

Entwicklung selektiver Liganden für nukleäre Rezeptoren mit Relevanz bei neurodegenerativen Erkrankungen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Julius Carl Pollinger
aus Erlenbach am Main

Frankfurt am Main (2019)

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: PD Dr. Daniel Merk
Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtke

Datum der Disputation:

“One foot in front of the other - that’s where the magic happens.”

Canadian hiking companion
(West Highland Way 2018)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	9
1.1 Nukleäre Rezeptoren: Struktur und Funktion.....	9
1.1.1 Einteilung nukleärer Rezeptoren.....	9
1.1.2 Struktureller Aufbau nukleärer Rezeptoren.....	11
1.1.3 DNS-Bindung nukleärer Rezeptoren.....	13
1.2 Retinoid X Rezeptoren.....	14
1.2.1 Retinoid X Rezeptoren als Heterodimerpartner.....	14
1.2.2 Expressionsmuster und Unterschiede der RXR-Subtypen.....	16
1.2.3 Liganden der Retinoid X Rezeptoren.....	18
1.3 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren.....	23
1.3.1 Expressionsmuster und physiologische Funktion der PPARs.....	24
1.3.1.1 PPAR α	24
1.3.1.2 PPAR γ	25
1.3.1.3 PPAR δ	27
1.3.2 Liganden der PPARs.....	28
1.4 Nukleäre Rezeptoren als Therapieoptionen bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	30
1.4.1 Alzheimer Demenz.....	32
1.4.2 Multiple Sklerose.....	34
2. Zielsetzung.....	37
3. Ergebnisse und Diskussion.....	40
3.1 Biphenyle als neuartige Ligandstruktur zur präferenziellen Aktivierung einzelner RXR-Subtypen oder RXR-Heterodimer- partner.....	40
3.2 Wy14,643 als Leitstruktur für selektive und duale PPAR und RXR Modulation.....	51
3.3 Computergestützte selektive Optimierung der Nebenaktivität von Cinalukast an PPAR α	62

4. Zusammenfassung.....	67
5. English Summary.....	72
6. Literaturverzeichnis.....	74
7. Abkürzungsverzeichnis.....	100
8. Abbildungsverzeichnis.....	102
9. Tabellenverzeichnis.....	104
10. Schemenverzeichnis.....	105
11. Publikationsliste.....	106
12. Kooperationspartner.....	108
13. Curriculum Vitae.....	110
14. Eidesstattliche Erklärung.....	112
15. Danksagung.....	113
16. Nachdrucke der Publikationen.....	114
16.1 A Novel Biphenyl-based Chemotype of Retinoid X Receptor Ligands Enables Subtype and Heterodimer Preferences	
16.2 Therapeutic applications of the versatile fatty acid mimetic WY14643	
16.3 Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation	
16.4 Computer-Assisted Selective Optimization of Side-Activities – from Cinalukast to a PPAR α Modulator	

1. Einleitung

Nukleäre Rezeptoren (NRs) sind durch Liganden aktivierbare Transkriptionsfaktoren^{1,2}. Sie bilden eine Superfamilie aus 48 verschiedenen Vertretern^{2,3}. Durch die Aktivierung eines nukleären Rezeptors kommt es zur Modulation der Genexpression und damit zur Umwandlung eines Ligandensignals in Veränderungen der Genexpression^{2,4,5}. Auf diese Weise sind nukleäre Rezeptoren an den unterschiedlichsten Prozessen von Metabolismus, Entzündungsprozessen bis hin zu Zellwachstum und -differenzierung beteiligt². Sie stellen daher in vielfältigen Indikationen attraktive molekulare Zielstrukturen für Wirkstoffe dar, so es gelingt sie mit niedermolekularen Verbindungen zu modulieren⁶. Die Entwicklung therapeutisch nutzbarer Liganden für NRs ist mit spezifischen Hindernissen verbunden. Die häufig hoch lipophilen Zielstrukturen binden zumeist nur sehr lipophile Liganden, die sich wiederum oftmals schlecht als Arzneistoffe eignen. Ebenso herrscht innerhalb der nukleären Rezeptoren und ihrer Unterklassen häufig eine hohe strukturelle Ähnlichkeit, was die Frage der Selektivität zu einer zentralen Aufgabe erhebt. Mit den Glitazonen zur Behandlung von Diabetes Mellitus Typ 2 und den Fibraten zur Therapie der Hyperlipidämie sind Wirkstoffe, die NRs als Zielstrukturen besitzen, bereits seit vielen Jahren auf dem Markt erhältlich. Auch befinden sich Kandidaten in späten Phasen der klinischen Entwicklung z. B. für die Behandlung der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung, für die ein positiver Einfluss durch die Modulation des Farnesoid X Rezeptors (FXR) oder der Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptoren (PPARs) postuliert wird⁷⁻⁹.

Neben den metabolischen Krankheiten rücken neurodegenerative Erkrankungen immer mehr in den Fokus der Entwicklung neuer Liganden und hier insbesondere die Alzheimer Demenz (AD) und Multiple Sklerose (MS)¹⁰. NRs sind sowohl bei der Auflösung der neuronalen Entzündung beteiligt als auch bei der Vermittlung körpereigener Reperaturmechanismen^{10,11}, wodurch diese Rezeptoren nicht nur symptomatische, sondern teilweise auch regenerative Therapien möglich erscheinen lassen. Dies würde völlig neue Optionen in der Behandlung von Krankheiten eröffnen, die zentrale Herausforderungen der modernen Medizin darstellen. Zwei Rezeptorklassen, für die bereits erste Grundlagen in diesem Bereich gelegt wurden, sind die PPARs und insbesondere die Retinoid X Rezeptoren (RXRs)¹¹⁻¹³. Um die Hypothesen ihrer Wirksamkeit zu validieren und weiterzuentwickeln, benötigt es neue verträgliche, selektive und potente Liganden. Diese Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Charakterisierung solcher neuartigen Liganden.

1.1 Nukleäre Rezeptoren: Struktur und Funktion

1.1.1 Einteilung nukleärer Rezeptoren

Die Einteilung der nukleären Rezeptoren beruht zumeist auf evolutionshistorischen Unterschieden^{3,14}. Eine systematische Einteilung dieser Superfamilie erfolgte zunächst auf Basis ihrer phylogenetischen Verwandtschaft durch einen klar definierten Code, der für nukleäre Rezeptoren aller Lebewesen anwendbar ist und jederzeit erweitert werden kann³. Diese Einteilung ist günstig für eine eindeutige Zuordnung der Rezeptoren, unabhängig von Trivialnamen. Die Rezeptoren werden hierbei in sechs Unterfamilien unterschiedlicher Größe eingeteilt. Auffällig ist, dass mit der phylogenetischen Gruppierung auch ähnliche Eigenschaften verbunden sind: So bilden z. B. Vertreter der Gruppe 3 bevorzugt Homodimere, während Rezeptoren der Gruppe 1 und 2 primär als Heterodimere im Komplex mit RXR aktiv sind¹⁵ (Tabelle 1).

Tabelle 1 Humane nukleäre Rezeptoren^{2,3,16,17}

Nomenklatur Code	Bezeichnung (engl.)	Abkürzung	Bekannte Liganden (Beispiele)	Monomer (M), Homodimer (D) oder Heterodimer (H)
NR1A1	Thyroid hormone receptor α	TR α	Schilddrüsenhormone	H
NR1A2	Thyroid hormone receptor β	TR β	Schilddrüsenhormone	H
NR1B1	Retinoic acid receptor α	RAR α	Retinsäure	H
NR1B2	Retinoic acid receptor β	RAR β	Retinsäure	H
NR1B3	Retinoic acid receptor γ	RAR γ	Retinsäure	H
NR1C1	Peroxisome proliferator-activated receptor α	PPAR α	Fettsäuren	H
NR1C2	Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ	PPAR β/δ	Fettsäuren	H
NR1C3	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	PPAR γ	Fettsäuren	H
NR1D1	Reverse-Erb α	REV-ERB α	Häm ¹⁸	M, D
NR1D2	Reverse-Erb β	REV-ERB β	Häm ¹⁸	M, D
NR1F1	RAR-related orphan receptor α	ROR α	Oxysterole ¹⁹	M
NR1F2	RAR-related orphan receptor β	ROR β	Oxysterole ¹⁹	M
NR1F3	RAR-related orphan receptor γ	ROR γ	Oxysterole ¹⁹	M
NR1H2	Liver X receptor	LXR β	Oxysterole	H
NR1H3	Liver X receptor	LXR α	Oxysterole	H
NR1H4	Farnesoid X receptor	FXR	Gallensäuren	H
NR1I1	Vitamin D receptor	VDR	Vitamin D ₃	H
NR1I2	Pregnane X receptor	PXR	Gestagene	H
NR1I3	Constitutive Androstane Receptor	CAR	Xenobiotika	H
NR2A1	Hepatocyte nuclear factor 4 α	HNF-4 α	Fettsäuren ²⁰	D
NR2A2	Hepatocyte nuclear factor 4 γ	HNF-4 γ	Fettsäuren	D
NR2B1	Retinoic X receptor α	RXR α	9- <i>cis</i> -Retinsäure	D, H
NR2B2	Retinoic X receptor β	RXR β	9- <i>cis</i> -Retinsäure	D, H
NR2B3	Retinoic X receptor γ	RXR γ	9- <i>cis</i> -Retinsäure	D, H
NR2C1	Testicular orphan receptor 2	TR2	unbekannt	H, D ^{21,22}
NR2C2	Testicular orphan receptor 4	TR4	unbekannt	H, D ^{21,22}
NR2E1	Tailless homolog orphan receptor	TLX	unbekannt	M, D
NR2E3	Photoreceptor-cell-specific nuclear receptor	PNR	unbekannt	M, D
NR2F1	Chicken ovalbumin upstream promoter – transcriptions factor α	COUP-TF α	unbekannt	D, H
NR2F2	Chicken ovalbumin upstream promoter – transcriptions factor β	COUP-TF β	unbekannt	D, H
NR2F6	Chicken ovalbumin upstream promoter – transcriptions factor γ	COUP-TF γ	unbekannt	D, H
NR3A1	Estrogen receptor α	ER α	Estradiol	D
NR3A2	Estrogen receptor β	ER β	Estradiol	D
NR3B1	Estrogen related receptor α	ERR α	unbekannt	M, D
NR3B2	Estrogen related receptor β	ERR β	unbekannt	M, D ²³
NR3B3	Estrogen related receptor γ	ERR γ	unbekannt	M, D ²³
NR3C1	Glucocorticoid receptor	GR	Glukokortikoide	H, D ²⁴
NR3C2	Mineralocorticoid receptor	MR	Glukokortikoide und Mineralokortikoide	H, D ²⁴

NR3C3	Progesterone receptor	PR	Progesteron	D
NR3C4	Androgen receptor	AR	Androgene	D
NR4A1	Nerve-growth-factor-induced gene B	NGF1-B / Nurr77	unbekannt	M, D, H
NR4A2	Nur-related factor 1	NURR-1	unbekannt	M, D, H ^{25,26}
NR4A3	Neuron-derived orphan receptor 1	NOR-1	unbekannt	M, D, H ²⁶
NR5A1	Steroidogenic factor 1	SF-1	Oxysterole	M
NR5A2	Liver receptor homolog 1	LRH-1	Phospholipide ²⁷	M ²⁸
NR6A1	Germ cell nuclear factor	GCNF	unbekannt	D
NR0B1	Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1	DAX-1	unbekannt	H ²⁹
NR0B2	Small heterodimer partner	SHP	unbekannt	H

Die natürlichen Liganden nukleärer Rezeptoren, so sie bereits identifiziert sind, entstammen unterschiedlichster Genese. Es wurden sowohl Hormone, wie das Estrogen oder Glukokortikoide, Gallensäuren, Fettsäuren, aber auch verschiedenste Xenobiotika als Modulatoren von nukleären Rezeptoren identifiziert¹⁶ (vgl. Tabelle 1).

1.1.2 Struktureller Aufbau nukleärer Rezeptoren

Obwohl nukleäre Rezeptoren strukturell sehr unterschiedliche Liganden zu binden vermögen, ist ihr grundsätzlicher Aufbau hochkonserviert und findet sich in fast allen Vertretern wieder (Abbildung 1).



Abbildung 1 Allgemeiner Aufbau nukleärer Rezeptoren

Im N-terminalen Bereich der Rezeptoren (A/B-Domäne) befindet sich die Aktivierungsfunktion 1 (AF-1), die ligandenunabhängig mit Transkriptionsfaktoren interagiert^{14,30,31}. Dieser Bereich ist strukturell hochvariabel, selbst innerhalb von Rezeptor-Subtypen. Wozu diese Diversifikation nötig ist, ist nicht völlig verstanden. Dennoch übernimmt die AF-1 sowohl durch ligandenunabhängige Aktivierung und als auch durch Stabilisierung der AF-2 eine wichtige Funktion^{14,16,31,32}. Zusätzlich kann dieser Bereich auch Ziel von posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungsvorgängen werden, wodurch eine ligandenunabhängige Modulation der Rezeptoraktivität vorgenommen werden kann³³⁻³⁵.

Im Anschluss folgt die C-Domäne, die DNS-Bindedomäne (DBD), welche die Koordination an die DNS-Erkennungssequenzen (*response elements*, RE) übernimmt^{30,31}. Dieser hochkonservierte Bereich der NRs wird strukturell maßgeblich von zwei Zinkfingermotiven bestimmt, die die dreidimensionale Struktur der DBD mit ihren zwei beteiligten α -Helices definieren. Die Helices stehen dabei senkrecht zueinander: Während die erste Helix starke Wechselwirkungen mit der DNS eingeht und für die Bindung an spezifische Sequenzen verantwortlich ist (fixiert durch den N-terminalen Zinkfinger, auch P-Box genannt), spielt die zweite Helix eine wichtige

Rolle in der Dimerisierung der DBDs zweier NRs (fixiert durch das C-terminale Zinkfingermotiv, die D-Box) (Abbildung 2)^{14,31,36-38}. Zudem schließt sich an die beiden Zinkfinger motive eine C-terminale Verlängerung (*C-terminal extension*, CTE) an, die über ihre Länge und die beteiligten Aminosäuren u.a. einstellt, welche REs nach einer Dimerisierung adressiert werden¹⁶.

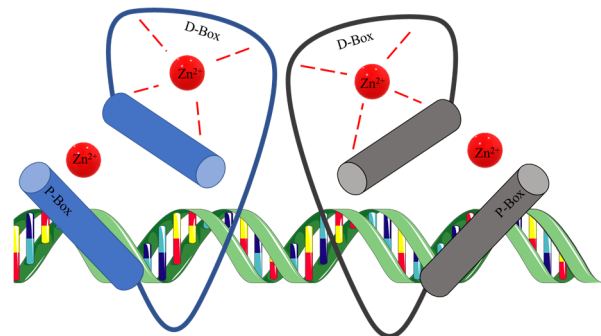


Abbildung 2 Schematische Darstellung zweier DBDs mit den beiden Zinkfingermotiven. Die D-Box ist an der Dimerisierungszone beteiligt, während die P-Box essentiell für die Erkennung der spezifischen RE ist. Die beiden α -Helices stehen senkrecht zueinander.

Nach einem Überbrückungsbereich (*hinge*-Region, D-Domäne) schließt sich am C-terminalen Ende (E-Domäne) des Rezeptors die Ligandenbindedomäne (LBD) an. Die Sekundärstruktur der LBD erscheint zunächst ebenfalls hochkonserviert, bestehend aus zumeist zwölf α -Helices und einem β -Faltblatt-Abschnitt, die in Form eines sogenannten antiparallelen α -helikalen Sandwichs aus drei Schichten angeordnet sind und eine zumeist hydrophobe Tasche ausbilden^{14,16,30,31,38-40}. Die Tasche ist jedoch durch ihre Form und die beteiligten Aminosäuren – insbesondere die vorhanden hydrophilen Aminosäuren – variabel und bindet je nach Rezeptor unterschiedliche (endogene) Liganden, um spezifische Ligandensignale in verschiedene Effekte umzuwandeln^{16,38}. Die LBD enthält in ihrer C-terminalen Helix (meist Helix 12) auch die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion-2 (AF-2). Im inaktiven Zustand sind Corepressoren wie der dämpfende Mediator des Retinoid- und Thyroidhormonrezeptors (*silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor*, SMRT) oder der nukleäre Corepressor 1 (NCoR1) im Bereich von Helix 3 und 4 der LBD an den NR gebunden. Diese Repressoren rekrutieren u.a. Histondeacetylasen, wodurch die DNS kompakter an die Histone gebunden wird und keine Transkription stattfinden kann^{14,30}. Nachdem der Rezeptor einen orthosterisch aktivierenden Liganden gebunden hat, kommt es zu Konformationsänderungen, durch die insbesondere die AF-2 ihre Position verändert und gemeinsam mit Helix 3 und 4 eine neue Oberfläche präsentiert. Dadurch verändert sich die Bindungsstelle der LBD zu den Corepressoren derart, dass

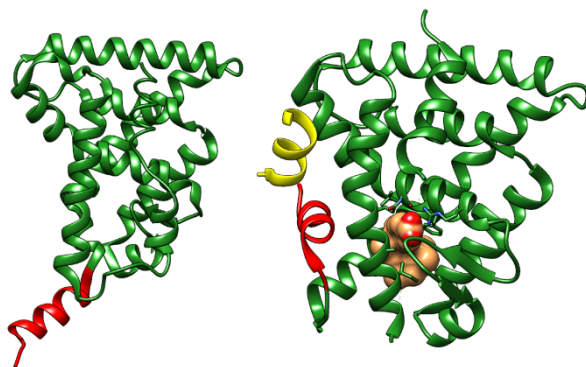


Abbildung 3 Prinzip der Aktivierung nukleärer Rezeptoren durch konformellen Veränderung nach Ligandbindung am Beispiel des Retinoid X Rezeptor α . Ohne Liganden (links, PDB: 1G1U⁴³ zeigt die AF-2 (rot) vom Rezeptor weg in die Umgebung. Durch Bindung eines Agonisten (rechts, PDB: 4K61⁴⁴) wie Bexaroten (I, braun, Abbildung 6) klappt die AF-2 (rot) an den Rezeptor heran und ermöglicht die Bindung eines Coaktivators (gelb).

schließt den Liganden in der Bindungstasche ein, der wiederum die neue Konformation stabilisiert^{43,44} (Abbildung 3). Orthosterische Antagonisten blockieren im Gegensatz dazu die

sich diese von der LBD lösen. Die neue Oberfläche, eine hydrophobe Spalte, bildet eine neue Bindungsstelle, die von Coaktivatoren mit einem LXXLL-Motiv (L steht für Leucin und X für eine beliebige Aminosäure) erkannt und adressiert werden kann¹⁴. Kommt es zur Bindung von Coaktivatoren, wie dem Steroidrezeptor Coaktivator 1 (SRC-1) oder dem PPAR γ -Coaktivator 1 α (PGC-1 α), werden die Histone deacetyliert, womit die Transkription gestartet werden kann^{14,16,30,41}. Die Ligandenbindung verläuft dabei teilweise im Stil einer Mausefalle (*mouse trap*)⁴²: Die Konformationsänderung

Bindungstasche, sind aber nicht in der Lage die neue bzw. die aktive Konformation der AF-2 zu induzieren oder zu stabilisieren^{16,30,40}. Außerdem ist die LBD teilweise an der Dimerisierung des Rezeptors beteiligt³¹.

1.1.3 DNS-Bindung nukleärer Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren können sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vorkommen⁴⁵. Ihre Hauptwirkung entfalten sie über die Modulation der Genexpression, es gibt aber auch Effekte, die nicht über diesen Weg vermittelt werden. Diese werden als nicht-genomische Effekte bezeichnet, sind zumeist schneller als die genomischen Effekte und spielen sich häufig im Zytosol ab⁴⁵⁻⁴⁷. Dort können aktivierte NRs etwa den Einfluss von Ca²⁺-Ionen modulieren oder Phosphorylierungen beeinflussen^{45,48,49}. Im Zellkern können sie bereits an ihr RE der DNS gebunden vorliegen⁴⁵. Kommt es zur Aktivierung durch einen Liganden, verstärkt sich die Bindung durch die Konformationsänderung und Corepressoren werden durch Coaktivatoren ersetzt, wodurch sie die Transkription ihrer Zielgene induzieren oder reprimieren. Die REs werden definiert aus einer sechsstelligen Basensequenz, deren Leitmotiv sich mit AGGTCA darstellen lässt^{14,50}. Einige NRs binden als Monomere an die DNS (vgl. Tabelle 1), die Mehrheit jedoch bildet entweder Homodimere oder Heterodimere mit dem Retinoid X Rezeptor (NR2B1-3, RXR) aus. Daher sind die meisten REs auch aus einer doppelten Erkennungssequenz aufgebaut. Die Anordnung der Bindungsstellen kann dabei entweder palindromisch (*palindromic repeat*, PR), in invertierter Reihenfolge (*inverted repeat*, IR) oder als direkte Wiederholung (*direct repeat*, DR) vorliegen¹⁴, die jeweils von unterschiedlichen Dimeren adressiert werden. Für die Funktionalität dieser Erkennungssequenzen spielt nicht nur die Orientierung der REs eine Rolle, auch der vorhandene Abstand zwischen den Wiederholungen beeinflusst die Spezifität der Rezeptorbindung^{14,50-52}. Zusätzlich beeinflusst auch die Orientierung der Heterodimere die Aktivität. Bei Heterodimeren mit RXR kann es immer zu zwei unterschiedlichen Bindungsmodi kommen, je nachdem, ob RXR am 5'- oder am 3'-Ende des RE bindet. Dieser kleine Unterschied in der Orientierung der Heterodimere kann dazu führen, dass ein Dimerpaar nicht mehr auf die Aktivierung eines Liganden reagiert und eine Transkription initiiert^{14,53} (Abbildung 4).

