20
21
22 Lipids have been shown to play vital roles during the asexual blood stage of the parasite's life
23 cycle. Precisely, neutral lipids have been implicated in the formation of β -hematin *in vitro* and
24 have been found at the site of Hz formation *in vivo*. It is believed that neutral lipids may serve as
25 a site for Hz biocrystallization.³¹ Following significant accumulation of **23**-NBD around the Hz
26 crystals, accumulation with the parasite's neutral lipids was also assessed. Neutral lipid droplets
27 were found in close proximity to the Hz crystals and these droplets colocalize with **23**-NBD
28 (Figure 4C). Coupled with accumulation of the NBD probe (**23**-NBD) in the DV, this data
29 reiterates inhibition of hemozoin formation as a possible contributing mechanism of action for
30 compound **23**.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42
43 Aside from the digestive vacuole, the parasite possesses other organelles that equally play
44 significant roles during the blood stage of the parasite's life cycle such as the mitochondrion and
45 the endoplasmic reticulum (ER). These organelles have previously been shown to be clinically
46 relevant drug targets.³² Consequently, we examined the ER and the mitochondrion in
47 conjunction with **23**-NBD. When incubated with MitoTracker Deep Red, we observed localized
48 tube-like structures corresponding to the mitochondrion within the parasite. These structures
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 partially colocalized with regions of high signal intensity from the **23**-NBD (Figure 4D). This
4
5 indicates some extent of colocalization between the mitochondrion and the compound. Also,
6
7 significant colocalization was observed between the punctuate structure revealed by the ER
8
9 Tracker red and the diffused signal from the **23**-NBD (Figure 4E). Making both organelles a
10
11 potential site of action of compound **23**.
12
13

14
15 *Hemozoin formation Inhibition.* To augment the results from the SIM-SR microscopy which
16
17 suggests inhibition of hemozoin formation as a plausible MoA of this class of compounds, and
18
19 based on precedence from previous findings on AST and its analogues,^{7,11,12} a selected number
20
21 of active analogues across the SAR (*Pf*NF54-IC₅₀ < 0.100 μM) including **23** were evaluated for
22
23 their inhibition of β-hematin (βH) formation (Supporting Information Table S4).³³ We conjured a
24
25 100 μM discriminatory IC₅₀ to identify strong inhibitors from this assay. Eight (8) of the fourteen
26
27 (14) tested compounds blocked βH formation (Figure S3), while three (3) compounds (**8**, **10** and
28
29 **21**) displayed activities comparable to standard βH formation inhibitors such as amodiaquine
30
31 (IC₅₀: 10 ± 2 μM) and chloroquine (IC₅₀: 22 ± 2 μM). A weak but positive correlation ($r^2 =$
32
33 0.1356) was established between inhibition of βH formation and *in vitro Pf* activity (Supporting
34
35 Information Figure S4).
36
37
38
39

40
41 Furthermore, frontrunner **23** was subjected to the cellular heme speciation assay to delineate its
42
43 dose-dependent effect on various haem species in the parasite and assess its ability to inhibit
44
45 intracellular Hz formation in *Pf* parasites. Despite its high activity in the pyridine-based βH assay
46
47 (Table S3), **23** did not produce a statistically significant concentration-dependent increase in the
48
49 levels of free haem relative to that of Hz (Figure 5 and Supporting Information Table S4). This
50
51 disconnect may in part be attributable to the limitations of *in vitro* βH assay in recapitulating the
52
53
54
55
56
57
58
59
60

complex physiology involving intracellular drug activity such as membrane permeation and accumulation in the digestive vacuole (DV).

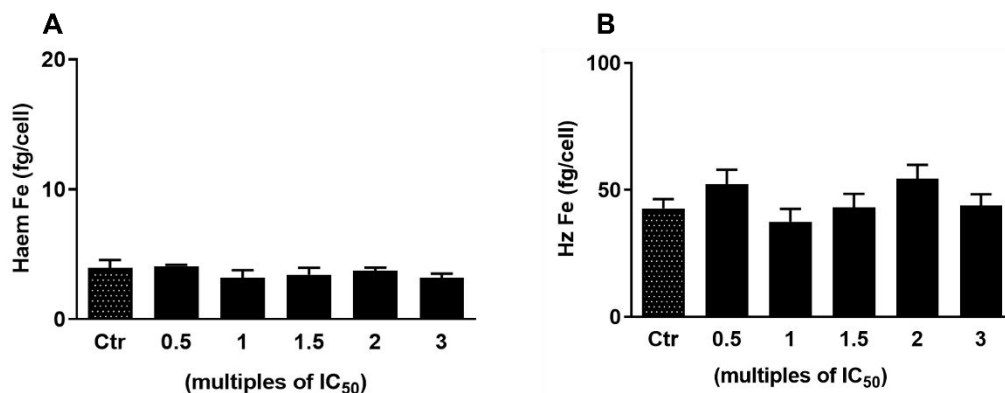


Figure 5: Dose-dependent haem fractionation profiles of compound **23**. The amount of “free” haem Fe (A) and hemozoin (Hz) Fe (B) at increasing concentrations of the compounds.

CONCLUSION

A novel set of 1,2,4-oxadiazole analogues of AST with high metabolic stability have been identified through metabolic stability-driven optimization of compound **1**. Various approaches including bioisosterism and lipophilicity-reduction driven modifications have been used, leading to the identification of **23**, which demonstrates high *in vivo* efficacy in the *P. berghei* mouse infection model of malaria. Additionally, analogues showing high early stage (EG, stage I/III) gametocytocidal activity, liver stage activity, and absence of cytotoxicity against the CHO and HepG2 cell lines have been identified. SAR from this work reaffirms the significance of the 4-amino piperidine moiety, as an essential pharmacophoric component in AST analogues for antiplasmodium activity. This work has revealed that with a 3-CH₃/3-CF₃/3-*tert*-butyl-1,2,4-oxadiazole moiety at the 4-position of the lateral phenyl group, the benzyl moiety at benzimidazole *N*-1 is not required for asexual-blood stage (ABS) antiplasmodium activity.

1
2
3 Removal of the benzyl moiety while retaining a 1,2,4-oxadiazole functionality in the lateral
4 phenyl group produces high *Pf* activity, high *in vitro* metabolic stability, low lipophilicity, and
5 low molecular weight which benefit solubility and selectivity over hERG. Although several
6 analogues still display β -hematin inhibition, and significant amounts **23** accumulates in and
7 around the parasite's DV, **23** does not induce any statistically significant effect on the levels of
8 haem or Hz in *Pf*. It is worth noting that inhibiting the formation of Hz is only one of many
9 processes in the DV that can be inhibited by **23** to lead to the parasite's death. We speculate that
10 although inhibiting the formation of Hz might not the primary MoA of **23**, the compound could
11 be affecting other processes in the DV. Also, there is the possibility of a novel target at play in
12 the other organelles associated with **23**. Compound **23** is the first direct analogue of AST to
13 demonstrate multi-stage activity, high *in vivo* efficacy, with >1000-fold better hERG selectivity
14 compared to AST, while retaining ideal drug-like properties. Further PK and hERG optimization
15 into safer margins by utilizing other approaches not explored in this work as well as further
16 studies into their MoA is warranted.

36 EXPERIMENTAL SECTION

37
38
39 All commercially available chemicals were purchased from either Sigma-Aldrich (Germany) or
40 Combi-Blocks (United States). ^1H NMR (all intermediates and final compounds) and ^{13}C NMR
41 (for target compounds only) spectra were recorded on Bruker Spectrometer at 300, 400 or 600
42 megahertz (MHz). Melting points for all target compounds were determined using a Reichert-
43 Jung Thermovar hot-stage microscope coupled to a Reichert-Jung Thermovar digital
44 thermometer (20°C – 350°C range). Reaction monitoring using analytical thin-layer
45 chromatography (TLC) was performed on aluminum-backed silica-gel 60 F₂₅₄ (70–230 mesh)
46 plates with detection and visualization done using (a) UV lamp (254/366 nm), (b) iodine vapors,
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 or (c) ninhydrin spray reagent. Column chromatography was performed with Merck silica-gel 60
4
5 (70–230 mesh). Chemical shifts (δ) are reported in ppm downfield from trimethylsilane (TMS)
6
7 as the internal standard. Coupling constants (J) were recorded in Hertz (Hz). Purity of
8
9 compounds was determined by an Agilent 1260 Infinity binary pump, Agilent 1260 Infinity
10
11 diode array detector (DAD), Agilent 1290 Infinity column compartment, Agilent 1260 Infinity
12
13 standard autosampler, and Agilent 6120 quadrupole (single) mass spectrometer, equipped with
14
15 APCI and ESI multimode ionization source. All compounds tested for biological activity were
16
17 confirmed to have $\geq 95\%$ purity by HPLC. Solubility, biological assays, and any experimental
18
19 data not shown below (i.e., NMR of compound intermediates) is fully supplied and detailed in
20
21 the Supporting Information.
22
23
24
25

26 27 **General Procedure 1. Synthesis of *N*-hydroxyamidines (2a and 31a – e)**

28
29 To a solution of nitrile (1 equiv) in absolute EtOH (0.10 M) was added $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1.2 eq),
30
31 followed by Et_3N (1.2 equiv) and 8-hydroxyquinolone (10 mol%). The resulting mixture was
32
33 refluxed at 79 °C for 1.5 hour. After completion, the solvent was evaporated *in vacuo*, the residue
34
35 was dissolved with H_2O (10 ml) and acidified to pH 3 using 10% HCl. The precipitate was
36
37 filtered off and again washed with 10% HCl and dried.
38
39

40
41 **4-(2-bromoethyl)-*N*-hydroxybenzimidamide (2a).** Obtained from 4-(2-
42
43 bromoethyl)benzotrile as a light green crystalline solid (0.57 g, 82%). ^1H NMR (300 MHz,
44
45 DMSO- d_6) δ 9.57 (s, 1H), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 5.75 (s, 2H), 3.74 (t,
46
47 $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.14 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H). LC-MS (APCI+/ESI): found $m/z = 244.0, 245.0$ [M+H]
48
49 $^+$ (cal. for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}$, 243.01, 244.01). HPLC Purity: 98%, $t_R = 0.318$ min.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 ***N'*-hydroxyisobutyrimidamide (31a)**. Obtained from isobutyronitrile (0.250 g, 3.61 mmol) as a
4
5 pale-yellow solid (0.34 g, 92%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.90 (s, 1H), 6.51 (s, 2H),
6
7 2.55 (hept, *J* = 5.9 Hz, 1H), 1.05 (d, *J* = 5.9 Hz, 6H).
8
9