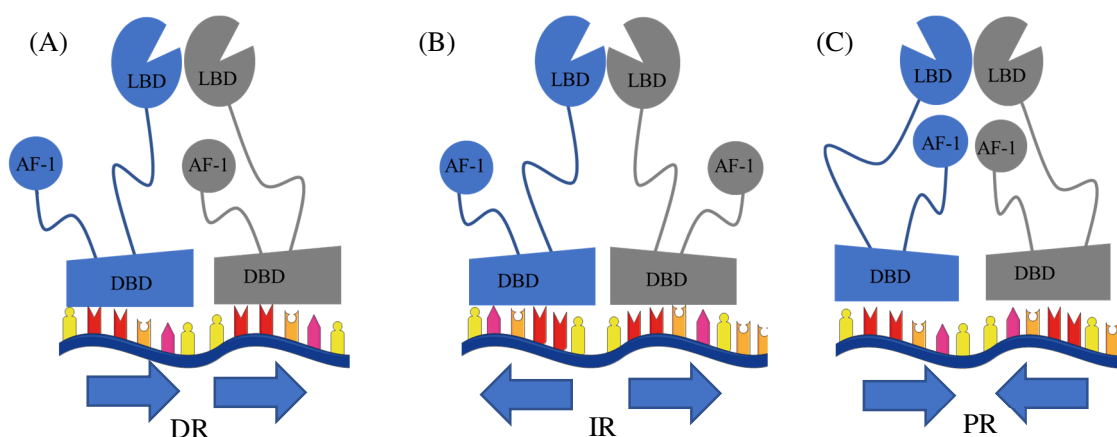


Abbildung 4 Schematische Darstellung der verschiedenen Bindungsmodi von Heterodimeren in Abhängigkeit der RE-Sequenz. (A) Bindung von Heterodimeren an einem DR (B) Bindung von Heterodimeren an einem IR (C) Bindung von Heterodimeren an einem PR. Jeder dieser Fälle kann auch mit vertauschter Position von blauem und grauem Rezeptor angenommen werden.

Die Vielfalt und Komplexität der nukleären Rezeptoren stellen sie als spannende aber herausfordernde Zielstruktur in der pharmazeutischen Entwicklung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wird insbesondere auf die niedermolekulare Modulation der Retinoid X Rezeptoren und der Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (NR1C1-3, PPAR) eingegangen.

1.2 Retinoid X Rezeptoren

Die Retinoid X Rezeptoren (RXRs) α , β und γ ⁵⁴ sind ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren (nukleäre Rezeptoren), die zu Beginn der 1990er Jahre erstmals isoliert wurden^{2,54}. Die RXRs sind ihrem Aufbau nach zunächst einmal klassische Vertreter der nukleären Rezeptoren. Sie besitzen den allgemeinen Aufbau, wie er in Kapitel 1.1 beschrieben ist, und nach erfolgter Ligandenbindung kommt es durch Konformationsänderungen, die insbesondere Helix 12 umfassen, zu einem Austausch von Corepressoren gegen Coaktivatoren. Alle drei RXR-Subtypen werden durch drei voneinander unabhängigen Genen kodiert⁵⁵. Trotz dieser unterschiedlichen Kodierung besitzen die RXR Subtypen eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit und das insbesondere im Bereich der LBD. Die Aminosäuren, die für die Ausbildung der Ligandbindestelle verantwortlich sind, sind in allen drei RXR Subtypen identisch und sehr lipophil^{56,57}. Außer einer starken Interaktion mit einem Arginin an einem Ende der Ligandbindestelle, tief im Inneren, kommt es fast ausschließlich zu lipophilen Wechselwirkungen mit den Liganden⁵⁸. Eine weitere Herausforderung ist die Flexibilität der LBD der RXRs, denn es hat sich gezeigt, dass sie sich zu einem gewissen Grad an ihre Liganden anpassen kann⁵⁹, was die Identifikation von kritischen Strukturmerkmalen erschweren kann. Es lohnt sich dennoch diese Herausforderung anzunehmen, da die RXRs eine zentrale Rolle in der Superfamilie der nukleären Rezeptoren spielen. Sie können nicht nur als aktive Homodimere vorliegen und damit unabhängig verschiedene Gene in ihrer Expression beeinflussen⁶⁰, sondern insbesondere als Bindungspartner für andere nukleäre Rezeptoren dienen^{2,55,61}. Diese Heterodimere – bestehend aus einem Subtyp der RXRs und einem anderen nukleären Rezeptor – lassen sich wiederum in drei Klassen einteilen: permissive, konditionelle und nicht-permissive Heterodimere^{62,63} (vgl. Tabelle 2).

1.2.1 Retinoid X Rezeptoren als Heterodimerpartner

In nicht-permissiven Heterodimeren hängt die Transkriptionsinduktion ausschließlich von dem Liganden des Bindungspartners ab, sie sind also durch Zugabe von RXR-Agonisten nicht induzierbar⁶². Bei diesen Dimeren handelt es sich häufig um die Zielstrukturen von Hormonen wie dem Vitamin D Rezeptor (VDR, NR1I1) (VDR/RXR) oder den Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR α/β , NR1A1 und NR1A2) (TR/RXR). Dadurch, dass hier nur die Anwesenheit des hochpotenten Hormons die Induktion der Zielgene ermöglicht, unterliegt diese Aktivität einer linearen Kontrolle. Die Modulation ist nur von einem einzigen, vom Körper physiologisch kontrollierten, Liganden abhängig^{2,64}. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass zumindest beim Schilddrüsenhormonrezeptor ein indirekter Einfluss von RXR-Liganden vorliegen könnte: Durch Bindung eines Agonisten für RXR wird die Aktivität des Schilddrüsenhormons T3 reduziert, indem die Bindung insgesamt destabilisiert wird⁶⁵. Inwieweit diese Form der Modulation physiologisch bedeutsam ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Allgemein gilt bisher die Lehrmeinung, dass RXR in den nicht-permissiven Dimeren nur eine untergeordnete Rolle spielt ohne direkten Einfluss auf die Aktivität auszuüben („stiller Partner“). Ob sich dies auch weiterhin halten lässt, ist im Anbetracht der neueren Erkenntnisse keine Selbstverständlichkeit mehr und rückt die nicht-permissiven Heterodimere und ihre physiologische Modulation in ein neues Licht.

Auch im zweiten Fall, bei konditionellen Heterodimeren, z.B. den Retinsäure-Rezeptoren (*retinoic acid receptor*, RARs, NR1B1-3) wird das Dimer nur aktiv, wenn der Ligand des

Bindungspartners vorhanden ist. Ein alleiniges Vorliegen des RXR-Agonisten ist nicht ausreichend, um eine Transkription zu ermöglichen, allerdings lässt sich der Effekt des Partnerliganden verstärken, wenn gleichzeitig ein RXR-Ligand vorliegt. Das bedeutet, dass RXR-Liganden hier weitergehende modulatorische Fähigkeiten besitzen als im nicht-permissiven Heterodimer, sie aber keine unabhängige Geninduktion ermöglichen^{53,63,66}.

Das pharmazeutisch-medizinische Interesse an den RXRs resultiert unter anderem aus ihrer einzigartigen Rolle, die sie in den permissiven Heterodimere spielen: Durch die Bindung eines Liganden für RXR sind diese Heterodimere in der Lage, die gleiche Wirkung zu entfalten wie durch die Bindung des Liganden für den Heterodimerpartner⁶. Der Effekt kommt vermutlich durch eine allosterische Veränderung der Konformation des Heterodimerpartners zustande, wodurch sich Corepressoren auch von diesem Rezeptor lösen und Coaktivatoren binden können, genauso wie wenn der Heterodimerpartner seinen eigenen Liganden binden würde^{63,67,68}. Da sich der Partnerrezeptor genauso verhält, als hätte er einen eignen Liganden gebunden, bezeichnet man dies auch als „Phantomliganden-Effekt“⁶⁷. Die Auswirkung der RXR-Agonisten ist sogar noch ausgeprägter, wenn gleichzeitig sowohl ein Agonist für RXR als auch für den Bindungspartner vorliegt. Kommt es zu dieser Situation, kann ein synergistischer Effekt beobachtet werden^{63,68}. Viele der permissiven nukleären Rezeptoren, wie der Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR), der Leber X Rezeptor (LXR, NR1H2, NR1H3) oder der Farnesoid X Rezeptor (FXR, NR1H4), besitzen als Liganden Moleküle, die man über die Nahrung zu sich nimmt (vgl. Tabelle 1)^{2,64}. Zudem binden diese Liganden oft nur mit schwacher Affinität. Der Synergismus aus gleichzeitiger Aktivierung von RXR und dem Bindungspartner kann dabei helfen, auch aus einem schwachen Signal (z.B. von einer aus der Nahrung gewonnenen Fettsäure) eine starke zelluläre Reaktion hervorzurufen, um den Ligandstimulus in einen zellulären Effekt umzuwandeln^{2,55}.

Die Sonderstellung der RXRs, Heterodimere mit einem Großteil der nukleären Rezeptoren zu bilden, offenbart sie als potentiell zentralen Angriffspunkt für die Modulation diverser (patho)physiologischer Vorgänge⁵⁵.

Tabelle 2 Unterschiedliches Ansprechen der nukleären Rezeptoren auf vorhandene Kombinationsmöglichkeiten der jeweiligen Agonisten

Heterodimer-Klasse	RXR-Agonist	Dimerpartner-Agonist	Effekt	Beispiel
nicht-permissiv	-	+	Aktivierung	VDR
	+	-	keine Aktivierung	
	+	+	Aktivierung	
konditionell	-	+	Aktivierung	RAR
	+	-	keine Aktivierung	
	+	+	Synergistische Aktivierung	
permissiv	-	+	Aktivierung	LXR
	+	-	Aktivierung	
	+	+	Synergistische Aktivierung	

1.2.2 Expressionsmuster und Unterschiede der RXR-Subtypen

Jede Zelle in unserem Körper, die einen Zellkern besitzt, exprimiert zumindest einen Subtyp der RXRs^{55,58}. Für jeden RXR Subtypen liegen mehrere Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen entstehen. Sie unterscheiden sich zumeist im N-terminalen Bereich der A/B-Domäne, bisher konnte allerdings noch kein funktioneller Unterschied der verschiedenen Isoformen festgestellt werden^{55,69-71}.

Die verschiedenen Subtypen zeigen eine deutlich unterschiedliche Verteilung im Körper: In Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich RXR α über den ganzen Körper verteilt, aber eine besondere Häufung in Leber, Nieren und Milz, sowie in der Epidermis vorliegt^{54,55}. Für RXR β konnte kein gesondertes Expressionsmuster identifiziert werden, womit dieser Subtyp nahezu ubiquitär vorkommt^{54,55}. Nur für RXR γ wurde eine engere Lokalisation in der Verteilung beobachtet: dieser Subtyp der RXRs wird fast ausschließlich in zentralen Nervensystem (ZNS), in Herzmuskeln, teilweise in den Nebennieren und Muskelzellen exprimiert^{54,55}. Auch innerhalb des ZNS ist noch eine deutlich eingeschränkte Verteilung erkennbar. So kommt es zu einer Expression von RXR γ im Hypothalamus, im Striatum, in Teilen der Amygdala, in der Hypophyse und im Rückenmark^{72,73}. Die Neuronen im Striatum, die die höchste RXR γ -Expression aufweisen, sind größtenteils Projektionsneurone und setzen verschiedene Transmitter wie Substanz P oder Enkephaline frei^{73,74}. Die Lokalisation, die sich mit einer starken dopaminergen Innervation deckt, lässt einen Einfluss von Dopamin auf diese Neurone vermuten, zumal die untersuchten Zellen entweder den D2- oder den D1-Rezeptor exprimieren⁷³. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Aldehyddehydrogenase 2 (ADH2) verstärkt im dopaminergen System exprimiert wird, ein Enzym, das in der Lage ist aus Retinal die Retinsäure herzustellen⁷⁵. Eine Assoziation von Dopamin- und Retinsäure-Signalwegen wäre somit zumindest naheliegend. Zu erwähnen ist die Expression des RXR γ in den Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten)⁷⁶, da für diese Zelltypen eine Beteiligung an (patho-)physiologischen Vorgängen bei neurodegenerativer Erkrankungen postuliert wird^{12,13}. Eine besonders hohe Expression findet sich auch in Basalganglien (Putamen und Nucleus Accumbens), die sowohl mit Sucht als auch mit motorischen Funktionen assoziiert sind⁷⁶.

Ob die verschiedenen Subtypen auch unterschiedliche Funktionalitäten besitzen, ist noch nicht abschließend geklärt. In verschiedenen Tierversuchen wurden gezielt einzelne oder mehrere Subtypen ausgeschaltet („Gen-Knockout“), um den Einfluss einzelner RXR-Subtypen genauer zu untersuchen.

Ein Knockout des RXR α -Gens führt zu einem Schwangerschaftsabbruch, teilweise auch noch zu sehr späten Schwangerschaftszeitpunkten⁷⁷. Die bis dahin entwickelten Knockout-Embryonen weisen schwere Fehlbildungen insbesondere an den Augen und am Herzmuskel auf und es wird vermutet, dass insbesondere die Veränderungen am Herzen die Abbrüche bedingen⁷⁷. Infolge des Knockout-Experimentes wurde beobachtet, dass heterozygote RXR α -Knockout Mäuse (die noch über ein intaktes RXR α -Gen verfügen) zwar lebensfähig sind, sie besitzen dabei aber ein signifikant reduziertes Gewicht und eine reduzierte Körpergröße⁷⁷. Um den Einfluss von RXR α insbesondere in der Leber – einer der Hauptorte der RXR α -Expression⁵⁴ – zu untersuchen, wurde ein Leber-spezifischer RXR α -Knockout durchgeführt⁷⁸. Diese organspezifische Veränderung wurde nicht durch eine verstärkte Expression der anderen Subtypen kompensiert, und offenbarte Veränderungen in der Proteinausstattung der Leber sowohl unter

Normalbedingungen als auch bei induzierten Stressmodellen, wie einer Ernährung mit erhöhter Cholesterolfuhr⁷⁸. Durch die Versuche in dieser Studie konnte bewiesen werden, dass RXR-Heterodimere *in vivo* aktiv sind und die Gegenwart von RXR α essentiell für die Induktion diverser Zielgene ist⁷⁸.

Ein kompletter Knockout des RXR β -Subtyps hatte ebenfalls eine erhöhte embryonale Sterblichkeit zur Folge. Etwa 50% der homozygot RXR β -defizienten Mäuse verstarben vor, während oder unmittelbar nach der Geburt⁷⁹. Die überlebenden Knockout-Mäuse zeigten wiederum keine phänotypischen Veränderungen, mit der Ausnahme, dass die männlichen RXR β ^{-/-} Mäuse steril waren⁷⁹. Diese Beobachtung scheint primär auf einer Funktionsstörung der Spermatogenese zu beruhen. In der Maus wird in den Sertoli-Zellen nur RXR β exprimiert und dessen Fehlen kann offenbar nicht ausgeglichen werden, während in den restlichen Zellen die Effekte größtenteils kompensiert wurden. In anderen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass ein Effekt, der auf dem Fehlen eines NRs beruht, auch auftreten kann, wenn der passende RXR-Subtyp als Heterodimerpartner fehlt⁸⁰. Das legt nahe, dass es Effekte von Heterodimerbildenden nukleären Rezeptoren gibt, die nur in Kombination mit dem „richtigen“ RXR-Subtypen vermittelt werden können. Fehlt dieser Subtyp, kann auch eine Aktivierung des nukleären Partnerrezeptors nicht ausreichen, um den Effekt auszulösen. Es ist nicht geklärt, ob die Sterilität eine direkte Folge des Verlustes von RXR β darstellt, oder ob es sich um einen solchen indirekten Effekt durch den Knockout des Heterodimerpartners handelt⁷⁹.

Durch sein stärker definiertes Expressionsmuster, sowohl was das Gewebe^{54,55,72}, als auch das zeitliche Auftreten im Rahmen der Embryogenese angeht⁸¹, nimmt der RXR γ -Subtyp eine Sonderstellung unter den Retinoid X Rezeptoren ein und besitzt das größte Potential, therapeutisch nutzbar gemacht zu werden¹¹. RXR γ -Knockout Mäuse sind lebensfähig und entwickeln sich – auch in Bezug auf die Zeugungsfähigkeit – normal, ohne dass es zu einer kompensatorischen, erhöhten Expression der anderen Subtypen kommt^{81,82}. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass RXR γ -Knockout Mäuse erhöhte Serumwerte von Thyrotropin (*thyroid-stimulating hormone*, TSH) und dem Schilddrüsenhormon T4 aufweisen⁸². Sie zeigten damit einen ähnlichen Phänotyp wie er bei Vitamin-A-Mangel oder einer Schilddrüsenhormonresistenz auftritt^{82,83}. Dieser Zusammenhang wurde intensiv beforscht, zumal die Hypophyse, die für die Ausschüttung von TSH verantwortlich ist, einer der Hauptexpressionsorte von RXR γ ist⁷². Der hier gezeigte Effekt scheint nicht über eine direkte Variation der Aktivität des TR/RXR-Heterodimers zu verlaufen, sondern über eine RXR γ -vermittelte Blockade der TSH-Promotorregion, und dieser RXR γ -Effekt lässt sich auch nicht durch einen anderen RXR-Subtypen wiederherstellen⁸⁴. Durch die fehlende Blockade der TSH-Produktion im RXR γ -Knockout Szenario kommt es zu einem mangelhaften negativen Feedback-Mechanismus zwischen TSH- und T4-Produktion, womit die erhöhten Serumlevel erklärbar sind^{82,84}. Diese Hypothese wird auch durch eine weitere Beobachtung gestützt: Patienten, die mit dem pan-RXR-Agonisten Bexaroten (**1**) behandelt werden, zeigen eine dosisabhängige Hypothyreose⁸⁵. Eine verstärkte Aktivierung von RXR γ in der Hypophyse könnte somit eine verstärkte Unterdrückung der TSH-Promotorregion bewirken, wodurch wiederum die TSH- und folglich auch die Schilddrüsenhormonproduktion abfällt, was dem Krankheitsbild einer zentralen Hypothyreose entspricht⁸⁵.

Auch wenn die RXR-Subtypen funktionell offensichtlich eine hohe Redundanz aufweisen und der Mangel eines Subtypen häufig durch die restlichen Subtypen kompensiert werden kann,

zeigen vereinzelte Effekte, dass die spezifische Verteilung und unterschiedlichen Expressionsmuster der RXRs zielgerichtete Modulationen ermöglichen könnten^{81,86}. Die selektive Modulation einzelner Subtypen, oder auch nur die selektive Aussparung in der Modulation eines RXR-Subtyps, kann deswegen eine nützliche Strategie in der pharmazeutischen Adressierung der RXRs darstellen.

1.2.3 Liganden der Retinoid X Rezeptoren

Die Frage nach einem oder mehreren endogenen Liganden der RXRs wird kontrovers diskutiert und ist bis heute nicht abschließend geklärt. Schon sehr früh wurden Metabolite von Vitamin A als Liganden vermutet und darauf aufbauend wurde die 9-*cis* Retinsäure (**2**, 9-*cRA*, Abbildung 6) als hochaffiner Ligand identifiziert^{87,88}. Die 9-*cRA* ist hochpotent, die EC₅₀-Werte in der Literatur schwanken je nach Testsystem (unterschiedliche Zellen, verschiedene (Hybrid-) Rezeptoren) und Versuchsbedingungen zwischen 1,7 – 200 nM^{58,88–92} für alle RXR Subtypen und auch im zellfreien System wurden K_d-Werte im niedrigen zweistellig nanomolaren Bereich ermittelt^{87,88,93}. Dennoch herrscht immer noch Uneinigkeit über die physiologische Relevanz und ob dieser Metabolit überhaupt im Säugetier vorkommt, oder ob er eventuell intrazellulär gebildet und dann sofort gebunden wird^{94–96}. In der therapeutischen Anwendung wird die 9-*cRA* bereits eingesetzt: Als Alitretinoin wird es zur Behandlung des chronischen (kortison-resistenten) Handekzems und bei Hautläsionen im Zusammenhang mit dem Kaposi-Sarkom appliziert^{97,98}, zusätzlich wird es außerhalb der eigentlichen Zulassung („*off-label*“) zur Behandlung der atopischen Dermatitis und der Psoriasis getestet⁹⁹.

Mittlerweile wurde ein weiterer Metabolit des Vitamin A, die 9-*cis*-13,14-dihydroretinsäure (**3**, Abbildung 6), als Aktivator der RXRs identifiziert und gleichzeitig in Mäusen nachgewiesen^{100,101}. Für diesen Metabolit konnten vergleichbare K_d-Werte wie für 9-*cRA* ermittelt werden, woraus sich ebenfalls eine sehr potente Bindung ableiten lässt¹⁰⁰. Durch die frühe Postulierung von 9-*cRA* als endogener Ligand wurde diese Substanz weitläufig als Referenz genutzt und intensiv für die Erforschung der RXRs genutzt. So gelang es schließlich auch eine Kristallstruktur mit der co-kristallisierten 9-*cRA* zu erhalten¹⁰², wodurch einige Erkenntnisse über den Bindungsmodus erhalten wurden (vgl. Abbildung 5). Die flexible Ligandbindestelle von RXR α ist im Falle der 9-*cRA* als Liganden etwa 500 Å groß und dieser Raum wird durch

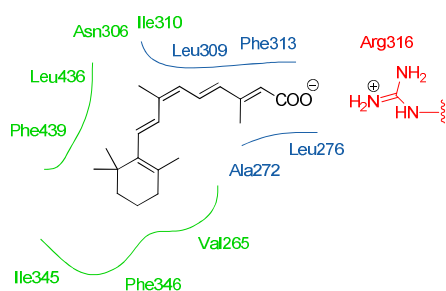


Abbildung 5 Zweidimensionale Darstellung des Bindungsmodus der 9-*cis* Retinsäure (**2**) im RXR α . Die Carbonsäure bildet starke ionische Wechselwirkungen mit Arg316 aus (rot). Nach dieser Interaktion tief in der LBD richtet sich der Ligand aus. Ein enger, lipophiler Tunnel (blau) zwingt den Liganden in eine geknickte „L“-Form. Der restliche Raum der Bindestelle wird von größtenteils lipophilen Interaktionen definiert (grün)

die 9-*cRA* nur zu etwa 300 Å ausgefüllt^{59,102,103}. Mit dieser etwa 60 prozentigen Nutzung der Bindetasche scheint es möglich, selektivere Liganden zu identifizieren, die den vorhandenen Platz noch besser ausfüllen können. Außerdem lässt sich das selektive Ansprechen der RXRs auf die 9-*cRA* im Gegensatz zur all-*trans* Retinsäure erklären^{87,88}. Die Bindetasche wird zu einem Ende hin von einer starken ionischen Interaktion der Carbonsäure mit dem Arg316 definiert und für diese Interaktion richtet sich der Ligand aus. Zusätzlich bildet die ionische Kopfgruppe noch Wasserstoffbrückenbindungen zu mehreren Amidbindungen der Proteinkette aus. Diese starken Interaktionen liegen allerdings hinter einem engen, hydrophoben Tunnel und insbesondere das Phe313 steht im engen Kontakt

mit der ionischen Kopfgruppe. Durch die Geometrie der Aminosäuren in der Ligandbindestelle wird der Ligand in eine gebeugte Konformation („L“-Form) gezwungen, die durch die 9-*cis*-Geometrie deutlich besser erfüllt werden kann, als beim vergleichbaren all-*trans*-Derivat^{102,103}. Durch die Möglichkeiten der Kristallisation wurde mit der Ölsäure (**4**, Abbildung 6) ein weiterer, potentiell endogener Ligand entdeckt¹⁰⁴. Beim Versuch einen RAR/RXR-Heterodimer-Kristall zu vermessen, fiel auf, dass in der RXR-LBD ein Molekül in „U“-Form gebunden ist. Letztendlich konnte die Ölsäure als Ligand identifiziert werden. Diese Fettsäure entstammt vermutlich dem E.-Coli-Stamm, aus dem das Protein für die Kristallisation gewonnen wurde¹⁰⁴. In diesem Fall wurde allerdings nicht die humane Variante des Rezeptors kristallisiert, sondern eine Punktmutationsvariante des murinen Rezeptors, der eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweist. Die Interaktion der Ölsäuren-Carbonsäure erscheint vergleichbar mit der Säurefunktion der 9-*cRA*, der lipophile Schwanz deckt hier jedoch andere Bereiche in der Ligandbindestelle ab. Die Ölsäure knickt nach dem lipophilen Tunnel früher ab und tritt großflächig – in Form eines „U“ – mit den lipophilen Bereichen der Ligandbindestelle in Kontakt. In einer anderen Studie wurde versucht, ein EC₅₀-Wert zu bestimmen, es konnte allerdings nur eine minimale Aktivierung bei über 300 µM gemessen werden¹⁰⁵. Die physiologische Relevanz ist somit nicht eindeutig bewiesen, es könnte allerdings auch sein, dass **4** in dieser *in vitro* Untersuchung anderen zellulären (Stoffwechsel-)Prozessen zugeführt wurde, was die Konzentration, die für eine Interaktion mit RXR zur Verfügung stand, deutlich senken würde.

Mata de Urquiza und Kollegen wählten für die Identifikation endogener Liganden einen anderen Ansatz: Sie versetzen RXR-Testsysteme mit Homogenaten verschiedener Hirnregionen von sowohl embryonalen als auch adulten Hirngewebe¹⁰⁵. Durch Aufreinigungs- und Extraktionsschritte konnte gezeigt werden, dass im adulten Mäusehirn eine RXR-aktivierende, lipophile und anionische Substanz vorhanden sein muss, die nicht in der Lage ist, RAR zu aktivieren. Die Autoren isolierten daraufhin Docosahexaensäure (**5**, *docosahexanoic acid*, DHA, Abbildung 6) als Liganden der RXRs. Die direkte Bindung an der LBD konnte über Mutationsstudien und die Aktivität über Hybrid-Reporterassays bestimmt werden¹⁰⁵. Mit einem EC₅₀-Wert zwischen 50 und 100 µM ist die Potenz von DHA (**5**) zwar annähernd tausendfach schwächer als bei der 9-*cRA*^{58,90}, jedoch ist es hier bereits gelungen, größere Vorkommen im murinen und menschlichem Hirn nachzuweisen¹⁰⁶. Weiterhin wurde gezeigt, dass Astrozyten in der Lage sind, **5** freizusetzen, womit – zumindest im Hirn – die Möglichkeit einer parakrinen Übertragung gegeben wäre^{107,108}. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von **5** im Komplex mit der RXRα LBD wurde gezeigt, dass nahezu jedes Atom von **5** zur Bindung beiträgt⁵⁹. DHA ist zudem größer und füllt bereits etwa 80% der Ligandbindestelle aus. Die niedrigere Potenz im Vergleich zur 9-*cRA* resultiert vermutlich aus einer ungünstigeren Desolvatation der Bindestelle⁵⁹. Auch für **5** ist die physiologische Relevanz noch nicht zweifelsfrei geklärt – die geringe Affinität zu RXR würde auf den ersten Blick dagegensprechen – durch die hohe Konzentration und die Möglichkeit DHA sowohl parakrin als auch aus den Membranen der Zellen freizusetzen, erscheint eine relevante Rolle aber durchaus im Bereich des Möglichen.

Als weitere RXR-aktivierende Fettsäure wurde die Phytansäure (**6**, Abbildung 6) identifiziert. Phytansäure ist ein Metabolit des Phytols, welches wiederum als Abbauprodukt des Chlorophylls vorkommt^{58,109,110}. Mit einem EC₅₀-Wert von etwa 5 µM¹¹⁰ liegt die Potenz im Bereich dessen, was natürlicherweise im humanen Blut zirkuliert^{111,112}. Phytol wird ausschließlich über die Nahrung durch tierische und pflanzliche Produkte aufgenommen. Bedenkt man die

synergistische Aktivierung von RXR-Heterodimeren, bei denen die Dimerpartner ebenso durch Fettsäuren aus der Nahrung aktiviert werden, ergibt sich ein potentieller physiologischer Zusammenhang in der Reaktion des Körpers auf Nahrungszufuhr und die Anpassung der Proteinausstattung auch durch schwächere Molekülimpulse. Die Phytansäure kann eine ähnliche Konformation einnehmen wie die 9-cRA¹⁰⁹ (vgl. Abbildung 6), aufgrund der vollständigen Sättigung der Phytansäure ist hier eine größere Drehbarkeit möglich, was eventuell auch die niedrigere Potenz erklären könnte.

Eine neue Entwicklung gab es in Bezug auf Subtypen-selektive RXR-Modulatoren. Mit der Valerensäure (7, Abbildung 6) wurde eine erste natürliche Struktur identifiziert, die ein Subtypen-selektives Aktivitätsprofil aufweist¹¹³. Es lässt sich zwar ein EC₅₀-Wert auf allen drei RXR-Subtypen für die Valerensäure bestimmen, nur auf RXR β kommt es jedoch zu einer deutlichen Aktivierung (etwa siebzigfach im Vergleich zur basalen Grundaktivität des Rezeptors)¹¹³. Die Valerensäure hat bewiesen, dass ein Subtypen-selektiver Agonismus auch im Bereich der Retinoid X Rezeptoren möglich ist und sich eine genauere Erforschung dieser Optionen auszahlen kann.

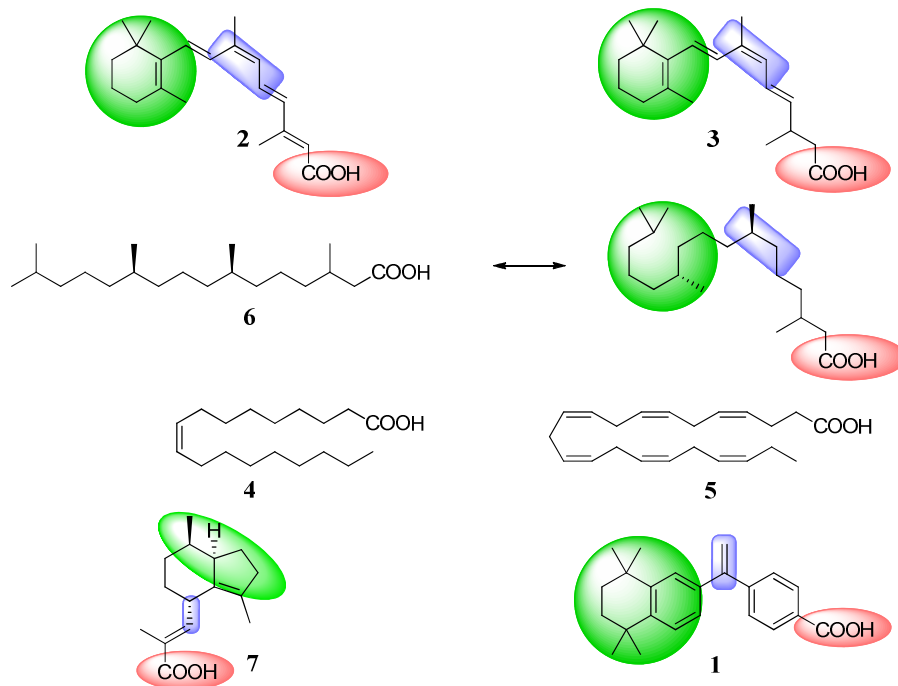


Abbildung 6 Strukturen wichtiger RXR Liganden. 9-cis Retinsäure (2) und das 13,14-Dihydroderivat (3) zeigen die klassischen Strukturmerkmale von RXR-Liganden: In Rot die anionische Kopfgruppe, in Blau die Linkerfunktion und in Grün der große lipophile Bereich. Die Phytansäure (6) ist in der Lage, eine ähnliche räumliche Anordnung wie die 9-cRA einzunehmen. Die beiden ungesättigten Fettsäuren Ölsäure (4) und DHA (5) wurden durch Kristallstrukturen in der LBD des RXR α nachgewiesen. Ihr Bindungsmodus scheint sich von der klassischen L-Struktur der anderen Liganden zu unterscheiden. Die Valerensäure (7) wurde als erste subtypenselektive Substanz mit deutlicher Präferenz für RXR β identifiziert. Bexaroten (1) ist der einzige zugelassene synthetische RXR Agonist.

Die Subtypenselektivität der Valerensäure ist bemerkenswert, da die an der Ausbildung der Ligandbindestelle beteiligten Aminosäuren bei allen RXR-Subtypen komplett identisch sind⁵⁶. Selektivität über einzelne Subtypen kann nur über größere Veränderungen in den weiter entfernten Schichten erreicht werden oder über die minimale Veränderungen in der räumlichen Ausrichtung einzelner Aminosäuren, wie sie in einigen Kristallstrukturen schon gezeigt werden

konnte⁵⁶. Für eine zielgerichtete Entwicklung subtypenselektiver Modulatoren wäre es von großem Vorteil, alle RXR-Subtypen mit dem gleichen Liganden zu kristallisieren.

Die Suche nach medizinisch nutzbaren, synthetischen RXR Modulatoren erwies sich als komplexe Herausforderung. Viele synthetischen Agonisten entstammen vier Hauptgruppen von Chemotypen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen:

Strukturell sehr nah an der 9cRA (**2**) sind die Vertreter aus der Klasse der Polyvinylcarbon-säuren, wie das 9cUAB30 (**8**, Abbildung 8). Während die mehrfachen, konjugierten Doppelbindungen beibehalten wurden, wurden größere Veränderungen, insbesondere lipophile Ring-systeme¹¹⁴⁻¹¹⁶ oder Fluoratome¹¹⁷ an verschiedensten Positionen eingebaut, um Potenz und Selektivität zu steigern⁵⁷. Die Vergrößerung des lipophilen Bereiches am Ringsystem erscheint folgerichtig, wenn man die geringe Ausnutzung der Bindestelle durch die 9cRA bedenkt (s. oben). Diese Derivate besitzen grundsätzlich alle noch die gleichen negativen Eigenschaften, die schon die 9cRA betreffen: die konjugierten Doppelbindungen sind empfindlich gegenüber Oxidationsprozessen und die Moleküle besitzen als hydrophile Komponente fast ausschließlich die terminale Carbonsäure. Da die Orientierung der Moleküle mit dem Knick an der richtigen Position für die Bindung essentiell ist, wurde versucht, dieses Strukturmerkmal über medizinisch-chemische Variationen zu fixieren und robuster zu machen¹¹⁸.

Die zweite Gruppe lässt sich allgemein als Ethylenderivate mit geminalen Phenylresten und Carboxylfunktion klassifizieren. Im Folgenden der Einfachheit halber aber nach dem relevantesten Vertreter einfach „Bexaroten-Typ“ genannt.

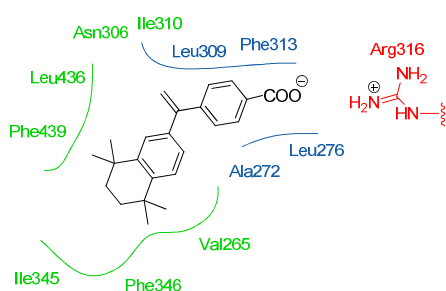


Abbildung 7 Zweidimensionale Darstellung der Interaktion von Bexaroten mit der Ligandbindestelle von RXR α . Der synthetische Agonist bildet ähnliche Interaktionen wie die 9-cis-Retinsäure und nimmt auch eine vergleichbare Orientierung ein. Die Doppelbindung leitet nicht nur den Knick für die nötige L-Form ein, sie richtet sich auch auf eine kleine Untertasche aus.

Von den synthetischen Agonisten hat es bis heute nur das Bexaroten¹¹⁹ (**1**, Abbildung 6) geschafft eine Zulassung zu erhalten und in der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms^{120,121} als Zweitlinientherapie in die Anwendung zu gelangen⁵⁸. **1** ist ein hochpotenter RXR-Agonist, die EC₅₀-Werte liegen bei RXR α bei 33 \pm 2 nM, für RXR β bei 24 \pm 4 nM und für RXR γ bei 25 \pm 2 nM und auch die K_d-Werte korrelieren sehr genau mit diesen *in vitro* Ergebnissen¹¹⁹. Damit ist Bexaroten nicht nur ähnlich potent wie 9cRA, es besitzt auch eine sehr ausgewogene Aktivität auf allen drei Subtypen und es ist zusätzlich noch selektiv gegenüber den RARs¹¹⁹. Der strukturelle Aufbau weist noch große Ähnlichkeiten zu den Retinoiden auf, unter anderem besitzt **1** den klas-

sischen Aufbau eines Fettsäuremimetikums – saure Kopfgruppe und großer lipophiler Bereich. Dementsprechend ist auch der Bindemodus an RXR α dem der 9cRA sehr ähnlich (vgl. Abbildung 7).

Obwohl Bexaroten als Targretin® seine Zulassung für das kutane T-Zell-Lymphom hat, wird es auch intensiv als Therapieoptionen in Kombination mit anderen Chemotherapeutika erprobt¹²²⁻¹²⁴. Dabei wird immer wieder beobachtet, dass durch zusätzliche Gabe von Bexaroten die pro-apoptotische Wirkung der anderen Chemotherapeutika verstärkt wird und zum Teil

sogar Resistenzen gebrochen werden können^{125,126}. Die therapeutischen Optionen, die sich dadurch im Bereich der Krebstherapie ergeben, sind vielfältig, zumal man in dieser Indikation auch die beobachteten Nebenwirkungen (z.B. zentrale Hypothyreose⁸⁵ und erhöhte Triglyzeridspiegel^{127,128}) in Kauf nehmen und durch Komedikation kontrollieren kann¹²⁹.

Bexaroten besitzt strukturell bedingt keine günstigen physikochemischen Eigenschaften. Der große lipophile Bereich bedingt eine schlechte Wasserlöslichkeit und eine hohe Lipophilie¹³⁰. Basierend auf der Bexaroten-Struktur sind eine ganze Reihe von Derivaten entstanden, die zum einen Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehung (*structure-activity relationship*, SAR) der Liganden an RXR ermöglichen und zum anderen durch die Einführung hydrophilerer Komponenten versucht haben, die ungünstigen Eigenschaften der Bexaroten-Struktur zu optimieren^{58,131,132}. So hat sich u.a. gezeigt, dass die Doppelbindung an der Verbrückung der beiden Phenylringe einen bedeutenden Einfluss auf die Potenz besitzt⁵⁷ und Versuche, die Lipophile durch eine Carbonylfunktion an dieser Position zu reduzieren, waren nicht von Erfolg gekrönt^{131,133}. Es ist allerdings möglich, die Doppelbindung durch andere lipophile Strukturmerkmale zu ersetzen^{131,134}. Ein sehr potentes Derivat wurde durch die Kombination einer Cyclopropylfunktion, als Doppelbindungsersatz, zusammen mit einer Nicotinsäurenkopfgruppe erhalten¹³¹ (**9**, Abbildung 8).

Eine weitere Entdeckung der Bexaroten SAR-Studien ist, dass die Carbonsäure nicht per se für die Bindung benötigt wird^{133,135,136}. Der bioisostere Ersatz durch z.B. eine Hydroxamsäure wird nicht nur von den RXRs toleriert, er ermöglicht auch die (zusätzliche) Adressierung völlig anderer Enzyme wie Histon-Deacetylasen¹³⁵.

Ein dritter Typus von RXR-Liganden sind die Derivate der Zimtsäure. Die weiterhin vorhandenen Schwächen, wie die reaktive Doppelbindung und die hohe Lipophilie, lassen diesen Chemotypen nicht als vielversprechende Alternative erscheinen. Allerdings ist es gelungen, mit Derivaten von **10** (Abbildung 8) eine Heterodimerpräferenz in beide Richtungen im Vergleich des LXR/RXR- und des PPAR γ /RXR-Heterodimers zu beobachten^{57,137,138}. Leider gehen die Autoren bei der Untersuchung dieser Präferenz nicht systematisch vor und liefern nur rudimentäre Erkenntnisse darüber, dass eine Heterodimerpräferenz möglich ist. Diese Entdeckungen zeigen, dass trotz augenscheinlich keiner Verbesserungen in den physikochemischen Eigenschaften ein neuer Chemotyp vielversprechende Ergebnisse in anderen Bereichen der RXR-Liganden liefern und unser Verständnis vom Zusammenspiel und der Rolle dieser Rezeptoren vertiefen kann.

Als weiterer Strukturtyp wurden Diarylamine als RXR-Liganden eingeführt (**11**, Abbildung 8). Diese Derivate begannen zunächst als strukturelle Abkömmlinge des Bexarotens, wobei anstelle der Doppelbindung ein Amin eingeführt wurde^{57,136}. Es hat sich gezeigt, dass diese neue funktionelle Gruppe eine zusätzliche Modulation ermöglicht: Über Substituenten verschiedenster Größe lässt sich in diesen Chemotyp von dualen RAR/RXR-Agonisten zu selektiven RXR-Agonisten bis hin zu RXR- oder RAR-Antagonisten eine große funktionelle Vielfalt implementieren^{139,140}. Die physikochemischen Probleme der Substanzklasse bleiben allerdings weiterhin vorhanden.