10
11 **3-(4-(2-bromoethyl)phenyl)-1,2,4-oxadiazole (2b)**. A solution of **2a** (0.063 g, 0.26 mmol) in
12
13 CH(EtO)₃ (1.5 mL) was charged with pyridine (1.5 ml) and catalytic amount of BF₃.OEt₂ was
14
15 stirred at 80 °C for 1 hour. After the completion, the solvent was removed *in vacuo*, and the
16
17 product obtained by purification by flash column chromatography using 0 – 10%
18
19 EtOAc/Hexanes as white crystalline solid (0.05 g, 51%). ¹H NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ
20
21 9.24 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.81 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.13 (t, *J*
22
23 = 7.0 Hz, 2H). LC (APCI⁺/ESI): HPLC Purity: 98%, *t*_R = 0.318 min.
24
25
26
27

28
29 **3-(4-(2-bromoethyl)phenyl)-5-methyl-1,2,4-oxadiazole (2c)**. A mixture of **2a** (0.10 g,
30
31 0.41 mmol) and acetyl chloride (350 μl, 0.49 mmol) was refluxed in THF at 65 °C for 30 min. At
32
33 completion, excess acetyl chloride and THF were evaporated under reduced pressure and the
34
35 reaction mixture quenched with H₂O (5 ml). This mixture was extracted with DCM (3 × 15 ml).
36
37 Combined organic extracts were dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporating off solvent under
38
39 vacuum to afford product as white crystalline solid (0.17 g, 80%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-
40
41 *d*₆) δ 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.19 (t, *J* = 7.0
42
43 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H). LC (APCI⁺/ESI): HPLC Purity: 99%, *t*_R = 0.318 min.
44
45
46

47
48 **3-(4-(2-bromoethyl)phenyl)-5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazole (2d)**. A mixture of **2a** (0.10
49
50 g, 0.41 mmol) in 4 ml pyridine and trifluoroacetic acid anhydride (172 μl, 1.23 mmol) was
51
52 stirred at room temperature (19 °C) for 20 min. The mixture was poured in ice H₂O (10 ml) and
53
54 extracted with ethyl acetate (3 × 15 ml). The combined organic extracts were washed with brine
55
56 and dried over anhydrous Na₂SO₄. Product obtained after flash column chromatography using 0
57
58
59
60

1
2
3 – 10% EtOAc/Hexanes as a pale-yellow oil (0.15 g, 76%). ¹HNMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.16
4
5 (d, *J* = 8.2, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.2, 2H), 3.80 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H). HPLC
6
7 Purity: 97%, *t*_R = 3.406 min.
8
9

10 **General Procedure 2. Synthesis of Intermediates 3a – 3e.** To a solution of 4-(2-bromoethyl)
11 benzoic acid (1 equiv) in DCM under ice, DMAP (0.1 equiv), EDCI (1.5 equiv.) and Et₃N
12 (1.5 were added, and the solution stirred at room temperature (21 °C) for 30 minutes. The
13 appropriate amine (1.0 equiv) was then added dropwise, and the resulting solution stirred at room
14 temperature for 2 hours. After completion, the reaction was diluted with another aliquot of initial
15 amount of DCM and washed with saturated NaHCO₃ (×3), followed by H₂O (×2), then brine
16 (×1). The DCM phase was then dried over anhydrous Na₂SO₄, and the solvent evaporated *in*
17 *vacuo*, products obtained after washing with Et₂O.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 **(*S*)-4-(2-bromoethyl)-N-(1-hydroxypropan-2-yl)benzamide (3a).** Obtained from (*S*)-2-
31 aminopropan-1-ol (0.055g, 0.73 mmol) as a white solid (0.168 g, 80%). ¹HNMR (300 MHz,
32 Methanol-*d*₄) δ 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.71 (qt, *J* = 6.5, 6.2 Hz, 1H),
33 3.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.12 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.96 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.65 (d, *J* = 6.5 Hz,
34 3H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found *m/z* = 286.0, 288.0 [M+H]⁺ (cal. for C₁₂H₁₆BrNO₂, 285.04,
35 287.03). HPLC Purity: 96%, *t*_R = 2.593 min.
36
37
38
39
40
41
42
43

44 **Methyl 4-(2-bromoethyl) benzoate (3f).** To a solution of 4-(2-bromoethyl) benzoic acid (5 g,
45 21.8 mmol) in 4:1 Toluene/Methanol (60 ml) under ice, was added dropwise a solution of 2M of
46 TMS-CHN₂ in hexanes until the yellow colour no longer dissipated (about 28 ml added in 25
47 minutes). The mixture was evaporated *in vacuo* to dryness, followed by purification *via* flash
48 column chromatography using 0 – 20% EtOAc/Hexanes as eluent. Product obtained as a
49 colourless/clear oil (5.15 g, 97%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H),
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7.20 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.54 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H), 3.14 (t, $J = 4.4$ Hz, 2H). HPLC

Purity: 99%, $t_R = 2.955$ min.

General Procedure 3: Synthesis of Intermediates 4a – 4c. To a stirring suspension of amide **3a – 3c** (1 equiv) in DCM (5 ml), was added Et₃N (2 equiv) followed by tosyl chloride (2 equiv). The mixture was stirred at 30 °C for 30 minutes. DCM was removed under vacuum followed by addition of EtOAc (15 ml). The mixture was washed with NaHCO₃ (2 × 10 ml) and brine (10 ml) then drying over anhydrous Na₂SO₄ and evaporating off solvent under vacuum. Crude solid products were purified by column chromatography using 0 – 25% EtOAc/hexanes gradient as an eluent.

(S)-2-(4-(2-bromoethyl)phenyl)-4-methyl-4,5-dihydrooxazole (4a). Obtained from **3a** (0.10 g, 0.35 mmol) as a white solid (0.066g, 70%). ¹HNMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.01 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.41 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.11 (dd, $J = 10.1, 7.9$ Hz, 1H), 3.96 (dd, $J = 7.9, 6.2$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.33 (ddq, $J = 10.1, 6.2, 6.0$ Hz, 1H), 3.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.95 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 268.0, 270.0$ [M+H]⁺ (cal. for C₁₂H₁₄BrNO, 267.03, 267.02). HPLC Purity: 98%, $t_R = 2.745$ min.

1-Isopropyl-N-(piperidin-4-yl)-1H-benzo[*d*]imidazol-2-amine (14c).¹² White solid (0.336 g, 86%). R_f (10% MeOH/DCM), 0.23. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.37 (dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, 1H), 7.30 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 6.96 (ddd, $J = 8.0, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 6.77 (ddd, $J = 7.7, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 4.55 (hept, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.20 (tt, $J = 10.8, 4.0$ Hz, 1H), 3.98 – 3.91 (m, 2H), 3.05 – 2.96 (m, 2H), 2.11 – 2.03 (m, 2H), 1.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H), 1.55 – 1.47 (m, 2H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 259.2$ [M+H]⁺ (cal. For C₁₅H₂₂N₄, 258.18). Purity: 99%, $t_R = 0.877$ min.

General Procedure 5. N-alkylation of Benzimidazole. A mixture of 2-chlorobenzimidazole (1 equiv), alkyl halide (1.2 equiv) and K_2CO_3 (1.2 equiv) was stirred at room temperature (22 °C) in acetone for 2 hours. After completion, the solvent was removed *in vacuo*. H_2O was added to the residue, followed by extracting with DCM (×3). Combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and the solvent evaporated *in vacuo* to give crude residue, which was triturated with *n*-pentane to afford product.

4-((2-chloro-1-benzo[*d*]imidazol-1-yl) methyl)benzotrile (25). Obtained from 2-chlorobenzimidazole (3.50 g, 22.9 mmol) and 4-(bromomethyl)benzotrile (5.4 g, 27.6 mmol) as a white crystalline solid (6.00 g, 98%). R_f (5% MeOH/DCM) 0.65. 1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.63 (dd, J = 6.0, 0.8 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 6.5, 1.0 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.31 – 7.27 (m, 2H), 5.59 (s, 2H). LC-MS (APCI+/ESI): found m/z = 267.9, 269.9 [M+H]⁺ (cal. for $C_{15}H_{10}ClN_3$, 267.06, 269.05). Purity: 99%, t_R = 2.505 min.

General Procedure 6. Synthesis of 26a – c. A mixture of **25** (1.0 equiv), an appropriate mono *N*-Boc protected cyclic diamine (1.5 equiv), and Et_3N (2.0 equiv) in toluene was irradiated in a microwave reactor at 150 °C for 5 – 30 minutes. The residue was cooled and diluted with 10% MeOH/DCM. The mixture was washed with saturated $NaHCO_3$ solution (3 × 20 ml), combined organic layers were washed with brine (10 ml), and further dried over anhydrous Na_2SO_4 . The solvent was evaporated *in vacuo* to obtain a crude residue which was either triturated with *n*-pentane (or Et_2O) or purified *via* flash column chromatography (3 – 4% MeOH/DCM) to afford the pure products.

***Tert*-butyl (S)-3-((1-(4-cyanobenzyl)-1H-benzo[*d*]imidazol-2-yl)amino)pyrrolidine-1-carboxylate (26a).** Obtained from **25** (0.300 g, 1.12 mmol) and *tert*-butyl (*S*)-3-aminopyrrolidine-1-carboxylate (293 μ l, 1.68 mmol) as a light brown solid (0.304 g, 65%). R_f

(10% MeOH/DCM), 0.50. ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.49 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.32 (ddd, $J = 7.9, 7.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.25 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 1.4$ Hz, 1H), 5.62 (s, 2H), 4.70 (tt, $J = 6.8, 4.2$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J = 12.9, 6.8$ Hz, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 2H), 3.40 (ddd, $J = 11.5, 8.4, 5.7$ Hz, 1H), 2.55 (ddd, $J = 15.0, 8.4, 6.8$ Hz, 1H), 2.29 (ddd, $J = 11.5, 8.2, 4.1$ Hz, 1H), 1.48 (s, 9H). LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z = 418.2$ [M+H] $^+$ (cal. for $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_2$, 417.22). Purity: 99%, $t_{\text{R}} = 2.801$ min.