Das pharmazeutische Potential der RXRs ist, bedingt durch ihre breite Beteiligung an physiologischen Prozessen, immens und umfasst nicht nur die bereits verwirklichten Indikationen im Bereich der Krebstherapie^{120,121}. Ein Einfluss auf pathophysiologische Prozesse wurde unter anderem auch bei Herzerkrankungen und Diabetes postuliert und *in vitro* und *in vivo*

untersucht¹⁴¹⁻¹⁴⁴. Am intensivsten ist in den letzten Jahren allerdings die Erforschung der Rolle der RXRs in neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt (s. Kapitel 1.4). Doch bei all den Potentialen müssen auch die möglichen Nebenwirkungen berücksichtigt werden: So wurde im Zusammenhang mit RXR-Agonisten immer wieder eine Hepatomegalie beobachtet^{57,145-147}, deren genaue Ursache noch nicht geklärt werden konnte. Die beobachtete Hyperlipidämie^{127,128} scheint deutlich mit einer Aktivierung des LXR/RXR-Heterodimers assoziiert zu sein und könnte somit eventuell durch neuere Liganden, die dieses Heterodimer aussparen, umgangen werden. Für die beobachtete Nebenwirkung einer Hypothyreose⁸⁵ scheint zumindest eine Komedikation infrage zu kommen.

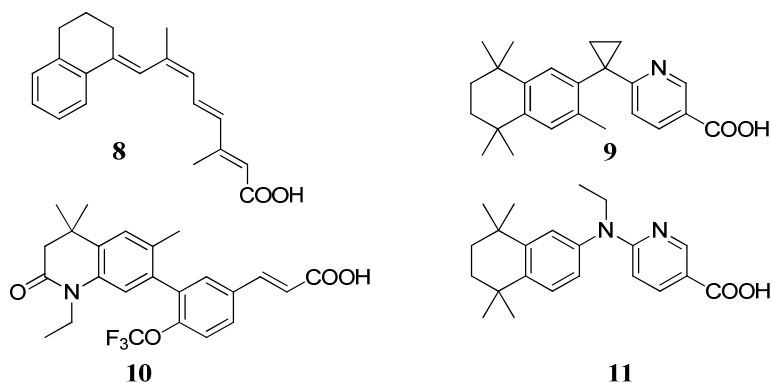


Abbildung 8 Synthetische RXR-Agonisten der verschiedenen Klassen. 9cUAB30 (8) ist ein Vertreter der Polyvinylcarbonsäuren. Am Bexaroten-Typus wie 9 wurden die umfassendsten SAR-Studien vorgenommen. Die Entwicklung von Zimtsäurederivaten wie 10 hat gezeigt, dass sich Heterodimerpräferenz in RXR-Liganden implementieren lässt. Vertreter der Diarylamine wie 11 erschließen eine weitere Variationsposition und definierte Aktivitätsunterschiede zwischen RXR und RAR.

Die Suche nach therapeutisch nutzbaren RXR-Modulatoren ist bis heute ein aktives Forschungsfeld, auch wenn die Einschränkungen im Bereich der physikochemischen Eigenschaften und der Selektivität noch ungelöst sind. Auch wenn die Entwicklung subtypenselektiver Liganden durch den identischen Aufbau der Ligandbindestelle⁵⁶ erschwert wird, so scheint es möglich zu sein, die Unterschiede in den Aminosäuren der weiter entfernten Schichten zu adressieren⁵⁷. Die Valerensäure hat gezeigt, dass die Subtypenselektivität auf der Aktivierungsebene realisierbar ist¹¹³. Selektive Modulatoren könnten die verschiedenen Expressionsmuster der Subtypen dazu nutzen, zielgerichteter zu therapieren und die Verträglichkeit zu steigern und damit die bisher ungenutzten Potentiale der RXRs erreichbar zu machen. Eine weitere Möglichkeit, sowohl das Sicherheits- als auch das Wirkprofil von RXR-Modulatoren zu optimieren, liegt in der Entwicklung Heterodimer-selektiver Liganden. Sollte es gelingen, einzelne Heterodimere zu aktivieren oder auszuspüren, wäre dies ein bedeutender Fortschritt. Hierfür sind komplexere Testsysteme und ausgedehnte Struktur-Wirkungs-Untersuchungen notwendig. Die Entwicklung neuer Liganden mit verbessertem Selektivitätsprofil wäre auch für die genaue Aufklärung der physiologischen Bedeutung der unterschiedlichen Subtypen von Interesse und könnte der Wirkstoffforschung an RXR-Liganden zusätzlichen Vorschub geben.

1.3 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren

Innerhalb der Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehören die Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren α ¹⁴⁸, β/δ ¹⁴⁹ und γ ¹⁴⁹ (PPARs) zu den am meisten beforschten und auch – in Bezug auf PPAR α und γ – in der therapeutischen Anwendung am weitesten fortgeschrittenen Vertreter. Die Doppelbezeichnung des PPAR β/δ Subtypen folgt aus Unterschieden zwischen

amphibischen und Säugetier-Rezeptoren, die ursprünglich für unterschiedliche Rezeptoren gehalten wurden. Später wurde gezeigt, dass es in Säugetieren nur drei Subtypen gibt und PPAR δ dem PPAR β Rezeptor entspricht¹⁵⁰. Nachfolgend wird nur noch die neuere Bezeichnung PPAR δ verwendet.

Jeder PPAR Subtyp wird über ein eigenes, unabhängiges Gen auf drei unterschiedlichen Chromosomen kodiert^{150,151}. Die PPARs bilden permissive Heterodimere mit einem Subtyp der RXRs, ihre Effekte lassen sich deshalb sowohl durch die Bindung eines Agonisten für PPAR als auch für RXR auslösen und die gleichzeitige Bindung beider Agonisten führt zu einer synergistischen Verstärkung der Induktion². Das Heterodimer bindet an PPAR-Response Elemente (PPRE) die zumeist in Form einer direkten Wiederholung (*direct repeat*, DR) vorkommen, mit einer DNS-Base als Platzhalter (DR1-Response Element)¹⁵⁰. Die allgemeine Struktur der PPARs entspricht dem kanonischen Aufbau nukleärer Rezeptoren wie er in Kapitel 1.1 beschrieben ist, mit den zentralen Komponenten einer AF-1, DBD und einer LBD. Die in der LBD enthaltene Ligandbindestelle unterscheidet sich bei diesen drei Subtypen jedoch stärker als bei den RXRs in den beteiligten Aminosäuren und ihrer Form^{150,152}. Grundlegend lässt sich über die Ligandbindestelle der PPARs festhalten, dass sie aus primär lipophilen Aminosäuren gebildet werden, während der wichtigste hydrophile Kontakt der bekannten Liganden über eine basische Aminosäure vermittelt wird. Sie sind somit prädestiniert für die Bindung von Fettsäuren und Fettsäuremimetika.

Die PPARs spielen eine zentrale Rolle, wenn es um den Stoffwechsel im Körper geht^{150,151}, doch neuere und weitergehende Forschungen zeigen auch vielfältiges Potential in Bezug auf ihre Funktion im Immunsystem und im ZNS.

1.3.1 Expressionsmuster und physiologische Funktion der PPARs

Die Verteilung der PPAR-Subtypen im Körper ist von deutlichen Unterschieden geprägt, die sich teilweise aus den physiologischen Funktionen ergeben oder zumindest Rückschlüsse darauf zulassen.

1.3.1.1 PPAR α

PPAR α ist besonders stark in solchen Geweben exprimiert, in denen im hohen Maße Fettsäuren abgebaut werden^{150,153}, insbesondere im Herzen, den Nieren, dem braunen Fettgewebe und der Leber^{153,154}. Dementsprechend wurden die ersten und meisten Effekte im Zusammenhang mit dem Energiehaushalt des Körpers beobachtet^{150,155}. PPAR α -Agonisten beeinflussen die β -Oxidation in der Leber und führen dadurch zu einer Reduktion der Triglyzeridspiegel im Blut^{155–158}. Dieser Effekt ist ähnlich zu den Vorgängen, die der Körper in einer Hungersituation initiiert¹⁵⁵. Durch die erhöhte Zufuhr von Fettsäuren zur Leber und die gesteigerte β -Oxidation, die die Gluconeogenese fördert und damit zur Energiegewinnung führt, versucht der Körper dem Abbau von Proteinen entgegenzuwirken^{150,155,158}. Außerdem kommt es durch PPAR α -Aktivierung zu einer Reduktion des instabilen Lipoproteins niedriger Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) und einer gleichzeitigen Erhöhung des Lipoproteins hoher Dichte (*high density lipoprotein*, HDL)¹⁵⁹. Eine weitere Rolle spielt PPAR α im Bereich der vaskulären Homöostase¹⁶⁰. Durch die Senkung der Triglyzeridspiegel und die Umwandlung von LDL zu stabilem HDL wird die Bildung von sklerotischen Plaques reduziert^{159,161,162}. Doch PPAR α wird ebenso in den Epithelzellen exprimiert und besitzt somit auch Effekte, die direkt vor Ort entstehen¹⁶⁰. So gibt es nicht nur Hinweise auf vasodilatatorische Eigenschaften¹⁶³, es wird auch von einem

reduzierenden Einfluss auf Entzündungsmediatoren wie NF- κ B oder Interleukin (IL)-6 berichtet^{164–166}. Mit diesen Entdeckungen konnte gezeigt werden, dass PPAR α auch direkte Effekte bei Entzündungsprozessen entwickeln kann und damit eine noch komplexere Rolle in der Physiologie einnimmt, als allein die Beteiligung am Energiestoffwechsel vermuten lässt (Abbildung 9).

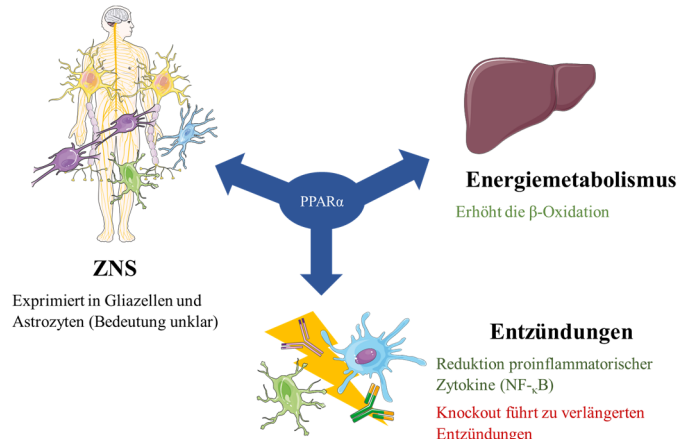


Abbildung 9 Auswirkungen und Funktionen von PPAR α auf den Energiehaushalt, das ZNS und das Immunsystem

PPAR α wurde auch im ZNS⁷⁶ nachgewiesen. Neben einer starken Expression im Thalamus⁷⁶ ist insbesondere die deutliche Anreicherung in Gliazellen^{167,168} und dort in den Astrozyten¹⁶⁹ zu erwähnen. Die Rolle von PPAR α in diesen Geweben ist noch nicht eindeutig geklärt, doch sind diese Zellen von zentraler Bedeutung für die Funktionsfähigkeit der Nervenzellen. Die Möglichkeit hier eventuell sowohl einen positiven Einfluss auf den Energiehaushalt, als auch auf Entzündungsvorgänge im ZNS^{170,171} ausüben zu können, lässt diesen Rezeptor in einem neuen, therapeutisch interessanten Licht erscheinen¹⁷¹.

1.3.1.2 PPAR γ

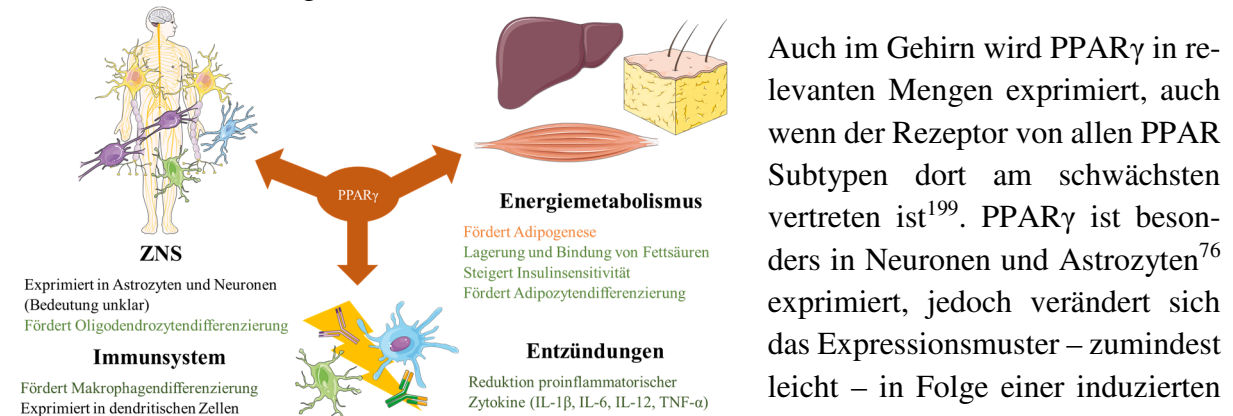
Der PPAR γ Subtyp kommt in zwei verschiedenen Spleißvarianten vor, wobei PPAR γ 1 deutlich dominiert. PPAR γ zeigt die stärkste Expression im braunen und weißen Fettgewebe, hohe Konzentrationen wurden allerdings auch im Dickdarm gemessen^{150,172}. Bemerkenswert ist das nur minimale Vorkommen von PPAR γ im Skelettmuskel¹⁷³, während die Leber, die Nieren und auch der Dünndarm noch eine deutliche Expression zeigen¹⁷². Im Fettgewebe spielt er eine essentielle Rolle in der Adipozytendifferenzierung^{160,174} und -erhaltung, indem Gene für Fettspeicherung und Energieverbrauch reguliert werden^{150,174–176}. Große Bedeutung kommt PPAR γ auch im Glukosemetabolismus zu. Bereits vor Entdeckung der PPARs waren anti-diabetische Medikamente in der Therapie, die sich später als Agonisten für PPAR γ herausstellten^{177,178}. Dies ist bedeutsam, da über PPAR γ eine direkte Verbindung zwischen dem Fett- und Zuckerstoffwechsel besteht^{150,179}. Durch PPAR γ -Aktivierung entsteht über Verschiebungen in den zirkulierenden Fettsäuren^{179,180} (z.B. verstärkte Einlagerung in die Adipozyten) und die erhöhte Expression von Genen wie dem Adiponectin eine erhöhte Insulinsensitivität der Zellen¹⁸¹. Außerdem wird die Expression des Glukosetransporters GLUT4 erhöht, wodurch die Zielgewebe mehr Glukose aufnehmen können^{182,183}.

Die Expression von PPAR γ in murinen Adipozyten wird durch proinflammatorische Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor α (TNF α), IL-6, IL-1 α und IL-1 β gehemmt. Nachdem im Tierversuch *in vivo* gezeigt wurde, dass TNF α Exposition eine Insulinresistenz fördert¹⁸⁴, konnte *in vitro* an Rattenadipozyten belegt werden, dass die Behandlung mit PPAR γ -Agonisten die TNF α -vermittelte Insulinresistenz reduziert¹⁸⁵.

Neben diesen Effekten auf den Metabolismus wurden Beobachtungen über die Beteiligung des PPAR γ auch im Immunsystem und bei Entzündungen gemacht¹⁶⁶. So konnte gezeigt werden,

dass der Rezeptor unter anderem in dendritischen Zellen exprimiert wird, wo er einen Einfluss auf die Sekretion von IL-12 besitzt¹⁸⁶. Eine besondere Bedeutung kommt PPAR γ jedoch durch seine Rolle in Makrophagen zu. Hier wird ein Einfluss auf die Differenzierung der Monozyten zu funktionsfähigen Makrophagen postuliert¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass humane zirkulierende Monozyten kaum PPAR γ exprimieren, nach Aktivierung der Monozyten und Differenzierung zu Makrophagen kommt es jedoch zu einer deutlichen Expression^{189,190}. In murinen ruhenden Makrophagen wurde ebenfalls nur eine niedrige Konzentration von PPAR γ nachgewiesen, während die murinen Makrophagen, die aus einer Entzündungssituation entnommen wurden, eine deutlich höhere Expression von PPAR γ zeigten¹⁹¹. Sowohl bei humanen Monozyten als auch bei murinen Makrophagen führte das anti-entzündliche IL-4 zu einer deutlichen Induktion von PPAR γ ^{191,192}. IL-4 reguliert zudem auch noch eine Reihe von Enzymen, die potentielle endogene Liganden von PPAR γ produzieren, in Monozyten induziert es z.B. die 15-Lipoxygenase (LO)¹⁹¹⁻¹⁹³. Vermittelt über IL-4 und die Aktivierung von PPAR γ differenzieren Monozyten verstärkt zum eher antiinflammatorisch wirksamen M2-Makrophagen Typus, der sogenannten alternativen Aktivierung¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Eine weitere direkte Folge der Induktion von PPAR γ ist eine Erhöhung von CD36 auf der Oberfläche der Makrophagen. Dieser Rezeptor erkennt oxidiertes LDL und fördert dessen Aufnahme und Entsorgung¹⁹¹. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass CD36 auch in die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen involviert ist¹⁹⁷. Außerdem hemmt die Aktivierung von PPAR γ in Makrophagen *in vitro* die Produktion proinflammatorischer Enzyme wie TNF α , IL-6 und IL-1 β ¹⁹⁸.

Zusammengenommen erscheint eine Beteiligung von PPAR γ an antiinflammatorischen Effekten, insbesondere über den Einfluss auf Makrophagen, möglich. Durch eine gezielte Differenzierung von Makrophagen sowie die Reduktion proinflammatorischer Zytokine besitzen PPAR γ -Modulatoren eine Funktion, deren therapeutischer Nutzen noch unzureichend erforscht ist (Abbildung 10).



Auch im Gehirn wird PPAR γ in relevanten Mengen exprimiert, auch wenn der Rezeptor von allen PPAR Subtypen dort am schwächsten vertreten ist¹⁹⁹. PPAR γ ist besonders in Neuronen und Astrozyten⁷⁶ exprimiert, jedoch verändert sich das Expressionsmuster – zumindest leicht – in Folge einer induzierten Entzündung mit Lipopolysaccharid (LPS), wodurch zusätzlich eine Expression in der Mikroglia detektiert werden kann^{199,200}.

Abbildung 10 Auswirkungen und Funktionen von PPAR γ auf den Energiestoffwechsel, das ZNS und das Immunsystem

In einem *in vitro* Experiment mit einer murinen B12 Oligodendrozyten-artigen Zelllinie und unreifen Oligodendrozyten (OLs), die aus dem Rückenmark von Ratten gewonnen wurden, konnte gezeigt werden, dass durch PPAR γ Aktivierung die Oligodendrozytendifferenzierung gefördert wird²⁰¹. So wurde bei diesen unreifen OLs das Wachstum und die Proliferation inhibiert, während die Ausdifferenzierung zu funktionsfähigen OLs zunahm. Dies geschah u.a., indem die Expression von Enzymen (z. B. der Alkyldihydroxyacetonphosphat-Synthase), die für die Myelinproduktion bedeutsam sind,

deutlich induziert wurde²⁰¹. In einer zweiten Studie konnten diese Ergebnisse mit murinen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte progenitor cells*, OPCs) bestätigt werden²⁰². Auch hier zeigte sich eine geförderte Ausdifferenzierung hin zu funktionsfähigen OLS, die u.a. verstärkt Myelin-basisches Protein (MBP) produzieren, ein Hauptbestandteil von funktionsfähigen Myelinscheiden²⁰².

Auffällig ist, dass PPAR γ insbesondere in dopaminergen Zellen des ZNS exprimiert wird (z.B. im Hippocampus, im Hypothalamus und den Basalganglien)⁷⁶. Eine funktionelle Erklärung für diese Häufung konnte bisher noch nicht geliefert werden.

1.3.1.3 PPAR δ

Im Gegensatz zu den anderen Subtypen wird PPAR δ nahezu ubiquitär exprimiert, es gibt allerdings Unterschiede in der Expressionsstärke je nach Zustand der Zelle und des Organismus^{150,203,204}. Die genaue Funktion von PPAR δ ist bis heute nicht völlig verstanden, es gibt jedoch zahlreiche Hinweise und Effekte, die ermittelt werden konnten.

So wurde ein Einfluss von PPAR δ auf die Adipozytendifferenzierung nachgewiesen. Fehlt PPAR δ , sind die Fetteinlagerungen geringer und der Transport von Fettsäuren ist beeinträchtigt²⁰⁵. Durch eine erhöhte PPAR δ Aktivierung nimmt – trotz normaler Nahrungszufuhr – die Fetteinlagerung allerdings auch ab²⁰⁶. Diese zunächst kontroverse Beobachtung wird über einen erhöhten systemischen Energieverbrauch und verstärkten Fettsäureabbau erklärt, so wird unter anderem die β -Oxidation induziert und die Thermogenese befördert²⁰⁶. PPAR δ spielt offenbar eine zentrale Rolle im Energiehaushalt und dort insbesondere in der Verwertung von Fettsäuren²⁰⁶. Auffällig ist zudem, dass sich viele dieser energierelevanten Effekte von PPAR δ in der Peripherie mit Effekten von PPAR α in der Leber decken²⁰⁶. Neben seinem Einfluss auf die Energiegewinnung aus Fettsäuren besitzt PPAR δ auch einen fördernden Einfluss auf die Insulinfreisetzung in den β -Zellen des Pankreas, ein weiterer Hinweis auf seine komplexe physiologische Rolle im Energiehaushalt des Körpers^{203,207} (Abbildung 11).

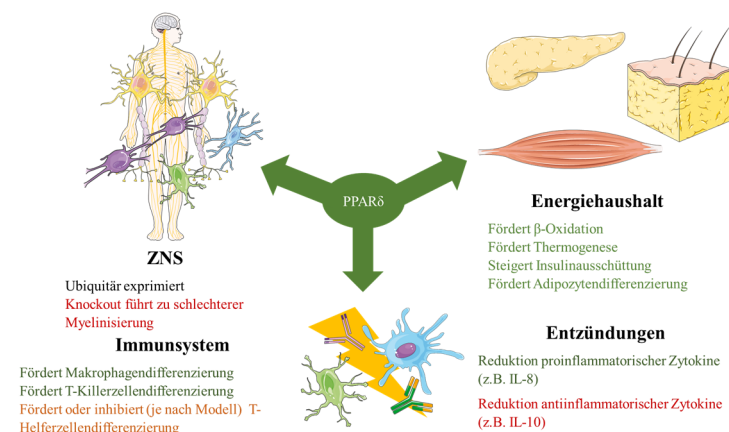


Abbildung 11 Auswirkungen und Funktionen von PPAR δ auf den Energiehaushalt, das ZNS und das Immunsystem

Hauterkrankung²⁰⁸. Dieses Krankheitsbild ging mit Entzündungen, Schuppenbildung und Hyperkeratose einher. Es wurde eine erhöhte Einwanderung und Differenzierung von CD4⁺-T-Helferzellen, insbesondere T_H17 Zellen, beobachtet²⁰⁸. Dieser Subtyp bildet verstärkt Vertreter der IL 17-Familie, die mit dem Psoriasis-Krankheitsbild eng verknüpft sind²⁰⁸. In einer Tierstudie basierend auf der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, konnte im Gegensatz dazu nach Behandlung mit den PPAR δ -

Die Rolle von PPAR δ in Entzündungsprozessen wird kontrovers diskutiert und lässt sich nicht einheitlich zuordnen, da die Beobachtungen stark vom untersuchten Krankheitsbild abhängen und teils widersprüchliche Ergebnisse lieferten^{203,208–210}. So entwickelten Mäuse, die entweder peroral oder topisch mit dem selektiven PPAR δ -Agonisten GW501516 behandelt wurden, eine Psoriasis-ähnliche

Agonisten GW501516 und L165041 eine verringerte Differenzierung zu T_H17 Zellen, und damit verbunden eine deutliche Reduktion von IL-17 beobachtet werden²⁰⁹. Die Behandlung mit den PPAR δ -Agonisten verminderte die Schwere der Symptome, hatte aber keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf. Wurden PPAR δ -knockout-Mäuse mit den Agonisten behandelt, konnte keinerlei Unterschied zwischen Verum- und Placebogruppe festgestellt werden²⁰⁹.

Diese widersprüchlichen Beobachtungen im Einsatz von PPAR δ -Agonisten lassen sich auch an anderen Stellen festhalten: Einerseits werden proinflammatorische Zytokine wie IL-8 und Interferon (IFN) γ durch PPAR δ -Aktivierung reprimiert, andererseits unterliegen auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-13 einer negativen Kontrolle²¹¹. Im Immunsystem besitzt PPAR δ zudem ausgeprägte Effekte insbesondere auf Makrophagen^{203,211,212} und führt dort zu einer erhöhten Aufnahme von Lipiden u.a. durch die Regulation des ApoE-Gens²¹². Zudem konnte gezeigt werden, dass zytotoxische T-Zellen durch PPAR δ -Agonisten aktiviert werden^{211,213} und auch die Entwicklung und Reaktivität von T-Helferzellen dem regulierenden Einfluss von PPAR δ unterliegen^{209,210,213}.

Zusammengenommen erscheint es schwierig, PPAR δ eine einheitliche Funktion im Immunsystems zuzuordnen. Momentan scheint es wahrscheinlicher, dass je nach Krankheitsbild, spezifischer Situation und Expressionsort unterschiedliche Effekte im Vordergrund stehen. Es bedarf hier weitergehender, mechanistischer Aufklärung, um die Rolle von PPAR δ im Immunsystem und bei autoimmunen Erkrankungen zu entschlüsseln (Abbildung 11).

Im Hirn ist PPAR δ in allen Bereichen – zumeist sogar stark – exprimiert⁷⁶, es ist der im Gehirn am häufigsten vorkommende PPAR-Subtyp¹⁹⁹. Bei PPAR δ -knockout Experimenten an Mäusen wurde eine schlechtere Myelinisierung verschiedener Hirnareale, insbesondere im Corpus Callosum, nachgewiesen²⁰⁵. Bei vorläufigen Untersuchungen der motorischen Fähigkeiten wie dem Rotarod Test, bei dem sich die Maus auf einem immer schneller rotierenden Zylinder halten muss, wurden – zumindest in frühen Entwicklungsstadien – keine klinischen Symptome beobachtet²⁰⁵.

1.3.2 Liganden der PPARs

Im Gegensatz zur ungewöhnlich hohen Homologie der LBDs der RXR-Subtypen, sind die Aminosäuren der LBDs der PPAR Subtypen „nur“ zu etwa 60-70% identisch²¹⁴. Ein kritischer Unterschied zwischen PPAR α und γ ist der Austausch von Tyr314 (in PPAR α) zum His323 (in PPAR γ), da diese Aminosäuren jeweils an der hydrophilen Interaktion der Kopfgruppe potentieller Liganden beteiligt sind und das Tyrosin ein größeres Volumen einnimmt. Diese Veränderung birgt eine Möglichkeit zur Diskriminierung zwischen den beiden Subtypen, die auch bei einigen Liganden genutzt wird²¹⁴. Generell ist das Volumen der Bindungsstellen mit jeweils etwa 1300Å³ ungewöhnlich groß und lässt Raum für verschiedenste Liganden, u.a. interagieren eine Vielzahl von Fettsäuren mit diesen Rezeptoren^{152,214}. Die Größe der Bindungsstelle hängt von dem gebundenen Liganden und der daraus resultierenden Konformationsänderung ab, allgemein lässt sich aber festhalten, dass das Volumen von PPAR γ über PPAR α hin zu PPAR δ abnimmt. Während sich PPAR α und γ in der Form (zumeist beschrieben als Y- oder T-Form) ihrer Bindungsstellen nur wenig unterscheiden, ist die ebenfalls dreiarmige PPAR δ Ligandbindestelle mit einer anders gearteten Topologie, insbesondere in Bezug auf den Kontakt des Liganden mit der AF-2, ausgestattet^{150,152,214–216}.

Als physiologische Liganden der PPARs werden, entsprechend ihrer Rolle im Fettsäuremetabolismus und ihrer lipophilen LBDs, verschiedenste Fettsäuren postuliert²¹⁷⁻²¹⁹. Diese Liganden fördern zumindest teilweise ihren eigenen Abbau bzw. Stoffwechsel (z.B. über die PPAR α -induzierte β -Oxidation oder über die durch PPAR γ vermittelte verstärkte Einlagerung im Fettgewebe), was folglich auch ihren Effekt auf natürliche Weise begrenzt. Dies ist ein wiederkehrendes Prinzip der Liganden nukleärer Rezeptoren, bei denen regelmäßig als Folge der Aktivierung die Konzentration endogener Liganden reduziert wird, als eine Art eingebauter Feedback-Mechanismus^{2,217}. Im folgenden Abschnitt sollen einige ausgewählte Beispiele (diskutierter) endogener und synthetischer Liganden der PPARs vorgestellt werden.

Zu den endogenen Liganden des PPAR α gehören ungesättigte Fettsäuren wie die Ölsäure²¹⁸ (**4**, vgl. Kapitel 1.2.3 Abbildung 6) und Leukotrien B₄ (**12**, Abbildung 12), ein Metabolit der Arachidonsäure, der einen K_D-Wert von 61 nM am murinen PPAR α besitzt und Einfluss auf die Länge und Schwere einer Entzündung ausübt^{218,220}. Als synthetische PPAR α -Agonisten ist die Stoffklasse der Fibrate in der therapeutischen Anwendung. Bezafibrat (**13**, Abbildung 12) ist ein klassisches Fettsäuremimetikum, das zur Behandlung erhöhter Triglyzeridspiegel im Blut eingesetzt wird²²¹. Fibrate wurden in dieser Indikation bereits genutzt, bevor ihre Zielstruktur und ihr molekularer Wirkmechanismus entschlüsselt waren.

Für PPAR γ wurde eine Aktivierung durch den Arachidonsäuremetaboliten 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (**14**, Abbildung 12) gezeigt und damit bewiesen, dass auch dieser Rezeptor von endogenen Fettsäuren aktiviert wird²²². Die Klasse der Glitazone umfasst die Vertreter der antidiabetisch genutzten PPAR γ Modulatoren, beispielhaft das Rosiglitazon²²³⁻²²⁵ (**15**, Abbildung 12), welches u. a. auch in vielen Assaysystemen als Referenzsubstanz genutzt wird.

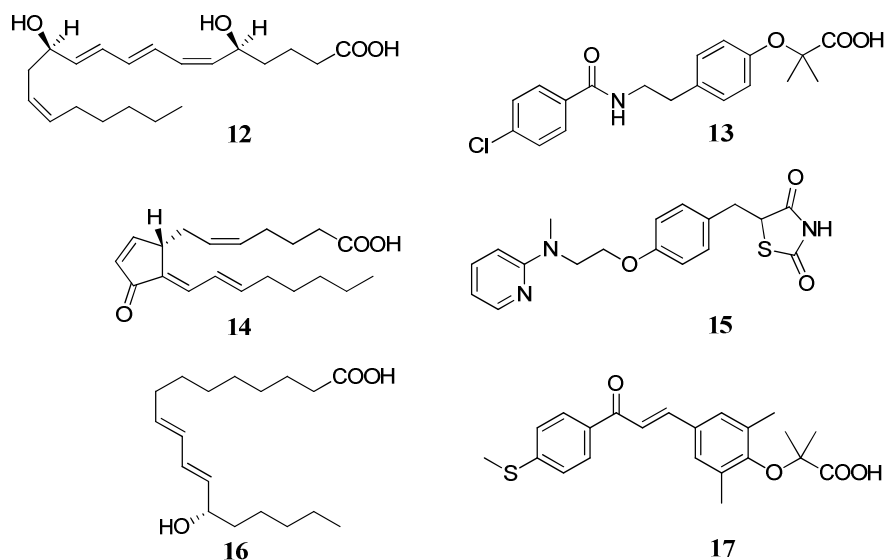


Abbildung 12 Endogene und synthetische Liganden der Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren α , γ und δ . Die synthetischen Liganden Bezafibrat (**13**), Rosiglitazon (**15**) und Elafibranor (**17**) ahmen die klassische Fettsäurestruktur nach um die Ligandbindestelle der PPARs zu adressieren.

Auch für PPAR δ wurde eine endogene Fettsäure als Modulator identifiziert: die 13-S-Hydroxy-octadecadiensäure (**16**, Abbildung 12) hat sich als effektiver endogener PPAR δ -Antagonist erwiesen²²⁶. Klinisch konnte sich bisher noch kein Modulator dieses Rezeptors durchsetzen,

doch mit Elafibranor (**17**, Abbildung 12) zeigt ein dualer PPAR α und δ Agonist in klinischen Studien überzeugende Effekte zur Behandlung der nicht-alkoholischen Fettleberentzündung⁷.

Wie oben angedeutet, besitzen die drei PPAR-Subtypen das Potential bei verschiedensten Krankheiten regulierend eingreifen zu können. Neben den bereits umgesetzten Anwendungsbereichen Diabetes Mellitus Typ 2 (PPAR γ) und Hypertriglyzeridämie (PPAR α) befinden sich weitere Kandidaten in der klinischen Testung für metabolische Krankheiten⁷. Doch auch außerhalb dieser klassischen Indikationen erscheint ein Einsatz von PPAR-Modulatoren mittlerweile erfolgsversprechend. Die Effekte auf Zellen des Immunsystems und Bildung von Zytokinen lassen sie als Optionen insbesondere für inflammatorische Erkrankungen erscheinen. Außerdem besitzen die PPARs interessante Expressionsmuster im ZNS, so dass ein Einsatz bei neurodegenerativen Erkrankungen eine neue Therapieoption ermöglichen könnte.

Zusätzlich besitzen die PPARs den Vorteil, dass es bereits eine ganze Reihe von potenten synthetischen Agonisten auf dem Markt oder in späten Phasen der klinischen Entwicklung gibt. Allerdings sollte auch die Kehrseite dieser Substanzen berücksichtigt werden:

So sind verschiedenste Nebenwirkungen bei einigen Vertretern der PPAR-Modulatoren beobachtet worden, deren Schweregrad zwar deutlich variiert, jedoch teilweise zu Marktrücknahmen der entsprechenden Substanzen führten. Für PPAR α -Modulatoren wurde wiederholt in präklinischen Studien eine Hepatomegalie in Nagetieren beobachtet (auch wenn die Übertragbarkeit auf den Menschen vermutlich nicht direkt gegeben ist)²²⁷⁻²³⁰ und die Interaktion von Statinen mit Fibraten führte zu schweren Rhabdomyolysen²³¹, die sogar letal endeten²³². Bei PPAR γ -Modulatoren stehen neben einer Gewichtszunahme, eine Nebenwirkung, die bei diabetischen Patienten besonders zu berücksichtigen ist, auch kardiovaskuläre Effekte im Blickpunkt²³³. Die Entwicklung von PPAR δ Modulatoren steht unter Beobachtung, da präklinisch eine vermehrte Bildung von Adenokarzinomen unter Therapie mit dem PPAR δ -selektiven Liganden GW501516 aufgefallen ist²³⁴, auch wenn noch nicht geklärt ist, ob es sich hierbei um einen Klasseneffekt handelt, oder ob es eine substanzspezifische Nebenwirkungen ist.

PPAR-Liganden mussten also schon einige Rückschläge während ihrer therapeutischen Anwendung hinnehmen, jedoch sind die Forschungsbemühungen an diesen Rezeptoren nach wie vor hoch. Der Fokus hat sich allerdings etwas von ihren ursprünglichen metabolischen Einsatzgebieten verstärkt in andere Indikationen verschoben, bei denen gerade erst begonnen wird die Rolle der PPARs zu entschlüsseln.

1.4 Nukleäre Rezeptoren als Therapieoptionen bei neurodegenerativen Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen gehören zu den großen Herausforderungen der aktuellen Forschung und Arzneimittelentwicklung. Allein in Deutschland sind über eine Millionen Menschen an Alzheimer Demenz (AD), Morbus Parkinson (MP) und Multipler Sklerose (MS) erkrankt²³⁵⁻²³⁷. Diese Krankheiten verursachen nicht nur immense Kosten im Gesundheitssektor (bis zu 40.000 € pro Jahr und Patient bei schweren Formen der AD²³⁸), sie sind auch eine besonders schwere Belastung für Patienten und Angehörige. Neurodegenerative Erkrankungen sind chronische Erkrankungen, die entweder mit einer progressiven (AD, MP, primär/sekundär progrediente MS) oder einer schubförmigen Verschlechterung (schubförmig remittierende MS

(*relapsing remitting MS, RRMS*) einhergehen²³⁵. MP ist pathophysiologisch durch einen Verlust dopaminerger Nervenzellen, besonders im Bereich der Basalganglien, gekennzeichnet²³⁹. Als Ursache für den Niedergang dieser Nervenzellen werden fehlgefaltete Proteinablagerungen vermutet (sogenannte Lewy-Körperchen)²³⁹. Die Leitsymptome umfassen Rigor, Ruhetremor und Standunsicherheit^{239,240}. Patienten, die an AD erkrankt sind, leiden unter mindestens zwei der folgenden Symptome: Gedächtnisstörungen, Veränderungen im Verhalten, Verschlechterung der Sprachfunktion oder der räumlich-visuellen Funktionen, sowie eingeschränktes Verstehen komplexer Aufgabenstellungen und eingeschränktes Urteilsvermögen^{235,239}. Post mortem lässt sich eine allgemeine Hirnatrophie feststellen, von der insbesondere cholinerge Neurone betroffen sind²³⁹. Während bei der AD die Ursache noch nicht abschließend geklärt ist – zur Debatte stehen u.a. zytotoxische Ablagerungen von β -Amyloid ($A\beta$)²³⁹ und (hyperphosphoryliertem) Tau-Protein²⁴¹ –, ist die Pathophysiologie der MS deutlich besser verstanden. Autoreaktive T-Zellen dringen in das ZNS ein und attackieren die schützende Myelinschicht der Neurone. Zusätzlich gehen die Myelin-produzierenden Zellen, die Oligodendrozyten (OLs), verloren²⁴². Durch die Demyelinisierung nimmt die Leitfähigkeit der Neurone ab und es kommt so neurologischen Ausfallerscheinungen wie Sensibilitätsstörungen, Schmerzen und Lähmungen²³⁹.

So unterschiedlich die Auswirkungen und Symptombilder auch sind, so verbindet die meisten neurodegenerativen Erkrankungen, dass eine lokale, neuronale Entzündung zum Krankheitsbild beiträgt. Die Kontrolle dieser neuronalen Entzündungsprozesse durch nukleäre Rezeptoren könnte einen neuen Therapieansatz darstellen^{10,243–245}.

Die aktuelle Pharmakotherapie dieser drei Krankheiten konzentriert sich zumeist auf eine Behandlung der Symptome oder eine Verminderung der Schubhäufigkeit^{235,240,246}. Bisher ist es noch nicht möglich, regenerativ in den Krankheitsverlauf einzugreifen.

Die primären Therapieoptionen für MP bestehen darin, den Mangel an Dopamin im ZNS – verursacht durch den Niedergang dopaminerger Neurone – durch verschiedene Substitutionsmethoden zu erhöhen. Neben direkten Dopamin-Agonisten wie Pramipexol, Lisurid und Bromocriptin, wird auch der Abbau von Dopamin, sowohl über die Monoaminoxidase B (MAO-B) durch Selegilin oder Rasagilin oder über die Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) durch Entacapon und Tolcapon, gehemmt. Durch Gabe von Levodopa wird die endogene Verfügbarkeit von Dopamin erhöht, dies wird stets mit den Decarboxylaseblockern Benserazid oder Carbidopa kombiniert um die Umwandlung zu Dopamin in der Peripherie zu unterdrücken^{239,240}.

Die deutsche S3-Leitlinie zur Behandlung von Demenzen empfiehlt für die AD bei leichten bis mittelschweren Fällen eine Therapie mit den Acetylcholinesterasehemmern Donepezil, Rivastigmin oder Galantamin²³⁵. Im *off-label* Einsatz können diese Substanzen auch bei schweren Fällen gegeben werden, allerdings ist hier noch keine Überlegenheit gegenüber Placebo gezeigt worden²³⁵. Für Fälle von moderater bis schwerer AD wird der nichtkompetitive N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor Antagonist Memantin empfohlen²³⁵.

Der weitaus größte Teil (~80-85%) der Patienten mit MS leidet an RRMS, der schubförmig verlaufenden Variante, die mit voranschreitender Erkrankung in eine sekundär progrediente Form übergehen kann²⁴⁶. Zu jeder Zeit sollte eine Therapie mit einer Medikation, die den Krankheitsverlauf beeinflusst, durchgeführt werden, jeweils unter regelmäßiger Kontrolle über

die Entstehung neuer Läsionen, das Ansprechen auf die Therapie und unerwünschte Nebenwirkungen²⁴⁶. Für die Dauertherapie stehen neben den zu injizierenden Medikamenten Interferon β -1a oder β -1b, Glatirameracetat und Natalizumab auch orale Optionen wie Fingolimod zur Verfügung^{239,246}. Diese Medikamente beeinflussen die Autoreaktivität des Immunsystems über eine Immunsuppression und -modulation. In der aktiven Phase eines Schubes wird die Entzündung durch Gabe von hochdosierten Glukokortikoiden therapiert²³⁹.

Im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen ergibt sich eine große Dringlichkeit für neue, verträgliche und vor allem effektive Therapieoptionen. Verschiedene nukleäre Rezeptoren sind in diesem Bereich in den Fokus der Forschung gerückt und wurden bereits zahlreich in *in vitro*, *in vivo* und in klinischen Studien untersucht¹⁰. Neben den LXRs, die insbesondere mit einem unvorteilhaften Nebenwirkungsprofil auffallen,^{10,247} sind es PPAR- und RXR-Modulatoren, die in Forschung und Entwicklung am weitesten fortgeschritten sind¹⁰. Im folgenden Abschnitt sollen die wichtigsten Ergebnisse und Ansatzpunkte aus diesem Bereich für die Krankheitsbilder der AD und MS kurz zusammengefasst werden.