General Procedure 7. N-Boc deprotection. Respective N-Boc protected amines were stirred in DCM and TFA (10 equiv) at 23 °C for 2 hours. Following completion, DCM and TFA were evaporated *in vacuo*, and the residue taken up 50% MeOH/DCM. This solution was stirred with Amberlyst $^{\text{®}}$ A-21 free base resin at room temperature (23 °C) until pH was neutral. The mixture was then filtered, and the filtrate evaporated *in vacuo* to afford free amines.

(R)-4-((2-(Pyrrolidine-3-ylamino)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)methyl) benzonitrile (27a).

Obtained from **26a** (0.280 g, 0.67 mmol) as a pale-yellow solid (0.181 g, 85%). R_f (10% MeOH/DCM), 0.10. ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 7.73 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.55 (dd, $J = 8.0, 1.2$ Hz, 1H), 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.38 (ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.5$ Hz, 1H), 7.31 (dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, 1H), 7.29 (ddd, $J = 8.2, 7.1, 1.4$ Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.69 (tt, $J = 6.7, 4.3$ Hz, 1H), 3.79 (dd, $J = 12.8, 6.7$ Hz, 1H), 3.61 – 3.55 (m, 2H), 3.52 (ddd, $J = 11.5, 8.2, 5.7$ Hz, 1H), 2.56 (ddd, $J = 14.7, 8.2, 6.7$ Hz, 1H), 2.31 (ddd, $J = 11.5, 8.2, 4.3$ Hz, 1H). LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z = 318.2$ [M+H] $^+$ (cal. For $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_5$, 317.16). Purity: 99%, $t_{\text{R}} = 2.499$ min.

Tert-butyl 4-isothiocyanatopiperidine-1-carboxylate (52). To a solution of *tert*-butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate (8.00 g, 39.9 mmol) in DMF (50 ml) at 0 °C was added 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (7.82 g, 43.9 mmol). The reaction mixture was allowed to rise to room

1
2
3 temperature (24 °C) and stirred for 20 hours at that temperature. The solvent was taken off *in*
4
5 *vacuo*, the residue dissolved in EtOAc, and washed with H₂O (3 × 50 ml). The solvent was
6
7 removed *in vacuo*, the residue triturated with hexane, and filtered. The filtrate was treated with
8
9 activated charcoal and filtered through Celite. Removal of solvent afforded product as a
10
11 colourless oil (7.52 g, 78%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.11 – 3.98 (m, 2H), 3.69 (tt, *J* =
12
13 11.3, 4.1 Hz, 1H), 3.09 – 2.94 (m, 2H), 2.17 – 2.05 (m, 2H), 1.92 – 1.83 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).
14
15
16
17

18 **General Procedure 8. Synthesis of 2-chlorobenzimidazoles 54a – c.** A mixture of
19
20 commercially obtained benzene-1,2-diamines (1 equiv), 1,1'-Carbonyldiimidazole (1.5 equiv)
21
22 and DMAP (1.0 mol%) was dissolved in dry THF (10 ml), and the resulting mixture stirred at 22
23
24 °C for 2 – 12 hr. After completion, the solvent was evaporated *in vacuo* and H₂O (30 ml) added
25
26 to the resulting residue. Benzimidazol-2-one products were obtained quantitatively, after filtering
27
28 and subsequent oven drying. Crude benzimidazole-2-ones (1 equiv) were then treated with
29
30 POCl₃ (5.0 equiv) in a seal tube and stirred at 110 °C for 12 h. The reaction mixture was then
31
32 cooled to room temperature (22 °C), and excess POCl₃ evaporated under reduced pressure. The
33
34 residue was taken up in EtOAc (20 ml) and neutralized using 15% NaOH under ice while
35
36 stirring. After separation, the aqueous phase was further extracted with EtOAc (3 × 20 ml). The
37
38 combined organic extracts were washed with brine solution (10 ml), dried over anhydrous
39
40 Na₂SO₄ and solvent evaporated *in vacuo*. Pure products were obtained after flash
41
42 chromatography using 20 – 50% EtOAc/Hexanes as eluent.
43
44
45
46
47
48

49 **2-chloro-5,6-difluoro-1H-benzo[d]imidazole (54a).** Obtained from 4,5-difluorobenzene-1,2-
50
51 diamine (0.250g, 1.73 mmol) as a reddish solid (0.278 g, 84%). R_f(5% MeOH/DCM), 0.76. ¹H
52
53 NMR (300 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.54 (m, 2H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found *m/z* = 189.0, 191.0
54
55 [M+H]⁺ (cal. For C₇H₃ClF₂N₂, 188.00, 189.99). Purity: 98%, *t*_R = 2.632 min.
56
57
58
59
60

1
2
3 **2-chloro-5,6-difluoro-1-methyl-1H-benzo[d]imidazole (55a)**. Following the general procedure
4
5 2, obtained from **54a** (0.250 g, 1.32 mmol) and methyl iodide (99 μ l, 1.58 mmol) as a light green
6
7 solid (0.212 g, 79%). R_f (5% MeOH/DCM), 0.93. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.42 (dd,
8
9 $J = 7.4, 5.3$ Hz, 1H), 7.27 (dd, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.83 (s, 3H). LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found
10
11 $m/z = 203.0, 205.0$ [M+H] $^+$ (cal. for $\text{C}_8\text{H}_5\text{ClF}_2\text{N}_2$, 202.01, 204.01). Purity: 99%, $t_R = 2.587$ min.
12
13
14

15 **General Procedure 9. Synthesis of 59a – c**. A mixture of **55a – c** (1.0 equiv), *N*-Boc-4-amino
16
17 piperidine (1.5 equiv), and Et $_3$ N (2.0 equiv) was stirred at 155 $^\circ\text{C}$ in a seal tube for 6 – 36 hours.
18
19 After completion, the residue was cooled and diluted with 10% MeOH/DCM. The mixture was
20
21 washed with saturated NaHCO $_3$ solution ($\times 3$), then brine, and dried over anhydrous Na $_2$ SO $_4$. The
22
23 solvent was evaporated *in vacuo* to obtain a crude residue which was either triturated with *n*-
24
25 pentane (or diethyl ether) or purified *via* flash column chromatography to afford the pure
26
27 products.
28
29
30

31 **Ethyl 4-((5,6-difluoro-1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) amino) piperidine-1-carboxylate**
32
33 (**59a**). Obtained from **55a** (0.180 g, 0.88 mmol) and *tert*-butyl 4-aminopiperidine-1-carboxylate
34
35 (0.265 g, 1.32 mmol), as a brown solid (0.184 g, 57%). R_f (5% MeOH/DCM), 0.78. $^1\text{H NMR}$
36
37 (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.40 (dd, $J = 7.4, 5.3$ Hz, 1H), 7.32 (dd, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 6.69 (d, J
38
39 = 7.6 Hz, 1H), 4.51 – 4.42 (m, 2H), 3.91 (tt, $J = 11.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.09 – 2.98 (m,
40
41 2H), 2.15 – 2.06 (m, 2H), 1.59 – 1.51 (m, 2H), 1.39 (s, 9H). LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z =$
42
43 367.2 [M+H] $^+$ (cal. for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_2$, 366.19). Purity: 98%, $t_R = 2.579$ min.
44
45
46
47

48 **5,6-difluoro-1-methyl-N-(piperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-amine (60a)**. Following
49
50 general procedure 7, obtained from **59a** (0.160 g, 0.44 mmol) as a light brown solid (0.108 g,
51
52 93%). R_f (5% MeOH/DCM), 0.13. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.45 (dd, $J = 7.4, 5.3$ Hz,
53
54 f 1H), 7.34 (dd, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.92 (tt, $J = 11.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.19 – 3.10 (m,
55
56 4 1H), 7.34 (dd, $J = 7.5, 5.5$ Hz, 1H), 3.92 (tt, $J = 11.2, 4.0$ Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.19 – 3.10 (m,
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2H), 3.05 – 2.96 (m, 2H), 2.10 – 1.98 (m, 2H), 1.49 – 1.38 (m, 2H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 267.1$ [M+H]⁺ (cal. for C₁₃H₁₆F₂N₄, 266.13). Purity: 96%, $t_R = 0.822$ min.

General Procedure 10. Synthesis of 58a – h. A *o*-halo-nitrobenzene (1.0 equiv), an appropriate amine (1.2 equiv), and K₂CO₃ (1.5 equiv) were mixed in MeCN (10 – 15 ml). Et₃N (1.5 equiv) was added, and the resulting mixture stirred at 65 °C for 4 – 18 hr. After completion, the mixture was cooled to room temperature (18 °C), followed by the addition of H₂O (15 ml) and EtOAc (30 ml). The mixture was separated, and the aqueous phase further extracted with EtOAc (2 × 15 ml). Combined organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, and solvent evaporated *in vacuo*. Pure *o*-amino-nitrobenzene intermediates were obtained following recrystallization from ethanol and used in the next step.

To a solution of the crude *o*-amino-nitrobenzenes (1.0 equiv) in 1:1 MeOH/EtOAc (10 – 25 ml) was added 10% Pd/C (0.1 equiv), and the reaction mixture was stirred at 21 °C under a hydrogen (H₂) atmosphere using a double padded balloon for 12 – 36 hours. After completion, the reaction mixture was filtered through a bed of Celite, and the filtrate concentrated *in vacuo* to afford products. If required, flash column chromatography using 20 – 70% EtOAc/Hexanes was performed.

3-amino-4-(methylamino)benzotrile (58a). Obtained from 4-chloro-3-nitrobenzotrile (0.500 g, 2.74 mmol) and methylamine (2M solution in THF, 1.64 ml, 3.29 mmol), as a dark brown solid (0.319 g, 79% over two steps). R_f (40% EtOAc/Hexane) 0.32. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.58 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 2.71 (s, 3H). Purity: 99%, $t_R = 0.153$ min.

Tert-butyl (2-((2-aminophenyl)amino)ethyl)carbamate (58h). Obtained from 1-fluoro-2-nitrobenzene (1.60 g, 5.70 mmol) and *tert*-butyl (2-aminoethyl)carbamate (1.10 g, 6.84 mmol) as

1
2
3 a dark brown solid (1.40 g, 98% over two steps). R_f (40% EtOAc/Hexane), 0.21. $^1\text{H NMR}$ (300
4
5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6.88 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 7.3, 1.6$ Hz, 1H), 6.52 – 6.37 (m, 3H),
6
7 4.39 (br-s, 3H), 3.21 – 3.11 (m, 2H), 3.11 – 3.00 (m, 2H), 1.40 (s, 9H). LC-MS (APCI⁺/ESI):
8
9 found $m/z = 252.1$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (cal. For $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2$, 251.16). Purity: 98%, $t_R = 0.189$ min.

11
12
13 **General Procedure 11. Synthesis of 59d – k.** To a solution of **58a – h** (1 equiv) in MeCN (15
14
15 ml), isothiocyanate **52** (1.1 equiv) and Et_3N (1.2 equiv) were added, and the mixture refluxed at
16
17 85 °C for 1 hr. DCC (1.2 equiv) was then added, and the reaction mixture was further refluxed at
18
19 85 °C for 11 hr. After completion, MeCN was evaporated *in vacuo*, and the residue adsorbed on
20
21 silica gel. Pure products were obtained after purification *via* flash chromatography using 10%
22
23 MeOH/DCM as eluent.

24
25
26
27 **Tert-butyl 4-((5-cyano-1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) amino) piperidine-1-**
28
29 **carboxylate (59d).** Obtained from **58d** (0.280 g, 1.90 mmol) and **52** (0.507 g, 2.10 mmol), as a
30
31 light brown solid (0.573 g, 85%). R_f (5% MeOH/DCM), 0.53. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ
32
33 7.97 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 7.5$
34
35 Hz, 1H), 4.49 – 4.41 (m, 2H), 3.94 (tt, $J = 10.8, 4.0$ Hz, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.08 – 2.95 (m, 2H),
36
37 2.10 – 2.01 (m, 2H), 1.50 – 1.43 (m, 2H), 1.43 (s, 9H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 356.2$
38
39 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (cal. For $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_2$, 355.20). Purity: 99%, $t_R = 2.397$ min.

40
41
42
43 **Tert-butyl 4-((1-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)ethyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-**
44
45 **yl)amino)piperidine-1-carboxylate (59k).** Obtained from **58h** (0.500 g, 2.00 mmol) and **52**
46
47 (0.531 g, 2.18 mmol), as a white solid (0.780 g, 85%). R_f (7% MeOH/DCM), 0.38. $^1\text{H NMR}$
48
49 (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 7.19 (dd, $J = 7.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H), 7.00 –
50
51 6.78 (m, 3H), 6.25 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.08 – 3.99 (m, 2H), 3.99 – 3.87 (m, 3H), 3.26 – 3.12 (m,
52
53 2H), 2.98 – 2.83 (m, 2H), 2.03 – 1.90 (m, 2H), 1.50 – 1.37 (m, 11H), 1.33 (s, 9H). LC-MS
54
55
56
57

(APCI⁺/ESI): found $m/z = 460.3$ [M+H]⁺ (cal. For C₂₄H₃₇N₅O₄, 459.28). Purity: 98%, $t_R = 2.439$ min.

1-methyl-2-(piperidin-4-ylamino)-1H-benzo[d]imidazole-5-carbonitrile (60d). Following general procedure 7, obtained from **59d** (0.500 g, 1.41 mmol) as an off white solid (0.319 g, 89%). R_f (5% MeOH/DCM), 0.13. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.97 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 7.78 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 3.94 (tt, $J = 10.8, 4.0$ Hz, 1H), 3.50 (s, 3H), 3.21 – 3.13 (m, 2H), 3.08 – 2.99 (m, 2H), 2.09 – 1.98 (m, 2H), 1.52 – 1.39 (m, 2H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 256.2$ [M+H]⁺ (cal. for C₁₄H₁₇N₅, 255.15). Purity: 99%, $t_R = 0.699$ min.

1-(2-aminoethyl)-N-(piperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-amine (60k). Following general procedure 7, obtained from **59k** (0.490 g, 10.7 mmol) as a white solid (0.235 g, 85%). R_f (10% MeOH/DCM), 0.09. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.45 (br-s, 3H), 7.30 (dd, $J = 7.1, 1.7$ Hz, 1H), 7.26 (dd, $J = 7.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.07 – 6.92 (m, 2H), 4.28 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.00 (tt, $J = 10.3, 3.8$ Hz, 1H), 3.42 – 3.29 (m, 2H), 3.22 – 2.90 (m, 4H), 2.24 – 2.03 (m, 2H), 1.78 (dtd, $J = 14.2, 10.9, 3.9$ Hz, 2H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 260.2$ [M+H]⁺ (cal. for C₁₄H₂₁N₅, 259.18). Purity: 98%, $t_R = 0.186$ min.

General Procedure 12. Synthesis of 6 – 13, 15 – 17, 23, 24, 28 – 30, 32, 61 – 68 & 70 – 72. A solution of appropriate amine (1.0 equiv) and K₂CO₃ (1.5 equiv) in MeCN was stirred under reflux at 80 °C for 30 minutes. An appropriate alkyl bromide (1.2 equiv) was added, and the mixture further stirred under reflux at 85 °C for 5 – 24 hours. After completion, MeCN was taken off under reduced pressure, the residue taken up in 10% MeOH/DCM and filtered. The filtrate was adsorbed on silica gel, after which column chromatography was performed using a 3 – 10% MeOH/DCM gradient as eluent, to afford final compounds.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4-((2-((1-(4-(1,2,4-oxadiazol-3-yl) phenethyl) piperidin-4-yl) amino)-1-benzo[d]imidazol-1-yl) methyl) benzonitrile (6). Obtained from **5** (0.080 g, 0.24 mmol) and **2b** (0.073 g, 0.29 mmol) as a pale-yellow solid (0.087 g, 72%); m.p.: 98 – 100 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.59. ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 7.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.63 (dd, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.42 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.33 (dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.06 (ddd, $J = 7.9, 7.2, 1.0$ Hz, 1H), 7.00 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 6.95 (ddd, $J = 8.0, 7.2, 1.1$ Hz, 1H), 5.37 (s, 2H, H^5), 3.84 (tt, $J = 11.1, 4.2$ Hz, 1H), 3.06 – 3.01 (m, 2H), 2.94 – 2.87 (m, 2H), 2.70 – 2.66 (m, 2H), 2.36 – 2.30 (m, 2H), 2.12 – 2.08 (m, 2H), 1.67 – 1.58 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 154.10, 145.93, 142.30, 141.53, 140.68, 133.85, 132.25 (2C), 131.97 (2C), 129.47 (2C), 127.13 (2C), 121.34, 119.63, 118.44, 118.05, 114.82, 111.01, 109.67, 107.56, 58.97, 52.10 (2C), 49.83, 44.23, 32.67, 31.33 (2C). LC-MS (APCI+/ESI): found $m/z = 504.2$ [M+H] $^+$ (cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}$, 503.24). Purity: 97%, $t_R = 2.356$ min.

4-((2-((1-(4-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl) phenethyl) piperidin-4-yl) amino)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl) methyl) benzonitrile (7). Obtained from **5** (0.080 g, 0.24 mmol) and **2c** (0.077 g, 0.29 mmol) as a pale-yellow solid (0.076 g, 61%); m.p.: 148 – 150 °C; R_f (10% MeOH/DCM) 0.48. ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 8.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.47 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.41 (dd, $J = 7.9, 0.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.17 (ddd, $J = 7.9, 7.1, 1.0$ Hz, 1H), 7.12 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H), 7.08 (ddd, $J = 8.0, 7.1, 1.0$ Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 4.04 (tt, $J = 10.5, 4.1$ Hz, 1H), 3.75 – 3.63 (m, 2H), 3.44 – 3.38 (m, 2H), 3.26 – 3.18 (m, 2H), 3.18 – 3.12 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.40 – 2.31 (m, 2H), 1.99 – 1.89 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 177.47, 167.78, 152.31, 141.41, 139.89, 132.95, 132.38 (2C), 129.12 (2C), 127.43 (2C), 127.07 (2C), 125.74, 122.33, 121.13, 119.23, 117.95, 114.13,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

111.28, 108.49, 57.10, 51.63 (2C), 44.63, 30.15, 29.19 (2C), 29.09, 10.64. LC-MS (APCI⁺/ESI):
found $m/z = 518.2$ [M+H]⁺ (cal. for C₃₁H₃₁N₇O, 517.26). Purity: 97%, $t_R = 2.447$ min.

N-(1-(4-(3-Methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenethyl)piperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-amine (15). Obtained from **14a** (0.85 g, 3.93 mmol) and **3d** (1.35 g, 4.72 mmol) as a pale-yellow solid (1.18 g, 75%); m.p.: 171 – 173 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.20. ¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.20 (dd, $J = 5.8, 3.2$ Hz, 2H), 6.98 (dd, $J = 5.8, 3.2$ Hz, 2H), 3.69 (tt, $J = 10.9, 4.3$ Hz, 1H), 3.10 – 3.03 (m, 2H), 2.97 – 2.91 (m, 2H), 2.75 – 2.68 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.40 – 2.31 (m, 2H), 2.15 – 2.08 (m, 2H), 1.71 – 1.59 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 176.08, 167.11, 154.29, 145.78, 137.16, 129.36 (2C), 127.75 (2C), 121.89, 120.10, 111.31, 59.21, 51.95 (2C), 49.33, 43.55, 32.72, 31.63 (2C), 9.99. LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 403.2$ [M+H]⁺ (cal. For C₂₃H₂₆N₆O, 402.22). Purity: 98%, $t_R = 2.469$ min.

N-(1-(4-(3-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenethyl)piperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-amine (23). Obtained from **14a** (0.250 g, 1.16 mmol) and **3e** (0.474 g, 1.39 mmol) as a white crystalline solid (0.290 g, 55%). m.p.: 102 – 104 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.38. ¹H NMR (600 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.06 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.25 (dd, $J = 5.8, 3.2$ Hz, 2H), 7.05 (dd, $J = 5.9, 3.1$ Hz, 2H), 3.74 (tt, $J = 10.5, 4.2$ Hz, 1H), 3.21 (dt, $J = 12.3, 4.0$ Hz, 2H), 3.04 – 2.96 (m, 2H), 2.92 – 2.85 (m, 2H), 2.56 (td, $J = 11.9, 2.7$ Hz, 2H), 2.21 – 2.13 (m, 2H), 1.80 – 1.69 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Methanol-*d*₄) δ 169.05, 167.50, 153.15, 144.18, 135.53, 129.34 (2C), 127.50 (2C), 123.11, 120.87 (2C), 111.28 (2C), 58.70 (2C), 51.70, 49.10, 32.14, 30.94 (2C). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 457.2$ [M+H]⁺ (cal. For C₂₃H₂₃F₃N₆O, 456.19). Purity: 98%, $t_R = 2.246$ min.