1.4.1 Alzheimer Demenz

Die ersten Beobachtungen, dass PPAR γ einen positiven Einfluss auf AD haben könnte, gehen bis in das Jahr 2000 zurück. Mikrogliazellen sind an der neuronalen Entzündung beteiligt^{10,248} und es konnte gezeigt werden, dass durch PPAR γ -Agonisten die entzündungsfördernde Aktivierung der Mikrogliazellen inhibiert werden kann²⁴⁹. Die Effekte von PPAR γ -Agonisten wurden seither in verschiedensten Tier- und Humanstudien getestet und zeigten immer wieder vielversprechende Ergebnisse^{10,250–255}. Eine einheitliche mechanistische Erklärung gibt es bisher nicht, doch stehen neben antiinflammatorischen Effekten auf Zellen und Zytokine¹⁰, Reduktion der A β -plaques durch Induktion von Apolipoprotein E (ApoE)²⁵⁴, Abbau der A β -plaques durch induzierte Phagozytose²⁵⁵ auch eine verbesserte Funktion der Mitochondrien²⁵⁶ – insbesondere über die Interaktion mit PGC-1 α ^{256–258} – in der Diskussion. Zusätzlich wird diskutiert, ob die gesteigerte Insulinsensitivität und der verbesserte metabolische Status durch Glitazone zumindest einen Teil zu den Effekten beiträgt^{259,260}. Allerdings haben viele Studien nur eine schwache bis mangelnde Effektivität feststellen können, weshalb es bis heute keine Zulassung für PPAR γ -Agonisten in diesem Bereich gibt. Ein Problem könnte sein, dass die ZNS-Permeabilität, die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden, nur schwach ausgeprägt ist²⁵². Weitere, auch mechanistische Studien mit neuen selektiven Modulatoren können helfen, die komplexe Rolle von PPAR γ in der AD zu entschlüsseln.

Einer der bedeutendsten genetischen Risikofaktoren für die Entwicklung einer AD ist das ApoE, insbesondere die ApoE4-Variante^{261–265}. Über die genaue Bewertung des Einflusses von ApoE4 herrscht allerdings noch Uneinigkeit, denn ApoE besitzt sowohl toxische (z.B. verstärkte Akkumulation und Neurotoxizität des gebildeten A β ^{266,267}) als auch protektive (z.B. antientzündliche Effekte²⁶⁸ und Entsorgung von A β über die BHS²⁶⁹) Eigenschaften im ZNS, teilweise abhängig vom untersuchten Gewebe²⁶¹. Ob bei der ApoE4 Variante die Verstärkung toxischer Effekte oder die Verminderung der positiven Effekte für die gestiegene AD-Prävalenz verantwortlich ist, lässt sich noch nicht definitiv bewerten²⁶¹. Momentan scheint es am wahrscheinlichsten, dass ein Zusammenspiel beider Aspekte die Krankheit befördert²⁶¹.

Ein weiteres Gen, das einen Einfluss auf den Lipidhaushalt im ZNS besitzt, ist der Transporter

mit ATP-bindender Kasette A1 (*ATP-binding cassette transporter A1*, ABCA1). Dieses Transmembranprotein sorgt für den Efflux von Phospholipiden und Cholesterol hin zum ApoE und trägt damit zur Bildung von HDL bei²⁷⁰. ABCA1 reguliert gemeinsam mit ApoE den Lipid- und Cholesteroltransport im ZNS²⁷¹. Ist die Ausstattung von ApoE mit Lipiden und Cholesterol nicht ausreichend gewährleistet, könnte das auch einen Einfluss auf den Transport und die Akkumulation von A β besitzen²⁷¹⁻²⁷³. Sowohl das ApoE- als auch das ABCA1-Gen stehen unter transkriptioneller Kontrolle der PPAR γ /RXR- und LXR/RXR-Heterodimere²⁶¹. Da beide Heterodimere permissiv sind, könnte ein RXR-Agonist einen verstärkten Effekt durch die gleichzeitige Aktivierung beider Heterodimere entfalten.

Deshalb werden RXR-Agonisten intensiv beforscht und es konnte in einer Tierstudie mit APP/PS1-Mäusen, die erhöhte Level von A β produzieren²⁷⁴, gesunden Mäusen und ApoE-Knockout Mäusen eine Reihe interessanter Effekte beobachtet werden²⁷⁵. Die Gabe von Bexaroten (**1**) als akute Therapie über drei, sieben oder 14 Tage reduzierte die Konzentration von löslichem A β zu 30% und binnen 14 Tagen nahm die Anzahl der A β -Plaques um 75% ab²⁷⁵. Der Effekt auf die A β -Konzentration war bei APP/PS1- und gesunden Mäusen vergleichbar, während die ApoE-Knockout Mäuse kein Ansprechen auf Bexaroten (**1**) zeigten²⁷⁵. Die Reduktion der Plaques findet sich nicht bei chronischer Gabe über drei Monate, auch wenn die Konzentration an löslichem A β immer noch signifikant reduziert ist²⁷⁵. Diese Effekte auf A β wurden von der Linderung krankheitsbezogener Symptome begleitet: So konnte der eingeschränkte Geruchssinn wiederhergestellt werden, Verum Mäuse schnitten im Morris-Wasserlabyrinth-Test – bei dem sich die Versuchstiere an die Position einer Plattform in einem Becken erinnern müssen – auf dem Niveau der gesunden Mäuse ab und auch die normale Reaktion auf Angst-Konditionierung konnte teilweise wiederhergestellt werden²⁷⁵. Es wird postuliert, dass über eine Aktivierung des LXR/RXR- oder PPAR γ /RXR-Heterodimers die ApoE- und ABCA1-Bildung gefördert wird, was letztendlich die symptomatischen Verbesserungen bewirkt²⁷⁵.

Ein ähnlicher Versuchsaufbau wurde bei der Testung des Bexarotenderivats OAB-14 gewählt²⁷⁶. Auch hier wurden APP/PS1-Mäuse über 15 (akut) oder 90 (chronisch) Tage mit Verum behandelt und die Auswirkungen auf kognitive Fähigkeiten und Genexpression untersucht. Unter anderem im Morris-Wasserlabyrinth-Test zeigte sich bei akuter und chronischer Gabe eine Annäherung der Verumgruppen an die gesunden Vergleichstiere. Die Verumgruppen zeigten einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Mäusen²⁷⁶. Histologisch konnte eine reduzierte A β -Akkumulation insbesondere im Hippocampus und im Cortex beobachtet werden, was gleichzeitig mit geringerem Verlust von Neuronen in diesem Bereich einherging²⁷⁶. Diese Studie hat zusätzlich auch noch die Auswirkungen auf hyperphosphoryliertes Tau-Protein untersucht und konnte eine Reduktion in der Verumgruppe feststellen²⁷⁶. Als Ursache für die reduzierten A β -Plaques vermuten die Autoren eine verbesserte Entsorgung durch Phagozytose, indem die Differenzierung zu M2-phagozytierenden Mikrogliazellen gefördert wurde²⁷⁶. Die Genexpression von ABCA1- und ApoE war in der Verumgruppe erhöht.

In einem Tiermodell, bei dem die Mäuse entweder das humane ApoE3 oder das humane ApoE4 exprimieren, zeigte sich ein Effekt von Bexaroten (**1**) auf das Abschneiden der Mäuse im Morris-Wasserlabyrinth-Test. Während die Applikation über zehn Tage keinen Einfluss auf ApoE3 Mäuse zeigte, konnten ApoE4 Mäuse ihr zuvor schlechteres Abschneiden, im Vergleich

mit den ApoE3 Mäusen, ausgleichen²⁷⁷. In beiden Gruppen wurde die A β -Konzentration gesenkt, auf mRNA-Ebene ließ sich nur eine erhöhte Expression des ABCA1-Gens nachweisen, während keine Veränderung bei ApoE durch Bexaroten (**1**) messbar wurde²⁷⁷. Diese Studie zeigte, dass **1** ApoE4 bezogene Symptome lindern kann. Wie der mechanistische Zusammenhang zwischen dieser Beobachtung und dem Einfluss von Bexaroten (**1**) auf den Lipidstoffwechsel aussieht, lässt sich jedoch basierend auf den bisherigen Ergebnissen nicht klären²⁷⁷. Während sich positive Effekte von RXR-Agonisten, verbunden mit ApoE und ABCA1, in unterschiedlichen Ausprägungen und mit modell- und substanzabhängigen Unterschieden, in mehreren Tierstudien reproduzieren lassen, stehen auch andere Mechanismen in der Diskussion²⁴⁷: Es wurde u.a. gezeigt, dass Bexaroten (**1**), neben der Modulation an Lipiden und Cholesterol im ZNS, auch einen Einfluss auf die BHS besitzt und dort den Efflux von A β fördert, während der Influx von A β -beladenen Partikeln inhibiert wird^{278,279}. Beides konnte in *in vitro* und *in vivo* Studien beobachtet werden, jeweils assoziiert mit einer verstärkten Expression von ABCA1 und ApoE. Welche Effekte für den positiven Einfluss von RXR-Agonisten auf verschiedene AD-Modelle verantwortlich sind, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig bestimmen. Die positiven Studien und Effekte bestärken die Bemühungen in diesem Bereich jedoch und forcieren eine intensivere Erforschung.

1.4.2 Multiple Sklerose

Durch Beobachtungen im bekanntesten Tiermodell zur MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wurde eine Wirksamkeit von PPAR α -Modulatoren beobachtet^{171,280}. Am auffälligsten war die Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, die eine Aktivierung der Mikroglia reduzieren könnte¹⁷¹. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus und die Relevanz wurden allerdings noch nicht aufgeklärt, so dass weitere Forschung an selektiven PPAR α -Agonisten und ihrem Einfluss auf neuronale Entzündungen nötig ist.

Auch für PPAR γ -Agonisten gibt es positive Resultate aus mehreren Tiermodellen der EAE^{281,282}. Orale Gabe von Pioglitazon führte sowohl zu einer Verminderung der neuronalen Entzündung, als auch zu einer reduzierten Demyelinisierung²⁸². Diese Effekte ließen sich auch mit zwei weiteren PPAR γ -Agonisten reproduzieren, die dabei beobachtete unterschiedliche Effektivität könnte mit Unterschieden in der Überwindung der BHS assoziiert sein²⁸². Als Grundlage für diese Beobachtungen werden sowohl ein Einfluss auf die Aktivierung und Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen²⁸² als auch eine Inhibition proinflammatorischer Zytokine²⁸¹ angeführt.

Auf der Suche nach neuen pharmazeutisch adressierbaren Zielstrukturen zur Behandlung der MS erhalten die RXRs verstärkte Aufmerksamkeit¹¹. So konnte gezeigt werden, dass der RXR-Agonist 9cRA (**2**) antientzündliche Effekte auf Mikroglia und Astrozyten besitzt, indem er die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1 β hemmt²⁸³. Dies wäre ein direkter Effekt auf die akute Phase der Erkrankung, um die neuronale Entzündung zu reduzieren. Noch bedeutsamer könnte allerdings eine weitere Beobachtung sein: Die Expression von RXR wird durch Schäden im ZNS erhöht²⁸⁴. In den Läsionen, die durch einen aktiven MS-Schub entstehen, wurde eine erhöhte Expression von RXR γ in den Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPC) identifiziert, die sich zu adulten OLs entwickeln und für die Ausbildung der Myelinschicht verantwortlich sind¹². OLs können die Schäden, die durch die autoimmune Entzündung an den Myelinscheiden entstehen, zu einem gewissen Grad reparieren und somit ggf.

regenerativ wirken. Die erhöhte Expression konnte sowohl in einem Mausmodell mit toxisch-induzierter zentraler Demyelinisierung als auch post mortem in humanen Gewebeproben verifiziert werden¹². In *ex vivo* Untersuchungen zur Differenzierung von OPCs zu funktionsfähigen OLs konnte die morphologische Entwicklung mit siRNA gegen RXR γ und – nicht ganz so deutlich, aber dennoch signifikant – mit siRNA gegen RXR α inhibiert werden¹². Beide RXR-Subtypen scheinen in den OPCs wichtige Funktionen zu übernehmen (z.B. geförderte Expression von MBP) und auch die Applikation eines RXR-Antagonisten unterdrückte die *ex vivo* Differenzierung¹². RXR γ -knockout Mäuse zeigten nach der toxin-induzierten Demyelinisierung signifikant weniger ausdifferenzierte OLs in den Läsionen verglichen mit den Wildtypmäusen¹². Umgekehrt ließ sich mithilfe des RXR-Agonisten 9cRA (**2**) sowohl *ex vivo* die Differenzierung der OPCs fördern als auch im Tiermodell nach 14-tägiger Applikation eine verstärkte Ausdifferenzierung zu funktionsfähigen OLs nachweisen, ohne dass die Gesamtanzahl an OLs erhöht wurde¹². Diese Effekte könnten über die Aktivierung von Heterodimeren vermittelt werden, jedoch wurde in dieser Studie keine erhöhte Expression anderer NRs wie den PPARs oder LXRs beobachtet¹². Auch ein Einfluss von RXR-Homodimeren, über deren Aktivität bisher nur sehr wenig bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden.

Der RXR-Agonist IRX4204 zeigte Effekte sowohl in der aktiven Schubphase eines EAE-Modells durch antientzündliche Effekte als auch in der passiven Phase, indem die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen gefördert und die Differenzierung von T_H-17 Zellen gehemmt wurde^{285,286}.

Zusätzlich wird auch noch ein völlig anderer Mechanismus über die Beteiligung von RXR im MS Krankheitsbild diskutiert²⁸⁷. Die Myelin-Fragmente, die infolge einer Demyelinisierung entstehen, sind in der Lage die OPC-Differenzierung zu inhibieren^{288,289}. Die Entsorgung dieser Fragmente stellt somit einen wichtigen Schritt in der Regeneration einer ZNS-Schädigung dar. In *ex vivo* Experimenten mit Monozyten von gesunden Probanden und MS-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Monozyten der MS-Patienten eine signifikante Reduktion von Myelin-Phagozytose aufweisen²⁸⁷. Die verminderte Phagozytose konnte durch Zugabe von Bexaroten (**1**) zumindest teilweise wiederhergestellt werden, ein Effekt, der sich auch *ex vivo* mit Mausemakrophagen reproduzieren ließ²⁸⁷. In Makrophagen-spezifischen RXR α -knockout Mäusen zeigte sich *in vivo* nicht nur eine reduzierte Phagozytose des Myelins nach induzierter Demyelinisierung, es konnte auch eine zeitlich verzögerte OPC-Differenzierung nachgewiesen werden²⁸⁷. Zusätzlich zu diesen Beobachtungen konnten die Autoren nachweisen, dass die reduzierte Phagozytose nicht nur im Zusammenhang mit MS zu beobachten ist, sondern dass die murinen und humanen Monozyten von älteren Probanden ebenfalls diese Beeinträchtigung zeigten²⁸⁷. Auch bei *ex vivo* Experimenten mit den Monozyten älterer Probanden ließ sich eine erhöhte Phagozytose durch einen RXR-Agonisten induzieren²⁸⁷. Wenn man davon ausgeht, dass die Entsorgung von Myelin-Fragmenten mit dem Alter und bei MS-Patienten beeinträchtigt ist und dies für die Erhaltung von Neuronen bedeutsam ist, so könnte eine pharmakologisch erhöhte Myelin-Phagozytose ein zusätzlicher Angriffspunkt sowohl für MS als auch für die Therapie der AD darstellen.

Diese Beobachtungen könnten einen dualen Angriffspunkt in der MS Therapie durch RXR-Modulation ermöglichen: antiinflammatorische Eigenschaften wirken der neuronalen Entzündung entgegen, während die geförderte Differenzierung von OPCs die körpereigenen Reparaturmechanismen fördert.

Im EAE-Tiermodell wurde der Effekt einer kombinierten Gabe von PPAR γ - und RXR-Agonisten getestet²⁹⁰. Die antientzündlichen Effekte beider Einzelkomponenten ließen sich kombinieren und wirkten additiv bis synergistisch. Dadurch konnte die Dosis der einzelnen Komponenten reduziert werden, was die Verträglichkeit der Therapie erhöhen könnte²⁹⁰. Dieser Ansatz ist interessant, sollte es gelingen eine duale RXR/PPAR γ -aktive Substanz zu synthetisieren, um den synergistischen Effekt durch eine einzelne Substanz zu erreichen. Ungeklärt bleibt, welcher Rezeptor in welchem Umfang zu den positiven Effekten im MS-Tiermodell beiträgt, sodass hier weitere Studien zur Zielstrukturvalidierung notwendig sind²⁹⁰.

Die Grundlagen für die Anwendung von Modulatoren nukleärer Rezeptoren bei neurodegenerativen Erkrankungen sind gelegt. Im Bereich der AD sind erste klinische Studien bereits durchgeführt worden, doch zeigte sich bisher keine klinische Überlegenheit. Dies mag insbesondere an dem späten Einsetzen der Therapie liegen, da hier bereits größere Schäden im ZNS entstanden sind. Die Behandlung erfolgt möglicherweise einfach zu spät. Spannende Effekte werden auch im Bereich der MS berichtet und die Verträglichkeit und Sicherheit von Pioglitazon zur Therapie der MS wurde in einer Phase 1 Studie bereits untersucht. Eine größere Phase 1 und 2 Studie u.a. mit Pioglitazon zur MS Therapie soll 2025 erste Ergebnisse über die Entwicklung des Behinderungsgrades liefern (ClinicalTrials.gov-Identifizierungscode: NCT 03109288). Eine klare, mechanistische Aufklärung des Zusammenspiels der nukleären Rezeptoren in der Pathophysiologie und der Therapie ist notwendig, um zielgerichtete Modulatoren zu entwerfen. Der Ansatz, über nukleäre Rezeptoren nicht nur die neuronale Entzündung aufzulösen, sondern auch die Remyelinisierung zu fördern und somit bereits entstandene Schäden zu reparieren, liefert eine völlig neue Hoffnung in der Therapie der MS.

Neurodegenerative Erkrankungen zählen zu den großen Herausforderungen der modernen Medizin. Arzneimittel müssen oftmals über einen langen Zeitraum genommen werden, weshalb sie besonders gut verträglich sein müssen. Außerdem müssen die Medikamente in der Lage sein die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, um ihre Effekte im ZNS entfalten zu können.

Neben diesen Anwendungshindernissen stellt die größte Hürde das unzureichende Wissen über die Pathophysiologie der Krankheiten und die Beteiligung der nukleäre Rezeptoren in deren Entstehung und Therapie dar. Erst, wenn beides besser verstanden wird, können nukleäre Rezeptoren eine neuartige Therapieoption in diesem Bereich darstellen. Der hohe Leidensdruck der Patienten und Angehörigen sind Ansporn und Verpflichtung zugleich, die Bemühungen in diesem Bereich nicht abreißen zu lassen.

2. Zielsetzung

Wie zuvor dargestellt, besitzen nukleäre Rezeptoren wie die PPARs und insbesondere die RXRs vielversprechende, ungenutzte Möglichkeiten für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen. Um diese Potentiale zu erschließen, müssen neuartige Liganden identifiziert, synthetisiert und umfassend *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Entwicklung neuer RXR-Agonisten, da diese durch ihre Funktion als universeller Heterodimerpartner eine einzigartige Stellung innerhalb der Superfamilie der nukleären Rezeptoren einnehmen. Erste Evidenzen lassen sogar eine regenerative Therapie bei Neurodegeneration möglich erscheinen, jedoch sind die bisher verfügbaren Liganden mit erheblichen Nachteilen behaftet, die einen umfassenderen Einsatz verhindern^{12,283,287}.

In dieser Arbeit sollte eine erste Studie zu den Möglichkeiten einer RXR-subtypenselektiven Aktivierung durchgeführt werden. Einzelne RXR-Subtypen durch einen synthetischen Liganden selektiv zu modulieren stellt eine der großen Herausforderungen in der Entwicklung neuer RXR-Agonisten dar. Die orthosterischen Ligandbindestellen der RXRs sind allesamt aus den identischen Aminosäuren aufgebaut⁵⁶ und die bisherigen Chemotypen kommen meist aus einem chemisch eng definierten Bereich: Es sind lipophile Substanzen, die die L-förmige Struktur des postulierten endogenen Liganden 9-*cis*-Retinsäure (**2**, Abbildung 13) nachahmen^{57,291}. Bisher konnte auf dieser Basis allerdings keine überzeugende Subtypenselektivität erzielt werden⁵⁸. Mit der Valerenensäure (**7**) wurde kürzlich der erste RXR-Agonist mit deutlicher Selektivität in der Aktivierung der RXR-Subtypen identifiziert¹¹³. Die Valerenensäure hat bewiesen, dass eine subtypenselektiver Agonismus durch eine niedermolekulare Verbindung möglich ist. Die Möglichkeit Nebenwirkungen zu umgehen oder nur definierte positive Aspekte zu adressieren, lässt die Subtypenselektivität oder wenigstens -präferenz als eine lohnenswerte Weiterentwicklung erscheinen. Daher wurde die Untersuchung eines neuen Chemotyps zur subtypenselektiven RXR-Aktivierung als ein Ziel dieser Arbeit formuliert.

Die 3',5'-Di-*tert*-butyl-(1,1'-biphenyl)-4-carbonsäure (**18**) etablierte einen neuen Chemotyp als RXR-Agonist, der nicht nur eine ungewöhnlich lineare Grundstruktur besitzt, sondern auch ein

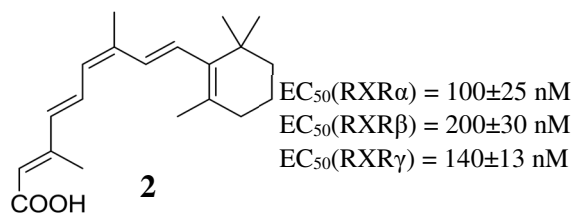


Abbildung 13 Der postulierte endogene Ligand 9-*cis* Retinsäure (**2**) auf dessen L-förmiger Struktur viele Chemotypen bekannter synthetischer RXR Agonisten basieren⁹².

bisher einmaliges Aktivierungsprofil aufweist²⁹¹. So liegt der EC_{50} -Wert zwar auf allen drei Subtypen in einem ähnlichen Bereich ($RXR\alpha/\beta/\gamma = 12/12/14 \mu\text{M}$), allerdings führt **18** nur zu einer minimalen Induktion von $RXR\alpha$, während $RXR\beta$ und $RXR\gamma$ deutlich stärker aktiviert werden (Abbildung 14).