1
2
3 **1-Methyl-N-(1-(4-(3-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenethyl) piperidin-4-yl)-1H-**
4
5 **benzo[d]imidazol-2-amine (24)**. Obtained from **14b** (0.150 g, 0.65 mmol) and **3e** (0.266 g, 0.78
6
7 mmol) as a white solid (0.202 g, 66%). m.p.: 90 – 92 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.35. ^1H NMR
8 (600 MHz, Methanol- d_4) δ 8.12 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.51 – 7.45 (m,
9
10 2H), 7.40 – 7.33 (m, 2H), 4.09 – 3.99 (m, 1H), 3.87 – 3.79 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.52 – 3.46 (m,
11
12 2H), 3.27 – 3.20 (m, 4H), 2.44 – 2.36 (m, 2H), 2.24 – 2.12 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz,
13
14 Methanol- d_4) δ 168.88, 161.51, 149.24, 141.03, 131.40, 129.45 (2C), 128.97, 127.84 (2C),
15
16 124.01, 123.86, 123.70, 111.40, 109.61, 54.49 (2C), 42.38, 29.96, 28.28, 17.32, 15.90 (2C),
17
18 11.62. LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z = 471.2$ [M+H] $^+$ (cal. For C₂₄H₂₅F₃N₃O, 470.20). Purity:
19
20 99%, $t_R = 2.375$ min.
21
22
23
24
25
26

27 **(R)-4-((2-((1-(4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)phenethyl) pyrrolidine-3-yl) amino)-1H-**
28
29 **benzo[d]imidazol-1-yl) methyl) benzonitrile (28)**. Obtained from **27a** (0.070 g, 0.22 mmol) and
30
31 **3d** (0.075 g, 0.26 mmol) as a pale-yellow solid (0.087 g, 78%); m.p.: 74 – 76 °C; R_f (10%
32
33 MeOH/DCM), 0.37. ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 8.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J =$
34
35 8.4 Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.33 (dd, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H),
36
37 7.06 (ddd, $J = 7.7, 7.3, 1.0$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H), 6.96 (ddd, $J = 8.0, 7.3, 1.1$
38
39 Hz, 1H), 5.36 (s, 2H), 4.49 (tt, $J = 6.8, 4.3$ Hz, 1H), 2.99 – 2.89 (m, 4H), 2.86 – 2.74 (m, 3H),
40
41 2.59 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 2.46 – 2.34 (m, 4H), 1.85 – 1.79 (m, 1H). ^{13}C NMR (151 MHz,
42
43 Methanol- d_4) δ 175.43, 167.62, 154.06, 145.66, 142.19, 141.48, 133.92, 132.27 (2C), 129.32
44
45 (2C), 127.73 (2C), 127.13 (2C), 121.90, 121.34, 119.79, 118.01, 115.07, 111.06, 107.63, 60.32,
46
47 56.79, 52.70, 52.04, 44.32, 34.41, 31.40, 10.00. LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z = 504.2$ [M+H]
48
49 $^+$ (cal. For C₃₀H₂₉N₇O, 503.24). Purity: 98%, $t_R = 2.917$ min. Specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -4.59^\circ$.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Methyl 4-(2-(4-((1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) amino) piperidin-1-yl) ethyl) benzoate

(**32**). Obtained from **14b** (5.00 g, 21.7 mmol) and **3f** (0.096 g, 6.37 mmol) as a cream white solid (5.78 g, 68%). M.p.: 148 – 149 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.46. ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 7.95 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.37 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.27 (dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H), 7.13 (dd, $J = 7.5, 1.6$ Hz, 1H), 7.07 – 6.97 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.78 (tt, $J = 11.2, 4.2$ Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.15 – 3.06 (m, 2H), 2.96 – 2.88 (m, 2H), 2.72 – 2.65 (m, 2H), 2.32 (td, $J = 12.1, 2.5$ Hz, 2H), 2.17 – 2.09 (m, 2H), 1.69 (dtd, $J = 12.2, 10.2, 3.8$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, Methanol- d_4) δ 167.16, 154.29, 145.88, 141.29, 134.58, 129.35 (2C), 128.57 (2C), 127.95, 120.69, 119.23, 114.39, 106.92, 59.43, 52.31 (2C), 51.11, 49.87, 32.76, 31.59 (2C), 27.16. LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 393.2$ [M+H]⁺ (cal. For $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_2$, 392.22). Purity: 98%, $t_R = 0.422$ min.

1,5,6-trimethyl-N-(1-(4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenethyl) piperidin-4-yl)-1H-

benzo[d]imidazol-2-amine (61). Obtained from **60c** (0.080 g, 0.31 mmol) and **3d** (0.108 g, 0.37 mmol) as a light brown solid (0.066 g, 48%). m.p.: 120 – 122 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.33.

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.01 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.39 (s, 1H), 7.31 – 7.18 (m, 3H), 3.85 (tt, $J = 11.0, 4.2$ Hz, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.19 – 3.12 (m, 2H), 2.99 – 2.93 (m, 2H), 2.76 – 2.69 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.37 – 2.30 (m, 2H), 2.25 (s, 3H), 2.19 (s, 3H), 2.06 – 1.92 (m, 2H), 1.69 –

1.62 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 176.22, 162.48, 141.73, 139.19, 137.65, 133.83, 132.01, 129.27, 128.76 (2C), 127.88 (2C), 119.19, 116.21, 108.54, 59.44, 56.56, 52.29 (2C), 34.92, 32.73, 31.66 (2C), 19.86, 19.72, 16.80. LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 445.46$ [M+H]⁺ (cal. for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}$, 444.26). Purity: 98%, $t_R = 2.301$ min.

Methyl 1-methyl-2-((1-(4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenethyl) piperidin-4-yl) amino)-

1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate (68). Obtained from **60h** (0.200 g, 0.69 mmol) and **3d** (0.238 g, 0.83 mmol) as a white solid (0.255 g, 78%). m.p.: 98 – 99 °C; R_f (10% MeOH/DCM),

0.20. ^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.16 (d, $J = 0.9$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.89 (dd, $J = 7.8, 1.0$ Hz, 1H), 7.58 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 3.89 (tt, $J = 11.2, 4.5$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 3.20 – 3.13 (m, 2H), 2.97 – 2.89 (m, 2H), 2.77 – 2.69 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.35 – 2.27 (m, 2H), 2.17 – 2.09 (m, 2H), 1.71 – 1.63 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 175.90, 167.32, 162.30, 141.55, 139.12, 137.87, 133.64, 128.36 (2C), 127.96 (2C), 125.68, 124.34, 119.35, 116.64, 112.44, 59.51, 56.72, 52.95 (2C), 52.22, 34.72, 32.99, 31.77 (2C), 16.85. LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z = 475.2$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (cal. For $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_3$, 474.24). Purity: 98%, $t_{\text{R}} = 2.245$ min.

General Procedure 13. Synthesis of Compounds 18 – 22. A mixture of **15** (1.0 equiv), alkyl bromide (1.2 equiv) and K_2CO_3 (1.5 equiv) in 5 ml DMF was stirred under nitrogen at 70 $^\circ\text{C}$ for 12 hours. After cooling to ambient temperature (23 $^\circ\text{C}$), the mixture was diluted with EtOAc (25 ml). The resulting mixture was washed with H_2O (3 \times 30 ml), combined aqueous layers were then extracted with EtOAc (2 \times 20 ml). Thereafter, combined EtOAc layers were further washed with 5% LiCl (2 \times 10 ml), brine (15 ml), then dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude product was triturated with Et_2O to obtain products. Further purification was performed by flash chromatography (4 – 8% MeOH/DCM) if required.

1-(Cyclohexyl methyl)-N-(1-(4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenethyl) piperidin-4-yl)-1H-benzo[*d*]imidazol-2-amine (18). Obtained from **15** (0.080 g, 0.20 mmol) and (bromomethyl)cyclohexane (0.043 g, 0.24 mmol) as a pale-yellow solid (0.080 g, 80%); m.p.: 78 – 80 $^\circ\text{C}$; R (10% MeOH/DCM), 0.49. ^1H NMR (600 MHz, Methanol- d_4) δ 8.03 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.28 (dd, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 1H), 7.11 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.02 (ddd, $J = 7.9, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 6.98 (ddd, $J = 7.7, 7.2, 1.3$ Hz, 1H), 3.84 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 3.81

1
2
3 (tt, $J = 10.4, 4.0$ Hz, 1H), 3.14 – 3.08 (m, 2H), 2.97 – 2.92 (m, 2H), 2.75 – 2.68 (m, 2H), 2.42 (s,
4
5 3H), 2.36 – 2.31 (m, 2H), 2.14 – 2.08 (m, 2H), 1.91 – 1.84 (m, 1H), 1.76 – 1.64 (m, 6H), 1.63 –
6
7 1.57 (m, 2H), 1.24 – 1.15 (m, 2H), 1.11 – 1.03 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ
8
9 176.35, 168.50, 154.86, 146.67, 141.92, 135.24, 130.27, 128.64, 125.33, 122.77, 121.54, 120.06,
10
11 115.27, 108.73, 60.14, 53.23 (2C), 50.89, 38.25, 33.62, 32.39 (2C), 31.14, 26.88 (2C), 26.36
12
13 (2C), 10.90. LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 499.3$ [M+H]⁺ (cal. for $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}$, 498.31).
14
15
16 Purity: 98%, $t_{\text{R}} = 2.523$ min.
17
18

19
20 **General Procedure 14. Synthesis of 1,2,4-oxadiazoles (35 – 41) and Amides (43 – 51).** To a
21
22 solution of **32** (4.00 g, 10.2 mmol) in MeOH (50 ml) was added 2M aqueous KOH (25 ml, 51
23
24 mmol). The reaction mixture was stirred at 79 °C temperature for 2 hr. After completion
25
26 (monitored by TLC), MeOH was taken off *in vacuo* and the residue diluted with H₂O. The
27
28 solution was then acidified to pH 2 under ice with 3M HCl, and the precipitate was filtered and
29
30 recrystallized in MeOH to afford carboxylic acid (**33**) product as an off-white solid
31
32 quantitatively. A round bottomed flask containing **33** from the previous step (3.50 g, 9.26 mmol)
33
34 was charged with thionyl chloride, SOCl₂ (15 ml), and the resulting mixture refluxed at 80 °C for
35
36 2 hr. After completion, excess thionyl chloride was evaporated *in vacuo*, and the residue was
37
38 taken up in 30 ml toluene and evaporated *in vacuo* three (3) times to give acyl chloride **34** in
39
40 quantitative yield.
41
42
43
44

45
46 An appropriate amine or amidoxime (**31**, 1.2 equiv) was added to a stirring solution containing
47
48 acyl chloride **34** (0.060 g, 0.151 mmol) and Et₃N (43 μl , 0.303 mmol, 2.0 equiv) in 10 ml dry
49
50 THF. The resulting mixture was stirred at room temperature (20 °C) for 6 – 10 h. After
51
52 completion, THF was evaporated *in vacuo*, the residue purified *via* column chromatography to
53
54 afford amides (**43 – 51**) and *O*-acylamidoximes. Each flask containing crude *O*-acyl amidoximes
55
56
57
58
59
60

1
2
3 was charged with K_2CO_3 (0.042 g, 0.303 mmol, 2.0 equiv) and MeCN was added. The resulting
4
5 solution was refluxed at 85 °C for 12 hr. Upon completion, the mixture was filtered, and the
6
7 solvent was taken off *in vacuo*. 1,2,4-oxadiazoles (**35** – **41**) were obtained *via* column
8
9 chromatography using 7 – 12% MeOH/DCM gradient as eluent.
10

11
12
13 **N-(1-(4-(3-isopropyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenethyl) piperidin-4-yl)-1-methyl-1H-**
14
15 **benzo[d]imidazol-2-amine (35)**. Obtained from **31a** (0.019 g, 0.18 mmol) as a light brown solid
16
17 (0.041 g, 61% over two steps). M.p.: 135 – 137 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.42. 1H NMR (600
18
19 MHz, Methanol- d_4) δ 8.06 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.33 (dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz,
20
21 1H), 7.11 (dd, $J = 8.1, 1.2$ Hz, 1H), 7.03 (ddd, $J = 7.6, 7.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.97 (ddd, $J = 8.1, 7.2,$
22
23 1.2 Hz, 1H), 3.80 (tt, $J = 10.9, 4.3$ Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.21 (hept, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.09 – 3.02
24
25 (m, 2H), 2.99 – 2.89 (m, 2H), 2.75 – 2.67 (m, 2H), 2.36 – 2.24 (m, 2H), 2.19 – 2.08 (m, 2H),
26
27 1.76 – 1.62 (m, 2H), 1.22 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 175.44,
28
29 167.09, 155.33, 147.40, 141.09, 133.87, 130.69 (2C), 128.09 (2C), 121.88, 120.99, 120.08,
30
31 114.44, 107.28, 60.09, 54.11 (2C), 50.55, 39.85, 32.49, 31.89 (2C), 30.87, 28.76, 21.32 (2C).
32
33 LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found $m/z = 445.2$ $[M+H]^+$ (cal. For $C_{26}H_{32}N_6O$, 444.26). Purity: 98%, t_R
34
35 = 2.192 min.
36
37
38
39
40

41
42 **N-(2-hydroxyethyl)-4-(2-(4-((1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) amino) piperidin-1-yl)**
43
44 **ethyl) benzamide (43)**. Obtained from 2-aminoethanol (0.011 g, 0.18 mmol) as an off-white
45
46 solid (0.052 g, 82%). m.p.: 214 – 216 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.15. 1H NMR (600 MHz,
47
48 Methanol- d_4) δ 7.90 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.21 (dd, $J = 8.0, 1.1$ Hz, 1H),
49
50 7.10 (dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 1H), 6.96 (ddd, $J = 8.0, 7.5, 1.3$ Hz, 1H), 6.88 (ddd, $J = 7.8, 7.5, 1.1$
51
52 Hz, 1H), 4.19 – 4.12 (dd, $J = 13.8, 6.9$ Hz, 2H), 4.08 – 4.01 (m, 2H), 3.58 (tt, $J = 10.8, 4.1$ Hz,
53
54 1H), 3.52 (s, 3H), 3.18 – 3.10 (m, 2H), 2.84 – 2.78 (m, 2H), 2.70 – 2.62 (m, 2H), 2.35 – 2.28 (m,
55
56
57
58
59
60

1
2
3 2H), 2.16 – 2.06 (m, 2H), 1.73 – 1.64 (m, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, Methanol-*d*₄) δ 168.03,
4
5 142.87, 140.48, 138.03, 136.44, 130.28 (2C), 128.92 (2C), 123.00, 120.38, 119.33, 113.74,
6
7 105.81, 63.28, 62.44, 60.24, 52.48 (2C), 51.22, 42.87, 34.34, 30.19 (2C). LC-MS (APCI⁺/ESI):
8
9 found *m/z* = 422.2 [M+H]⁺ (cal. for C₂₄H₃₁N₅O₂, 421.25). Purity: 99%, *t*_R = 0.138 min.

11
12
13 **General Procedure 15: Hydrolysis of Esters, Synthesis of Carboxylic Acids 42 and 69.** To a
14
15 solution of the ester in EtOH or MeOH was added 2M aqueous KOH (10 equiv). The reaction
16
17 mixture was stirred at 80 °C temperature for 2 hours. After completion, EtOH or MeOH was
18
19 taken off *in vacuo* and the residue diluted with H₂O. The solution was then acidified to pH 2
20
21 under ice with 3N aqueous HCl, and the precipitate was filtered. The product was collected after
22
23 recrystallization in EtOH.

24
25
26
27 **5-(4-(2-(4-((1-methyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) amino) piperidin-1-yl) ethyl) phenyl)-1,2,4-**
28
29 **oxadiazole-3-carboxylic acid (42).** Obtained from **41** (0.040 g, 0.084 mmol) in 5 ml EtOH, as
30
31 an off white crystalline solid (0.036 g, 96%). m.p.: 194 – 196 °C; *R*_f(10% MeOH/DCM), 0.05.
32
33 ¹H NMR (600 MHz, Methanol-*d*₄) δ 8.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.24 (dd,
34
35 *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.11 (dd, *J* = 8.0, 1.3 Hz, 1H), 6.97 – 6.83 (m, 2H), 3.82 (tt, *J* = 11.0, 4.4
36
37 Hz, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.12 – 3.07 (m, 2H), 2.99 – 2.89 (m, 2H), 2.76 – 2.65 (m, 2H), 2.39 – 2.28
38
39 (m, 2H), 2.18 – 2.11 (m, 2H), 1.73 – 1.65 (m, 2H). ¹³C NMR (151 MHz, Methanol-*d*₄) δ 176.09,
40
41 172.25, 169.36, 147.87, 140.33, 138.47, 134.98, 129.83 (2C), 127.22 (2C), 122.39, 120.19,
42
43 119.15, 113.88, 105.22, 60.29, 53.10 (2C), 51.51, 35.87, 34.12, 30.40 (2C). LC-MS
44
45 (APCI⁺/ESI): found *m/z* = 447.2 [M+H]⁺ (cal. for C₂₄H₂₆N₆O₃, 446.21). Purity: 98%, *t*_R = 0.135
46
47
48 min.

49
50
51
52
53 **1-methyl-2-((1-(4-(3-methyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl) phenethyl) piperidin-4-yl) amino)-1H-**
54
55 **benzo[d]imidazole-5-carboxylic acid (69).** Obtained from **68** (0.200 g, 0.42 mmol) in 10 ml
56
57

MeOH, as an off white solid (0.181 g, 94%). m.p.: 134 – 136 °C; R_f (10% MeOH/DCM), 0.08.

^1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ 8.11 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 8.01 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.89 (dd, J = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 3.87 (tt, J = 10.7, 4.0 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.20 – 3.12 (m, 2H), 2.97 – 2.90 (m, 2H), 2.78 – 2.69 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.36 – 2.27 (m, 2H), 2.18 – 2.09 (m, 2H), 1.71 – 1.64 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, Methanol- d_4) δ 175.87, 167.22, 161.89, 141.49, 139.19, 137.77, 133.78, 128.44 (2C), 127.10 (2C), 125.86, 124.13, 119.45, 116.48, 112.58, 56.98, 52.88 (2C), 52.29, 34.69, 33.01, 31.65 (2C), 16.98. LC-MS (APCI $^+$ /ESI): found m/z = 461.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (cal. for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_3$, 460.22). Purity: 96%, t_R = 0.135 min.

7-nitro-N-(2-(2-((1-(4-(5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl) phenethyl) piperidin-4-yl)amino)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)ethyl)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 4-amine (23-NBD). A mixture amine **71** (0.150 g, 0.30 mmol) and NaHCO_3 (0.076 g, 0.90 mmol) in 5 ml H_2O was stirred at 65 °C for 10 min. A solution of 4-chloro-7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazole, NBD-Cl (0.060 g, 0.30 mmol) in MeCN (5 ml) was then added to the heated mixture dropwise *via* syringe. The resulting reaction mixture was stirred at 65 °C for 2 hr, during which a gradual colour change from yellow to dark brown was observed. After completion, the mixture was cooled and MeCN was removed in vacuo. The aqueous residue was then filtered and extracted with EtOAc (3 \times 20 ml). Combined organic phases were washed with brine and dried over anhydrous Na_2SO_4 . Column chromatography using 8 – 10% MeOH/DCM was performed to obtain the product as a blackish solid (0.145 g, 73%). m.p.: 53 – 54 °C. R_f (10% MeOH/DCM), 0.51. ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 8.67 – 8.60 (br-s, 2H), 8.47 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.21 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.04 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.36 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.29 – 7.18 (m, 1H), 7.15 – 7.08 (m, 1H), 7.03 – 7.95 (m, 1H), 6.47 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 4.58 (m, 2H),

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4.13 – 4.08 (m, 1H), 3.99 – 3.83 (m, 2H), 3.77 – 3.62 (m, 4H), 3.29 – 3.16 (m, 4H), 2.38 – 1.97 (m, 4H). LC-MS (APCI⁺/ESI): found $m/z = 663.2$ $[M+H]^+$ (cal. for $C_{31}H_{29}F_3N_{10}O_4$, 662.23).

Purity: 98%, $t_R = 2.658$ min.