Die Struktur stellt mit ihrer hohen Lipophilie, die durch die Biphenylgrundstruktur in Kombination mit zwei *tert*-Butylresten entsteht, keinen klassischen Startpunkt für die Entwicklung eines neuen Arzneistoffkandidaten dar. Allerdings könnte eine genauere Untersuchung wertvolle neue Erkenntnisse der Ligand-Rezeptor-Interaktion zur Implementierung von Subtypenselektivität liefern.

In dieser Arbeit sollte ausgehend von **18** die Struktur-Wirkungs-Beziehung an allen RXR Subtypen untersucht werden, um herauszufinden, welche Komponenten für das neuartige Profil verantwortlich sind. Die Leitstruktur lässt sich in drei Hauptfragmente aufteilen (vgl. Abbildung 14), die über die Synthese von Derivaten jeweils umfassend *in vitro* pharmakologisch untersucht werden sollten. Ziel dieser Studie war es, Bereiche und Strukturmerkmale zu identifizieren, die Potenz, Aktivierung und Subtypenpräferenz besonders beeinflussen. Abschließend sollte herausgefunden werden, ob sich die einzelnen Einflüsse kombinieren lassen. Die Ergebnisse dieser Selektivitätsstudie sind in Kapitel 3.1 zusammengefasst und die Publikation in Kapitel 16.1 einsehbar.

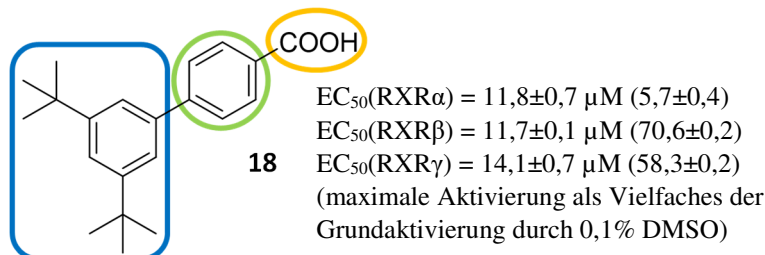


Abbildung 14 3',5'-Di-tert-butyl-(1,1'-biphenyl)-4-carbonsäure (**18**) als RXR-Agonist mit ungewöhnlich linearer Grundstruktur und einzigartigem Aktivitätsprofil in Bezug auf die Effizienz an den unterschiedlichen RXR-Subtypen. Die Struktur lässt sich in drei Hauptfragmente (blau, grün und gelb) für eine systematische Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung unterteilen.

Abbildung 14), die über die Synthese von Derivaten jeweils umfassend *in vitro* pharmakologisch untersucht werden sollten. Ziel dieser Studie war es, Bereiche und Strukturmerkmale zu identifizieren, die Potenz, Aktivierung und Subtypenpräferenz besonders beeinflussen. Abschließend sollte herausgefunden werden, ob sich die einzelnen Einflüsse kombinieren lassen.

Die Ergebnisse dieser Selektivitätsstudie sind in Kapitel 3.1 zusammengefasst und die Publikation in Kapitel 16.1 einsehbar.

Bexaroten (**1**), der einzige synthetische RXR-Agonist, der bisher eine Zulassung erhalten hat und weithin als Referenzsubstanz genutzt wird, ist zwar ein hochpotenter RXR-Agonist ($EC_{50}(RXR\alpha/\beta/\gamma) = 33/24/25 \text{ nM}^{119}$), es besitzt allerdings einige sehr unvorteilhafte physikochemische Eigenschaften: eine hohe Lipophilie ($\log P = 4,7$), geringe Wasserlöslichkeit ($0,3 \text{ mg/L}$) und eine hohe Zelltoxizität¹³⁰.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Überwindung dieser Hürden für die weitere Entwicklung der RXR-Agonisten. Es sollte eine neue Leitstruktur mit verbesserten physikochemischen Eigenschaften identifiziert und systematisch hinsichtlich ihrer RXR-Aktivität optimiert werden. Infolge dieser Optimierung sollten die günstigen physikochemischen Eigenschaften erhalten bleiben und somit ein neuartiger RXR-Agonist entstehen, der dem bisherigen Goldstandard des Bexarotens (**1**) überlegen ist.

Wy14,643^{292,293} (**19**, Abbildung 15) ist ein dualer Agonist an $PPAR\alpha$ und γ mit moderaten EC_{50} -Werten ($EC_{50}(PPAR\alpha) = 36 \mu M$; $EC_{50}(PPAR\gamma) = 54 \mu M$)²⁹⁴. Die Substanz zeichnet sich durch eine effektive Lipidsenkung *in vivo*²⁹² aus, hat es in diesem Anwendungsbereich allerdings nie bis zu Humanstudien gebracht. In den vergangenen vier Jahrzehnten hatte **19** einen festen Platz in der Erforschung von $PPAR$ -vermittelten Effekten⁴⁷. Basierend auf einer umfassenden Literaturrecherche (zusammengefasst in Kapitel 3.2 und nachzulesen in Kapitel 16.2), insbesondere der vielfältigen patentierten Effekte dieser Substanz⁴⁷, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Wy14,643 (**19**) noch über andere, bisher unentdeckte Aktivitäten verfügen muss.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Wy14,643 (**19**) als Agonist des Retinoid X Rezeptors identifiziert werden (Abbildung 15), was eine plausible Erklärung für die vielfältigen Effekte liefern könnte. Aufgrund seiner hervorragenden physikochemischen Eigenschaften (Löslichkeit und Lipophilie), sowie dem ansprechenden dual-agonistischen Profil an $PPAR$ und RXR, sollten die Struktur-Wirkungs-Beziehungen des experimentellen Wirkstoffs an allen sechs Subtypen dieser Rezeptoren systematisch charakterisiert werden. Dabei sollten strukturelle Elemente identifiziert werden, die gezielt die Aktivität an RXR oder $PPAR$ beeinflussen und insbesondere

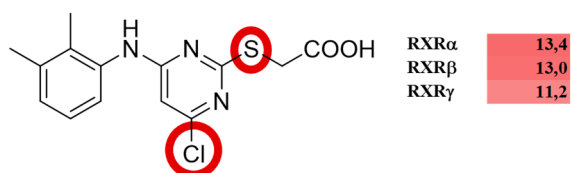


Abbildung 15 Das Fettsäuremimetikum Wy14,643 (**19**) wurde durch den Gal4-Hybrid-Reporterassay als RXR-Agonist identifiziert und als Ausgangspunkt für eine Struktur-Wirkungs-Beziehung genutzt. Die farbkodierte Tabelle gibt die vielfache Aktivierung durch 30 μ M **19** im Verhältnis zur Grundaktivität von 0,1% DMSO an. Rot markiert sind die reaktiven und potentiell toxischen Strukturmerkmale, die es idealerweise zu ersetzen galt.

die RXR-agonistische Aktivität steigern können. Zusätzlich sollten die unerwünschten Strukturelemente – das reaktive Chloratom am Pyrimidinring und der oxidationsempfindliche Thioether (vgl. Abbildung 15) – soweit möglich durch weniger reaktive und stabilere Alternativen ersetzt werden. Am Ende dieser Struktur-Wirkungs-Beziehung sollte ein potenter und selektiver RXR-Agonist mit deutlich überlegenem physikochemischem Profil entstehen, der der

bisherigen Referenzsubstanz Bexaroten (**1**) überlegen ist.

Die Resultate dieser Studie sind im Kapitel 3.2 zusammengefasst und können auch in der Publikation Kapitel 16.3 gefunden werden.

Die Entwicklung neuer Liganden für nukleäre Rezeptoren mit klassischen medizinisch-chemischen Methoden basiert häufig auf einer systematischen Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen²⁹⁵ durch die Synthese und Charakterisierung von geeigneten Derivaten der Leitstruktur²⁹⁶⁻³⁰⁰. Die konstante Rückkopplung zwischen strukturellen Veränderungen der Leitstruktur und deren Einfluss auf die Aktivität an der biologischen Zielstruktur ermöglicht eine stetige Optimierung der Leitstruktur und ein umfassendes Bild über den Einfluss einzelner Bereiche in der Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung.

Ein bedeutender Nachteil dieser klassischen Vorgehensweise liegt in der meist großen Anzahl an benötigten Derivaten, um qualifizierte Aussagen über den Effekt einzelner struktureller Veränderungen treffen zu können. Für valide Aussagen müssen die Veränderungen strukturell systematisch aufgebaut sein, was je nach Leitstruktur eine große synthetische Aufgabe darstellen kann. Den Vorteilen einer klassischen Untersuchung der SAR stehen damit die Nachteile einer möglicherweise langwierigen und kostenintensiven Forschung gegenüber. Dies könnte durch die Einbeziehung moderner *in silico* Methoden umgangen werden, um schneller und günstiger zu einer Leitstrukturoptimierung zu kommen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine computergestützte Optimierung für Liganden nukleärer Rezeptoren etabliert und dieser Ansatz in einer Fallstudie auf seine Anwendbarkeit getestet werden. Als Ausgangspunkt wurde der Cysteinylleukotrienrezeptor(CysLT₁R)-Antagonist Cinalukast (**20**, Abbildung 16) ausgewählt, ein klassisches Fettsäuremimetikum³⁰¹, für den eine Aktivität am PPAR α entdeckt wurde.

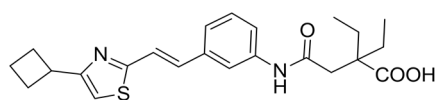


Abbildung 16 CysLT₁R-Antagonist Cinalukast (**20**)

Da die Synthese von Cinalukast (**20**) sehr aufwendig ist^{302,303} und zusätzlich eine Mischung aus Stereoisomeren entsteht, ist es ein schlecht geeigneter Kandidat für eine klassische medizinisch-chemische Optimierung.

Durch die Entwicklung zweier computergestützter Arbeitsabläufe sollte ein Derivat identifiziert werden, das, ganz im Sinne einer selektiven Optimierung von Nebenaktivitäten^{304,305} (*selective optimization of side-activities*, SOSA), sowohl die Nebenaktivität von Cinalukast (**20**) an PPAR α steigert, als auch die ursprüngliche Hauptaktivität am CysLT₁R minimiert.

Die Ergebnisse der hieraus entstandenen Publikation (Kapitel 16.3) sind in Kapitel 3.3 zusammengefasst.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Biphenyle als neuartige Ligandstruktur zur präferenziellen Aktivierung einzelner RXR-Subtypen oder RXR-Heterodimerpartner

Für die Erforschung von Einfluss und Funktion einzelner RXR-Subtypen sowie für die Erschließung ihres Potentials als Zielstruktur zukünftiger Arzneistoffe muss sich die Entwicklung neuer RXR-Agonisten der Herausforderung der Implementierung einer größeren Subtypenselektivität stellen.

Die bisherigen Versuche Subtypenselektivität zu erzielen, gingen meist von der Veränderung bereits bekannter RXR-Agonisten wie Bexaroten (**1**) aus. Dies führte vereinzelt zwar zu Präferenzen im Bereich der EC₅₀-Werte ($\alpha/\beta/\gamma$ in etwa 1:10), allerdings wirken die bislang entwickelten Liganden immer noch auf allen Subtypen als Vollagonisten³⁰⁰. Ein Grundproblem könnte darin liegen, dass es sich bei den bisher verfügbaren RXR-Agonisten generell um sehr ähnliche Moleküle handelt, die wenigen, eng verwandten Chemotypen zuzuordnen sind (vgl. Kapitel 1.2.3): alle ahmen den L-förmigen Charakter der 9-*cis* Retinsäure (**2**) nach^{57,291}. Um der Problematik mangelnder Subtypenselektivität zu begegnen, bedarf es daher möglicherweise grundlegend neuer Chemotypen von RXR-Liganden.

Neben der selektiven Aktivierung eines einzelnen RXR-Subtypen könnte ein großes pharmakologisches Potential in der Entwicklung Heterodimer-selektiver Agonisten liegen: Ein RXR-Agonist, der nicht jedwede RXR-Heterodimer-Kombination aktiviert, sondern entweder nur gezielt solche die gewünscht sind oder wenigstens solche, die bekannte Nebenwirkungen auslösen (wie das LXR/RXR-Heterodimer) ausspart. Es ist bereits gelungen, erste Kandidaten mit einem derartigen Profil zu generieren^{25,144}. Diese Verschiebungen im Aktivitätsprofil dürften mechanistisch auf Konformationsänderungen im Bereich der Dimerisierungszone²⁵ oder der unterschiedlichen Rekrutierung von Coaktivatoren beruhen. Bisher liegen für die selektive Adressierung oder Umgehung einzelner Heterodimere noch keine umfangreichen Struktur-Wirkungs-Beziehungen vor. Bisherige Entwicklungen basieren weitgehend auf Zufallsfunden.

Gemäß diesen Überlegungen war das Ziel dieses Projektes, anhand eines neuen Chemotyps von RXR-Agonisten eine strukturierte SAR-Untersuchung durchzuführen und die Möglichkeiten einer Subtypenselektivität oder -präferenz zu ermitteln. Außerdem sollte eine erste kleine Studie zur SAR von Heterodimer-selektiven Effekten durchgeführt werden.

Kürzlich wurde hierfür eine vielversprechende Leitstruktur (**18**), die sich durch ein bisher einmaliges Aktivitätsprofil auszeichnet, entdeckt²⁹¹. Der EC₅₀ von **18** ist zwar für alle drei RXR-Subtypen vergleichbar (EC₅₀($\alpha/\beta/\gamma$) = 12/12/14 μ M), jedoch führt die Interaktion mit RXR α nur zu einer etwa 6-fachen Aktivierung, während sowohl RXR β als auch RXR γ deutlich stärker aktiviert werden (70- bzw. 60-fach zur Grundaktivität des Rezeptors)²⁹¹. Somit ist es hier nicht nur erstmals gelungen mithilfe eines synthetischen Agonisten eine Präferenz gegenüber RXR α zu erreichen, der Ligand stellt mit seiner linearen Struktur, die auf einem Biphenyl-Gerüst basiert, auch eine neue Grundstruktur für RXR-Agonisten dar (Abbildung 17).

Die Struktur ist chemisch leicht zugänglich, da sich Variationen über eine Suzuki-Kupplung³⁰⁶ aus einer Arylhalogen-Komponente und einer Arylboronsäuren-Komponente aufbauen lassen (Schema 1). Basierend auf diesem Syntheseweg wurde **18** in drei zu untersuchende Teile

aufgeteilt: den ersten Phenylring mit der 3',5'-di-*tert*-Butylsubstitution, den zweiten Phenylring und die saure Seitenkette (Abbildung 17).

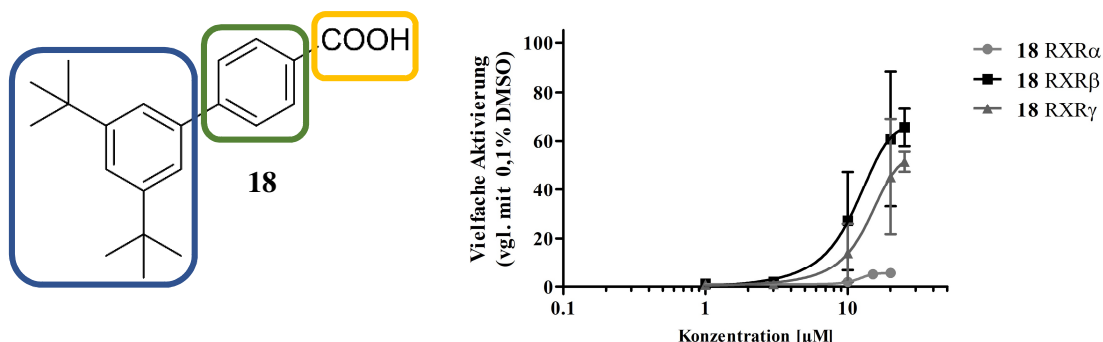
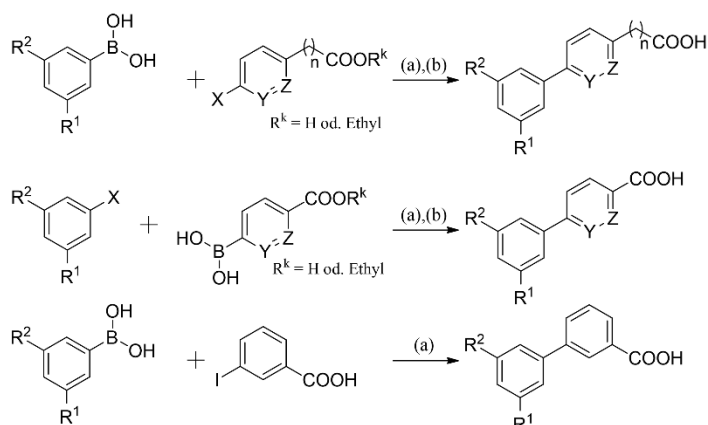


Abbildung 17 Leitstruktur **18** mit besonderem Aktivitätsprofil²⁹¹. Während der EC_{50} -Wert für alle Subtypen vergleichbar ist, wird $RXR\alpha$ durch **18** nur minimal aktiviert. Farblich die Einteilung der Leitstruktur in verschiedenen Optimierungspunkte, die systematisch untersucht werden sollen.

Solang nicht anderweitig angegeben, beziehen sich Aktivitätsangaben im Folgenden stets auf einen etablierten Gal4-Hybrid-Reporterassay. Bei dieser Methode werden HEK293T Zellen 24 Stunden (Std), nachdem sie ausgesät wurden, transient mit drei Plasmiden transfiziert (Transfektion mit Lipofectamin LTX von Invitrogen). Das erste Plasmid kodiert für eine konstitutiv gebildete *Renilla*-Luciferase, die für die Normierung sowie die Kontrolle der Transfektionseffizienz und Toxizitätseffekte genutzt wird. Ein Plasmid kodiert für einen konstitutiv exprimierten Hybridrezeptor, bei dem die LBD des zu untersuchenden humanen Rezeptors mit der Gal4-DBD aus der Hefe fusioniert wurde. Das Reporterplasmid kodiert für die *Firefly*-Luciferase und unterliegt einer Gal4-Promoterkontrolle. Nach 4-5 Std wird das Medium ausgetauscht und enthält dann die zu testende Substanz + 0,1% DMSO, einen Referenzagonisten als Positivkontrolle (+ 0,1% DMSO) oder nur 0,1% DMSO als Negativkontrolle. Nach 14-16-stündiger Inkubation werden die Zellen mit dem DualGlo™-Kit von Promega lysiert und nach-



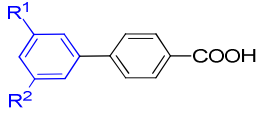
Schema 1 Synthese der Biphenyllderivate. $R1$, $R2$, Y , Z sind an den entsprechenden Stellen im Kapitel definiert. $X = Br$ od. I (a) $Pd(PPh_3)_4$, Dioxan, H_2O , Raumtemperatur (rt), 3,5-48 Std, 3-84%. (b) $LiOH$, Ethanol, H_2O , Tetrahydrofuran, rt, 15-18 Std, 73-84%. Reaktion (b) nur relevant für Derivate, bei denen $R^k = Ethyl$ gilt.

einander die Aktivität der *Firefly*- und der *Renilla*-Luciferase gemessen. Zu Beginn der Untersuchungen zu den Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde versucht die stark lipophile und sperrige Leitstruktur soweit wie möglich zu reduzieren, um deren essentielle Strukturelemente zu identifizieren (Tabelle 3). Hierfür wurde zunächst das 3',5'-Disubstitutionsmuster aufgehoben und stattdessen ohne Substituenten (**21**) oder eine Monosubstitution in 3'-Position (Alkyl- oder Alkoxygruppen) eingeführt (**22-27**). Für die einfachste, unsubstituierte 1,1'-Biphenyl-4-carbonsäure (**21**) sowie beim 3'-Methylderivat (**22**) war keine Aktivität bis zu einer Konzentration von 30 μM an den RXRs mehr messbar. Die Vergrößerung des lipophilen Substituenten zu einem 3'-Isopropyl-Rest (**23**) war allerdings bereits ausreichend, um eine Wiederherstellung der RXR-Aktivität zu ermöglichen. Nicht nur die EC_{50} -Werte, auch die Aktivierungseffizienz auf $RXR\beta$ war vergleichbar

mit der Aktivität der Leitstruktur. Jedoch kam es bei diesem Derivat zu einer Inversion des Selektivitätsprofils: das 3'-Isopropylderivat (**23**) zeigte eine deutlich stärkere Aktivierung des α -Subtyps, während die Aktivität auf RXR γ nahezu vollständig verloren ging. Eine weitere Vergrößerung dieses lipophilen Bereichs, hin zu einem 3'-*tert*-Butylderivat (**24**), führte zu einer weiteren Angleichung der Aktivierungseffizienz zwischen RXR α und RXR β , sowie einem Aktivitätsverlust auf RXR γ bis 20 μ M.