Aqueous Solubility. Solubility was measured from amorphous solid forms of the compounds using the turbidimetric method. Following the dissolution of test compound in DMSO to make a 10 mM stock solution, a pre-dilution plate was prepared by taking from each stock solution and serially diluting in triplicate to yield concentrations from 0.25 mM to 10.0 mM on a 96 well plate. From each pre-dilution solution, secondary dilutions of the compounds in both DMSO and 0.01M pH 7.4 PBS were prepared in triplicate on a second 96-well plate. Wells in columns 1-6 would contain compound in DMSO, while those in columns 7 – 12 would contain samples in PBS at similar nominal concentrations as those in DMSO. The final volume of solvent in each assay plate was 200 μ l, prepared by pipetting 4 μ l each of solution from the pre-dilution plate to the corresponding well into both DMSO and PBS (both 196 μ L). This ensures that the final concentration of DMSO in the PBS aqueous buffer does not exceed 2% v/v. Similarly, a second secondary plate containing compound concentrations of 60, 100 and 120 μ M was also prepared. Different concentrations in DMSO were prepared as controls to determine false turbidimetric absorbance readings arising from the compounds in solution absorbing incident radiation at the test wavelength. Following preparation, the assay plate was covered and left to equilibrate for 2 h at 25 °C. Afterwards, UV-vis absorbance readings from the plate were measured at 620 nm using a SpectraMax 340PC³⁸⁴ microplate reader. Plots of corrected absorbance against compound concentration were computed for a graphical representation of the data using MS Excel. Reserpine and hydrocortisone were used as positive and negative controls, respectively.

1
2
3 **In vitro Antiplasmodium Assay at UCT.** Compounds were tested using parasite lactate
4 dehydrogenase assay as a marker for parasite survival. Briefly, the respective stock solutions of
5 CQ diphosphate and test compounds were prepared to 2 mg.ml⁻¹ in distilled water (for CQ) and
6 100% DMSO for test compounds and then stored at -20 °C, and further dilutions were prepared
7
8 on the day of the experiment. The cultures were synchronized in the ring stage using 15 ml of
9
10 5% (w/v) D-sorbitol in water. Synchronous cultures of *PfNF54* (CQ-S) and *PfK1* (MDR) in the
11
12 late trophozoite stage were prepared to 2% parasitemia & 2% hematocrit. Compounds were
13
14 tested at starting concentrations of 10,000 ng.ml⁻¹ (1000 ng.ml⁻¹ for CQ), which were then
15
16 serially diluted 2-fold in complete medium to give 10 concentrations with a final volume of 200
17
18 µl in each well. Parasites were incubated in the presence of the compounds at 37 °C under
19
20 hypoxic conditions (4% CO₂ and 3% O₂ in N₂) for 72 h. After incubation, 100 µl of MalStat
21
22 reagent and 15 µl of resuspended culture were combined, followed by addition of 25 µl of nitro
23
24 blue tetrazolium chloride (NBT). The plates were kept in the dark for 10 min in order to fully
25
26 develop, after which absorbance was measured at 620 nm on a microplate reader. Raw data was
27
28 processed using GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, California, USA) to analyze the dose-response.
29
30
31
32
33
34
35
36

37
38 **In vitro Antiplasmodium Assay at Swiss TPH.**

39
40
41 The testing was performed with the modified [³H]-hypoxanthine incorporation assay, as
42
43 previously reported.³⁴
44
45
46

47 **In vitro Cytotoxicity Assay.** Compounds were screened against Chinese Hamster Ovarian
48
49 (CHO) mammalian cell lines, using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
50
51 diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay.³⁵ Emetine was used as the reference standard. It was
52
53 prepared to 2 mg/ml in distilled water, while the stock solutions of test compounds were
54
55 prepared to 20 mg/ml in DMSO (100%), with the highest concentration of solvent to which the
56
57
58
59
60

1
2
3 cells were exposed having no measurable effect on the cell viability. The initial concentration of
4
5 the compounds and control was 100 $\mu\text{g/ml}$, which was serially diluted in complete medium with
6
7 10-fold dilutions to give 6 concentrations, the lowest being 0.001 $\mu\text{g/ml}$. Plates were incubated
8
9 for 48 h with 100 μl of test compound and 100 μl of cell suspension in each well and developed
10
11 afterward by adding 25 μl of sterile MTT (Thermo Fisher Scientific) to each well, followed by 4
12
13 h of incubation in the dark. The plates were then centrifuged, the medium aspirated, and 100 μl
14
15 of DMSO was added to dissolve crystals before reading the absorbance at 540 nm. Data were
16
17 analyzed, and the sigmoidal dose-response was derived using GraphPad Prism version 4.0
18
19 software. All experiments were performed as three independent biological repeats, each with
20
21 technical triplicates.
22
23
24
25
26

27 **In vitro Metabolic Stability Assay.** This assay was performed in duplicate using a 96-well
28
29 microtiter plate. Test compounds (0.1 μM) were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ in mouse and pooled human
30
31 liver microsomes with a final protein concentration of 0.4 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$; XenoTech, Lenexa, KS
32
33 suspended in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4 for predetermined time points. This was in the
34
35 presence and absence of cofactor-reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
36
37 (NADPH, 1.0 mM). The reactions were quenched by adding ice-cold MeCN containing an
38
39 internal standard (Carbamazepine, 0.0236 $\mu\text{g/ml}$). The samples were centrifuged, and the
40
41 supernatant was analyzed via liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)
42
43 (Agilent Rapid Resolution HPLC, AB SCIEX 4500 MS). The relative loss of the parent
44
45 compound with time was monitored, and plots were prepared for each compound of $\text{Ln}\%$
46
47 remaining versus time to determine the first-order rate constant for compound depletion. This
48
49 was used to calculate the degradation half-life and subsequently to predict the *in vitro* intrinsic
50
51 clearance (CL_{int}) and *in vitro* hepatic extraction ratio (E_{H}).³⁶
52
53
54
55
56
57
58
59
60

***In vivo* Antiplasmodium Assay at Swiss TPH.**

In vivo efficacy was assessed as previously described,³⁷ with the modification that mice (n = 3) were infected with a GFP-transfected *P. berghei* ANKA strain (donated by A. P. Waters and C. J. Janse, Leiden University, The Netherlands), and parasitemia was determined using standard flow cytometry techniques. The detection limit was 1 parasite in 1000 erythrocytes (that is, 0.1%). The activity was calculated as the difference between the mean percent parasitemia for the control and treated groups expressed as a percent relative to the control group. Compounds were dissolved or suspended in a vehicle consisting of 70% Tween-80 and 30% ethanol, followed by a 10-fold dilution in H₂O and oral administration as four consecutive daily doses (4, 24, 48, and 72 h after infection). Blood samples for the quadruple-dose regimens were collected on day 4 (96 h after infection). The survival time in days was also recorded up to 30 days after infection. A compound was considered curative if the animal survived to day 30 after infection with no detectable parasites by slide reading.

In vivo studies conducted at the Swiss TPH, Basel were approved by the veterinary authorities of the Canton Basel-Stadt (Permit No. 1731 and 2303) based on Swiss Cantonal (Verordnung Veterinäramt Basel-Stadt) and National Regulations (The Swiss Animal Protection Law, Tierschutzgesetz).

Fluorescence Live-cell Imaging. A Nunc Lab-Tek II 8-well chamber slide (Thermo Fisher Scientific) with no. 1.5 cover glass was coated with a 150 μ l poly-l-lysine solution for 10 min after which the excess solution was removed, and the chamber slide was air-dried. 5 μ l of human erythrocytes infected with *P. falciparum* chloroquine-sensitive strain (NF54) were resuspended in 5 mL Ringer's solution (pH 7.5). 100 μ l aliquot of the suspended cells was placed in each well of the chamber slide and incubated for 30 min to allow the cells to adhere to the glass chamber.

1
2
3 Excess Ringer's solution was removed alongside all non-adhering parasitized red blood cells.
4
5 The cells were washed twice with Ringer's solution after which a new solution containing the
6
7 appropriate concentration of drugs and organelle markers was added. SIM-SR microscopy was
8
9 performed using a Elyra 7 with Lattice SIM2. A Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC M27
10
11 objective lens was used to keep laser transmission as low as possible to prevent phototoxicity to
12
13 the cells. Images were captured and processed using Zeiss ZEN software (Carl Zeiss Microscopy
14
15 GmbH).
16
17
18
19
20
21
22

23 ASSOCIATED CONTENT

24 25 26 **Supporting Information**

27
28 Information not included in this paper is available in the Supporting Information, which is
29
30 available and free of charge on the ACS Publications website at DOI: (PDF).
31
32

33 34 **AUTHOR INFORMATION**

35 36 37 **Corresponding author**

38
39 *(K.C.) E-mail: Kelly.Chibale@uct.ac.za. Phone: +27-21-6502553. Fax: +27-21-6505195.
40
41

42 43 **ORCID**

44
45 Kelly Chibale: 0000-0002-1327-4727
46

47
48 Dickson Mambwe: 0000-0003-4910-4479
49

50 51 **Notes**

52
53 The authors declare no competing material or financial interest whatsoever.
54
55
56
57

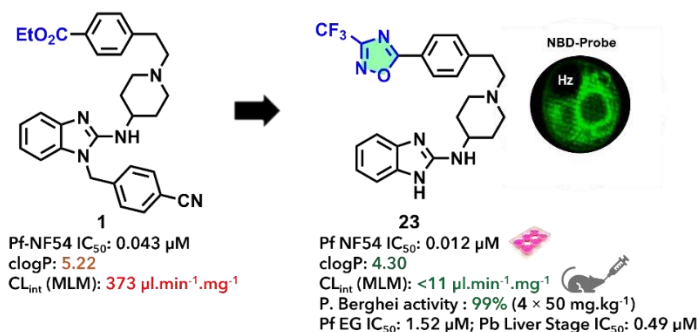
ACKNOWLEDGMENTS

Christoph Fischli and Ursula Lehmann at Swiss TPH for performing *in vitro* and *in vivo* antimalarial efficacy studies, respectively. The Parasitology and DMPK teams at H3D, are acknowledged. University of Cape Town, South African Medical Research Council (K.C., T.J.E, and L-M.B) and the South African Research Chairs Initiative of the Department of Science and Innovation administered through the South African National Research Foundation are greatly appreciated and acknowledged for their support (K.C.).

ABBREVIATIONS USED

AST, astemizole; DMAST, desmethylastemizole; hERG, human *ether-a-go-go*-related gene; EDCI, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; DMAP, 4-Dimethylaminopyridine; CDI, carbonyldiimidazole; DCC, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide; TCDI, 1,1'-Thiocarbonyldiimidazole; DMF, N,N-dimethylformamide; TFA, trifluoroacetic acid anhydride; PTSA, para-toluene sulfonic acid; *P. falciparum*, *Plasmodium falciparum*; *P. berghei*, *Plasmodium berghei*; SI, selectivity index; CQ, chloroquine; AQ, amodiaquine; CHO, Chinese hamster ovarian; ACT, artemisinin combination therapy; MSD, mean survival days; PK, pharmacokinetics; SAR, structure–activity relationship; I_{Kr} , potassium ion current; t_R , retention time; R_f , retardation factor; m.p, melting point; E_H , extraction ratio; IC_{50} , concentration of a drug that is required for 50% inhibition *in vitro*.

Table of Contents Graphic:



REFERENCES

- (1) Collins, F. H.; Paskewitz, S. M. Malaria: Current and Future Prospects for Control. *Annu. Rev. Entomol.* **1995**, *40* (1), 195–219.
- (2) World Health Organization. *World Malaria Report 2020*; Geneva, 2020.
- (3) Ariev, F.; Witkowski, B.; Amaratunga, C.; Beghain, J.; Langlois, A.-C.; Khim, N.; Kim, S.; Duru, V.; Bouchier, C.; Ma, L.; et al. A Molecular Marker of Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum Malaria. *Nature* **2014**, *505* (7481), 50–55.
- (4) Uwimana, A.; Umulisa, N.; Venkatesan, M.; Szigel, S. S.; Zhou, Z.; Munyaneza, T.; Habimana, R. M.; Rucogoza, A.; Moriarty, L. F.; Sandford, R.; et al. Association of Plasmodium Falciparum Kelch13 R561H Genotypes with Delayed Parasite Clearance in Rwanda: An Open-Label, Single-Arm, Multicentre, Therapeutic Efficacy Study. *Lancet Infect. Dis.* **2021**.
- (5) Zhou, Z.; Vorperian, V. R.; Gong, Q.; Zhang, S.; January, C. T. Block of HERG Potassium Channels by the Antihistamine Astemizole and Its Metabolites Desmethylastemizole and Norastemizole. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **1999**, *10*, 836–843.

- 1
2
3 (6) Suessbrich, H.; Waldegger, S.; Lang, F.; Busch, A. E. Blockade of HERG Channels
4 Expressed in *Xenopus* Oocytes by the Histamine Receptor Antagonists Terfenadine and
5 Astemizole. *FEBS Lett.* **1996**, *385*, 77–80.
6
7
8
9
10
11 (7) Chong, C. R.; Chen, X.; Shi, L.; Liu, J. O.; Sullivan, D. J. A Clinical Drug Library Screen
12 Identifies Astemizole as an Antimalarial Agent. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 415–416.
13
14
15
16 (8) Musonda, C. C.; Whitlock, G. A.; Witty, M. J.; Brun, R.; Kaiser, M. Chloroquine–
17 Astemizole Hybrids with Potent in Vitro and in Vivo Antiplasmodial Activity. *Bioorg.*
18
19
20
21
22
23 (9) Roman, G.; Crandall, I. E.; Szarek, W. A. Synthesis and Anti- Plasmodium Activity of
24 Benzimidazole Analogues Structurally Related to Astemizole. *ChemMedChem* **2013**, *8*,
25
26
27
28
29
30
31 (10) Tian, J.; Vandermosten, L.; Peigneur, S.; Moreels, L.; Rozenski, J.; Tytgat, J.; Herdewijn,
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53 (12) Mambwe, D.; Kumar, M.; Ferger, R.; Taylor, D.; Njoroge, M.; Coertzen, D.; Reader, J.;
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Reveal New Astemizole Analogues Active against Plasmodium Falciparum In Vitro. *ACS Med. Chem. Lett.* **2021**, acsmedchemlett.1c00328.
- (13) Lassalas, P.; Gay, B.; Lasfargeas, C.; James, M. J.; Tran, V.; Vijayendran, K. G.; Brunden, K. R.; Kozlowski, M. C.; Thomas, C. J.; Smith, A. B.; et al. Structure Property Relationships of Carboxylic Acid Isosteres. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (7), 3183–3203.
- (14) van der Westhuyzen, R.; Winks, S.; Wilson, C. R.; Boyle, G. A.; Gessner, R. K.; Soares de Melo, C.; Taylor, D.; de Kock, C.; Njoroge, M.; Brunschwig, C.; et al. Pyrrolo[3,4- c]Pyridine-1,3(2 H)-Diones: A Novel Antimycobacterial Class Targeting Mycobacterial Respiration. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (23), 9371–9381.
- (15) Lee, S.; Yi, K. Y.; Yoo, S. E. Introduction of Heterocycles at the 2-Position of Indoline as Ester Bioisosteres. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2004**, *25* (2), 207–212.
- (16) Murarka, S.; Martín-Gago, P.; Schultz-Fademrecht, C.; Al Saabi, A.; Baumann, M.; Fansa, E. K.; Ismail, S.; Nussbaumer, P.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H. Development of Pyridazinone Chemotypes Targeting the PDE δ Prenyl Binding Site. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23* (25), 6083–6093.
- (17) Maharvi, G. M.; Fauq, A. H. A Synthesis of the γ -Secretase Inhibitor BMS-708163. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (50), 6542–6544.
- (18) Pankrat'eva, V. E.; Sharonova, T. V.; Tarasenko, M. V.; Baikov, S. V.; Kofanov, E. R. One-Pot Synthesis of 3,5-Disubstituted 1,2,4-Oxadiazoles Using Catalytic System NaOH–DMSO. *Russ. J. Org. Chem.* **2018**, *54* (8), 1250–1255.
- (19) Kumar, N. N. B.; Kuznetsov, D. M.; Kutateladze, A. G. Intramolecular Cycloadditions of Photogenerated Azaxylylenes with Oxadiazoles Provide Direct Access to Versatile

- 1
2
3 Polyheterocyclic Ketopiperazines Containing a Spiro-Oxirane Moiety. *Org. Lett.* **2015**, *17*
4
5 (3), 438–441.
6
7
8
9 (20) Presser, A.; Hüfner, A. Trimethylsilyldiazomethane? A Mild and Efficient Reagent for
10 the Methylation of Carboxylic Acids and Alcohols in Natural Products. *Monatshefte für*
11 *Chemie/Chemical Mon.* **2004**, *135* (8).
12
13
14
15
16 (21) Pitasse-Santos, P.; Sueth-Santiago, V.; Lima, M. 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles as
17 Scaffolds in the Development of Antiparasitic Agents. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**.
18
19
20
21 (22) Headley, A. D.; Ganesan, R.; Nam, J. The Effect of the Cyclopropyl Group on the
22 Conformation of Chemotactic Formyl Tripeptides. *Bioorg. Chem.* **2003**, *31* (2), 99–108.
23
24
25
26 (23) deGrip, W. J.; Bovee-Geurts, P. H. M.; Wang, Y.; Verhoeven, M. A.; Lugtenburg, J.
27 Cyclopropyl and Isopropyl Derivatives of 11- Cis and 9- Cis Retinals at C-9 and C-13:
28 Subtle Steric Differences with Major Effects on Ligand Efficacy in Rhodopsin. *J. Nat.*
29 *Prod.* **2011**, *74* (3), 383–390.
30
31
32
33
34
35
36 (24) Obach, R. S. Prediction of Human Clearance of Twenty-Nine Drugs from Hepatic
37 Microsomal Intrinsic Clearance Data: An Examination of in Vitro Half-Life Approach and
38 Nonspecific Binding to Microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27* (11), 1350–1359.
39
40
41
42
43
44 (25) Olliaro, P.; Wells, T. N. C. The Global Portfolio of New Antimalarial Medicines Under
45 Development. *Nature* **2009**, *85*, 584–595.
46
47
48
49 (26) Derbyshire, E. R.; Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Clardy, J. Liver-Stage Malaria Parasites
50 Vulnerable to Diverse Chemical Scaffolds. **2012**, *109* (22), 8511–8516.
51
52
53
54 (27) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 (3), 142–155.
4
5
6 (28) Woodland, J. G. Insights into the Mechanism of Action of Quinoline Antimalarials against
7 Plasmodium Falciparum Revealed by Novel Fluorescent Analogues and Chemical
8 Proteomics, University of Cape Town, 2016.
9
10
11
12
13
14 (29) Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D. Fluorescent Lipid Probes: Some Properties and
15 Applications (a Review). *Chem. Phys. Lipids* **2002**, *116* (1–2), 3–18.
16
17
18
19 (30) Edward, R. Use of DNA-Specific Anthraquinone Dyes to Directly Reveal Cytoplasmic
20 and Nuclear Boundaries in Live and Fixed Cells. *Mol. Cells* **2009**, *27* (4), 391–396.
21
22
23
24 (31) Fitch, C. D.; Cai, G.; Chen, Y.-F.; Shoemaker, J. D. Involvement of Lipids in
25 Ferriprotoporphyin IX Polymerization in Malaria. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis*
26 *Dis.* **1999**, *1454* (1), 31–37.
27
28
29
30
31
32 (32) Srivastava, I. K.; Vaidya, A. B. A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of
33 Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (6), 1334–1339.
34
35
36
37 (33) Ncokazi, K. K.; Egan, T. J. A Colorimetric High-Throughput β -Hematin Inhibition
38 Screening Assay for Use in the Search for Antimalarial Compounds. *Anal. Biochem.* **2005**,
39 *338* (2), 306–319.
40
41
42
43
44
45 (34) Snyder, C.; Chollet, J.; Santo-Tomas, J.; Scheurer, C.; Wittlin, S. In Vitro and in Vivo
46 Interaction of Synthetic Peroxide RBx11160 (OZ277) with Piperaquine in Plasmodium
47 Models. *Exp. Parasitol.* **2007**, *115* (3), 296–300.
48
49
50
51
52 (35) Liu, Y.; Peterson, D. A.; Kimura, H.; Schubert, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-
53 Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J.*

- 1
2
3 *Neurochem.* **2002**, *69* (2), 581–593.
4
5
6 (36) Bertrand, M.; Jackson, P.; Walther, B. Rapid Assessment of Drug Metabolism in the Drug
7
8 Discovery Process. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2000**, *11*, S61–S72.
9
10
11 (37) González Cabrera, D.; Douelle, F.; Younis, Y.; Feng, T.-S.; Le Manach, C.; Nchinda, A.
12
13 T.; Street, L. J.; Scheurer, C.; Kamber, J.; White, K. L.; et al. Structure–Activity
14
15 Relationship Studies of Orally Active Antimalarial 3,5-Substituted 2-Aminopyridines. *J.*
16
17 *Med. Chem.* **2012**, *55* (24), 11022–11030.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60