Ein ähnliches Bild ergab sich für Alkoxyderivate (**25-27**): Während kleine Substituenten noch keine RXR-Aktivierung induzieren konnten, entstanden durch schrittweises Vergrößern des lipophilen Restes ausgeglichene RXR α - und RXR β -selektive Agonisten, die keine Aktivierung bis zur höchsten tolerierten Konzentration auf RXR γ induzierten. Durch diese strukturellen Veränderungen ließen sich bereits zentrale Struktur motive für das besondere Aktivitätsprofil der Leitstruktur identifizieren: RXR α toleriert Monosubstitution und bevorzugt kleine Substituenten, während RXR γ -Aktivierung nur bei großer/sperriger Doppelsubstitution erfolgt. Für RXR β ergab sich keine Präferenz, da es von den Veränderungen am wenigsten beeinflusst wurde.

Tabelle 3 Untersuchung des Einflusses von Monosubstitution auf das Aktivitätsprofil

			Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reporterassay (HEK293T, Transfektion mit Lipofectamin LTX, Normierung mit Kontroll-Luciferase) durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in μ M. vielfache Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität mit 0,1% DMSO. Alle Werte sind Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD), $n \geq 3$;		
			EC ₅₀ [μ M] (vielfache Akt.)		
ID	R ¹	R ²	RXR α	RXR β	RXR γ
18	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	11,8 \pm 0,7 (5,7 \pm 0,4)	11,7 \pm 0,1 (71 \pm 1)	14,1 \pm 0,1 (58 \pm 1)
21	H	H	i.a. (30)	i.a. (30)	i.a. (30)
22	Me	H	i.a. (30)	i.a. (30)	i.a. (30)
23	<i>i</i> Pr	H	14,3 \pm 0,6 (28 \pm 1)	16,2 \pm 0,2 (65 \pm 1)	11,6 \pm 0,1 (2,7 \pm 0,1)
24	<i>t</i> Bu	H	18 \pm 2 (19 \pm 2)	12,8 \pm 0,7 (35 \pm 2)	i.a. (20)
25	-OMe	H	i.a. (30)	i.a. (30)	i.a. (30)
26	-OEt	H	22,5 \pm 0,2 (11 \pm 1)	30 \pm 7 (11 \pm 2)	i.a. (30)
27	-OiPr	H	10,6 \pm 0,6 (18 \pm 1)	13,4 \pm 0,7 (19 \pm 1)	i.a. (20)

Im nächsten Schritt der systematischen Untersuchung wurde zum ursprünglichen Doppelsubstitutionsmuster zurückgekehrt (Tabelle 4). Das 3',5'-Dimethylderivat (**28**) war bereits ausreichend, um RXR β sehr effektiv zu aktivieren und zusätzlich eine deutliche Steigerung der Aktivierungseffizienz an RXR α zu generieren. Nur RXR γ ließ sich erneut nicht aktivieren, was sich mit den Beobachtungen der Monosubstitutionsderivate deckt, da auch hier die Derivate mit kleinen Substituenten nicht aktiv waren. Um den Einfluss eines Methyl-Substituenten weitergehend zu studieren, wurde ein asymmetrisch substituiertes Derivat (**29**) erstellt. **29** offenbarte keine andersartige Präferenz, sondern blieb ein schwacher, aber selektiver RXR α - und β -Agonist ohne Aktivität an RXR γ . In Analogie zum Vorgehen bei Monosubstitution wurde ein 3',5'-

Dimethoxyderivat (**30**) untersucht. Dieses zeigte keinerlei Aktivierung an RXR β und RXR γ , jedoch war noch eine Restaktivität (maximal 5-fache Aktivierung) an RXR α detektierbar.

Die bisher untersuchten Substituenten besaßen jeweils Elektronen-schiebende (+I) Substituenten. Der Einfluss dieses Effektes wurde durch einen Wechsel hin zu Elektronen-ziehenden Substituenten mit -I-Effekten getestet. Der Austausch der di-*tert*-Butylreste durch zwei Chloratome in **31** führte zu größeren Verschiebungen im Aktivitätsprofil. Während **31** an RXR β kaum Veränderungen zeigte, verlor es an RXR γ deutlich an Potenz.

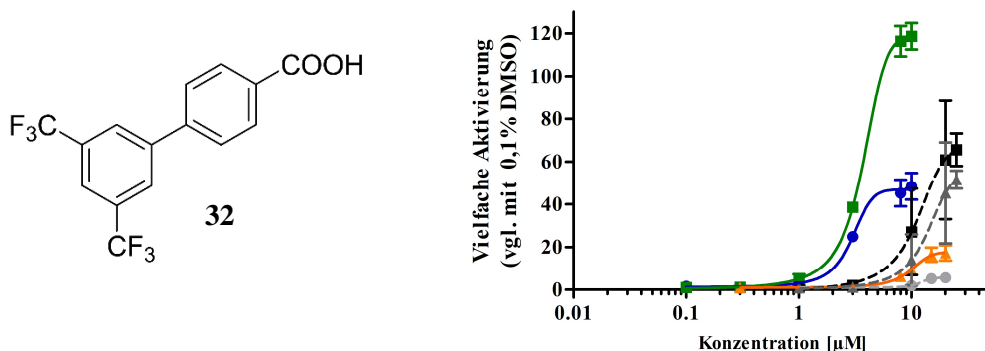
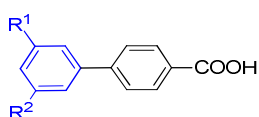


Abbildung 18 Dosis-Wirkungs-Kurven von **32**. In Farbe das optimierte Derivat, in grau bis schwarz die Kurven der Leitstruktur **18** als Vergleich. Symbole: Kreis = RXR α ; Viereck = RXR β ; Dreieck = RXR γ ; Gal4-Hybrid-Reporterassay (HEK293T, Lipofectamin LTX Transfektion, vielfache Aktivierung in Bezug auf 0,1% DMSO), Ergebnisse dargestellt als MW \pm SD; n \geq 3.

Ähnlich massiv änderte sich die Aktivierungseffizienz in Bezug auf RXR α . Hier wurde bei vergleichbarem EC₅₀-Wert eine deutlich erhöhte Aktivierung beobachtet (38-fache Aktivierung vs. 6-fache Aktivierung in **18**). Da die relativ kleinen Chloratome (van der Waals-Volumen 24,4-27,5 Å³)^{307,308} bereits einen ausgeprägten Effekt zeigten, wurde der Ansatz weiterverfolgt, indem der negative induktive Effekt beibehalten und gleichzeitig das van der Waals-Volumen durch Trifluormethylgruppen (39,8-42,6 Å³)^{309,310} vergrößert wurde (**32**, Abbildung 18). Dies hatte erstmals eine moderate Verbesserung der EC₅₀-Werte und gleichzeitig eine Erhöhung der Aktivierung zur Folge (vgl. Abbildung 18, Tabelle 4).

Tabelle 4 Untersuchung des Einflusses von Doppelsubstitution auf das Aktivitätsprofil.

ID	R ¹	R ²	EC ₅₀ [µM] (vielfache Akt.)		
			RXR α	RXR β	RXR γ
18	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	11,8 \pm 0,7 (5,7 \pm 0,4)	11,7 \pm 0,1 (71 \pm 1)	14,1 \pm 0,1 (58 \pm 1)
28	Me	Me	9,6 \pm 0,6 (26 \pm 1)	18,6 \pm 0,2 (97 \pm 1)	i.a. (30)
29	<i>t</i> Bu	Me	8,0 \pm 0,4 (10 \pm 1)	12 \pm 2 (8,4 \pm 0,9)	i.a. (20)
30	-OMe	-OMe	25,4 \pm 0,3 (4,8 \pm 0,1)	i.a. (30)	i.a. (30)
31	Cl	Cl	9,3 \pm 0,4 (38 \pm 2)	13 \pm 1 (68 \pm 5)	> 30
32	CF ₃	CF ₃	3,1 \pm 0,1 (50 \pm 2)	3,7 \pm 0,2 (122 \pm 4)	12,5 \pm 0,4 (25 \pm 1)



Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reporterassay durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in µM. vielfache Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität mit 0,1% DMSO. Alle Werte sind MW \pm SD, n \geq 3.

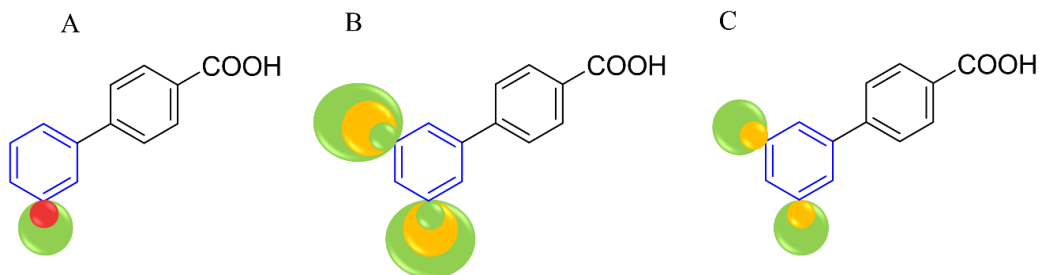


Abbildung 19 Zusammenfassung der Effekte verschiedener Substituenten am ersten Ring der Biphenylstruktur. (A) Monoalkyl- oder Monoalkoxy-Substitution führt bei sehr kleinen Substituenten zu Inaktivität an den RXRs. Sobald die Variationen größer werden, wird die Aktivität wiederhergestellt. (B) Durch 3',5'-Doppelsubstitution wird die Aktivität an RXR erhalten, dabei werden auch kleine Reste toleriert und zeigen Subtypenpräferenz. (C) Substituenten mit $-I$ -Effekten zeigen große modulatorische Eigenschaften, die umso stärker ausgeprägt sind, je größer der eingeführte Rest ist.

Nach diesen SAR-Studien am ersten Ring (zusammengefasst in Abbildung 19) wurden systematische Veränderungen am Benzoessäurering vorgenommen und *in vitro* charakterisiert (Tabelle 5).

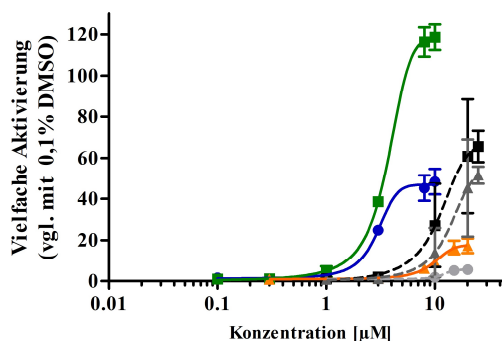
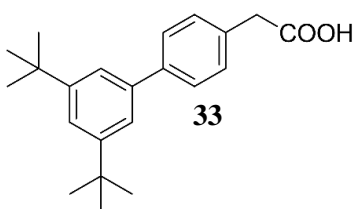


Abbildung 20 Dosis-Wirkungs-Kurven von **33** In Farbe das optimierte Derivat, in grau bis schwarz die Kurven der Leitstruktur als Vergleich. Symbole: Kreis = RXR α ; Viereck = RXR β ; Dreieck = RXR γ ; Gal4-Hybrid-Reporterassay; vielfache Aktivierung in Bezug auf 0,1% DMSO, Ergebnisse dargestellt als MW \pm SD; n \geq 3;

Durch eine homologe Verlängerung der Carbonsäurekette auf ein Essigsäurederivat (**33**) konnte eine deutliche Erniedrigung des EC₅₀ (etwa 20-fach) und eine Steigerung der Aktivierung auf RXR α und β erreicht werden. Auf RXR γ führte die Kettenverlängerung zu einer etwas moderateren Senkung des EC₅₀ auf 3 μ M im Vergleich zu 12 μ M und einem Verlust von Aktivierungseffizienz (Abbildung 20).

Tabelle 5 Untersuchung des Einflusses der Carbonsäurekette und -position auf das Aktivitätsprofil.

ID	R ³	R ⁴	EC ₅₀ [μ M] (vielfache Akt.)		
			RXR α	RXR β	RXR γ
18	COOH	H	11,8 \pm 0,7 (5,7 \pm 0,4)	11,7 \pm 0,1 (71 \pm 1)	14,1 \pm 0,1 (58 \pm 1)
33	-CH ₂ COOH	H	0,47 \pm 0,01 (41 \pm 1)	0,8 \pm 0,2 (126 \pm 12)	3,3 \pm 0,1 (26 \pm 1)
34	-CH ₂ CH ₂ COOH	H	1,5 \pm 0,2 (21 \pm 1)	2,1 \pm 0,2 (94 \pm 6)	5 \pm 2 (17 \pm 4)
35	H	COOH	3,7 \pm 0,1 (31 \pm 1)	3,1 \pm 0,1 (84 \pm 1)	i.a. (10)

Eine weitere homologe Verlängerung zum Propansäurederivat (**34**) führte zu deutlichen Aktivitätseinbußen, wodurch die Essigsäure als optimale Kettenlänge identifiziert wurde. Die Interaktion der Carbonsäure mit dem Rezeptor spielt eine bedeutende Rolle für die Ligandbindung,

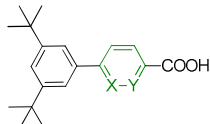
weswegen ein weiteres Derivat synthetisiert wurde, bei dem die Carbonsäure auf die *meta*-Position verschoben wurde. Im Interesse einer möglichst direkten Vergleichbarkeit wurde wieder auf das Benzoessäurederivat zurückgegriffen (**35**). Durch diese Veränderung besaß **35** einerseits keine RXR γ -Aktivität mehr bis zu 10 μ M, andererseits stieg die Potenz auf RXR α und β moderat an (vgl. Tabelle 5).

Zur abschließenden, systematischen Untersuchung des zweiten Benzenringes wurde zur *para*-Benzoessäure zurückgekehrt und die Umgebung des Benzoessäurerings in der Bindungsstelle abgetastet (Tabelle 6).

Hierfür wurden lipophile Erweiterungen in Form von Methylgruppen getestet (**36**, **37**), diese führten in *meta*-Position zur Inaktivität bis zur maximal tolerierten Konzentration von 10 μ M. Eine Methylgruppe in *ortho*-Position führte zu Inaktivität (bis max. 10 μ M) auf RXR α und γ , während dieses Derivat (**37**) mit einer maximal 26-fachen Aktivierung noch eine deutliche Restaktivität an RXR β aufwies. Mit diesem Derivat ist erstmals ein synthetischer Agonist entstanden, der nur einen Subtyp deutlich induziert und damit eine Präferenz offenbarte.

Der Versuch, der insgesamt sehr lipophilen Struktur durch die Einführung von Stickstoffatomen zu den entsprechenden Pyridinderivaten (**38**, **39**) etwas mehr Löslichkeit zu verleihen, wurde durch Aktivitätsverlust (bis zur max. tolerierten Konzentration von 10 μ M) an allen Subtypen durchkreuzt.

Tabelle 6 Untersuchung des Einflusses von Derivatisierungen am Benzoessäurering auf das Aktivitätsprofil.



Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reporterassay durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in μ M. vielfache Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität mit 0,1% DMSO. Alle Werte sind MW \pm SD, n \geq 3.

			EC ₅₀ [μ M] (vielfache Akt.)		
ID	X	Y	RXR α	RXR β	RXR γ
18	CH	CH	11,8 \pm 0,7 (5,7 \pm 0,4)	11,7 \pm 0,1 (71 \pm 1)	14,1 \pm 0,1 (58 \pm 1)
36	C-CH ₃	CH	i.a. (10)	i.a. (10)	i.a. (10)
37	CH	C-CH ₃	i.a. (10)	5,7 \pm 0,5 (26 \pm 5)	i.a. (10)
38	N	CH	i.a. (10)	i.a. (10)	i.a. (10)
39	CH	N	i.a. (10)	i.a. (10)	i.a. (10)

Somit wurden am zweiten Ring drei vielversprechende Variations- und Optimierungsmöglichkeiten identifiziert: erstens ließ sich die Potenz durch Kettenverlängerung steigern, zweitens tolerierten nur RXR α und RXR β die Verschiebung der Säurefunktion in die *meta*-Position und drittens ließ sich durch eine Methylgruppe in *ortho*-Position zur Carbonsäure RXR β -Präferenz besonders gegenüber RXR γ erzeugen.

Die Erkenntnisse aus der hier vorgestellten SAR-Studie wurden anschließend miteinander kombiniert, um dabei maximale Potenz und Subtypenpräferenz zu erzielen (Tabelle 7). Der Effekt der *ortho*-Methylgruppe aus **37** sollte genauer untersucht werden, indem die *ortho*-Methyl-Benzoessäure mit dem potentesten doppelt substituierten Ring – aus dem 3',5'-Bistrifluoromethylderivat **32** – kombiniert wurde (**40**). Dadurch zeigte sich in **40** eine Verbesserung der Aktivierungseffizienz, bei gleichzeitiger Inaktivität (bis 30 μ M) auf RXR γ . **40** führte allerdings

wieder zu einer Aktivierung von RXR α , was einen sehr ausgeglichenen RXR α/β -selektiven Agonisten erzeugte.

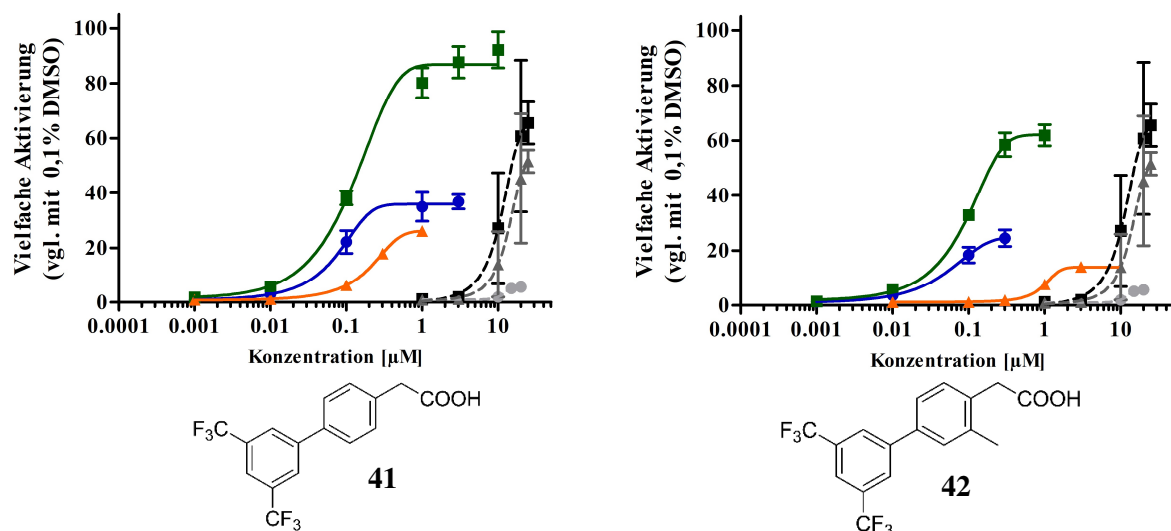


Abbildung 21 Dosis-Wirkungs-Kurven von **41** und **42**. In Farbe das optimierte Derivat, in grau bis schwarz die Kurven der Leitstruktur als Vergleich. Symbole: Kreis = RXR α ; Viereck = RXR β ; Dreieck = RXR γ ; Gal4-Hybrid-Reporterassay; vielfache Aktivierung in Bezug auf 0,1% DMSO, Ergebnisse dargestellt als MW \pm SD; n \geq 3;

Durch die Kombination der optimierten Kettenlänge (Essigsäurederivat **33**) mit dem 3',5'-Bis-trifluormethyl-substituiertem Ring wurde der bis dahin potenteste pan-Agonist (**41**) mit etwa 100-facher Verbesserung des EC₅₀-Wertes und einer relativen Präferenz (maximale vielfache Aktivierung RXR $\alpha/\beta/\gamma$ = 37/93/28) für RXR β Aktivierung erzeugt. Durch die zusätzliche Einführung der *ortho*-Methylgruppe aus **37** konnte die RXR β -Präferenz ausgebaut werden, indem die Aktivität an RXR γ deutlich reduziert wurde (**42**) (vgl. Abbildung 21).

Tabelle 7 Kombination verschiedener selektivitäts- und/oder potenzvermittelnder Derivate. Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reporterassay durchgeführt. i.a., inaktiv bei der angegebenen Konzentration in μ M. vielfache Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität mit 0,1% DMSO. Alle Werte sind MW \pm SD, n \geq 3.

ID	EC ₅₀ [μ M] (vielfache Akt.)		
	RXR α	RXR β	RXR γ
18 	11,8 \pm 0,7 (5,7 \pm 0,4)	11,7 \pm 0,1 (71 \pm 1)	14,1 \pm 0,1 (58 \pm 1)
40 	9,1 \pm 0,1 (43 \pm 1)	8,9 \pm 0,4 (42 \pm 2)	i.a. (30)
41 	0,08 \pm 0,01 (37 \pm 1)	0,15 \pm 0,01 (93 \pm 1)	0,22 \pm 0,01 (28 \pm 1)
42 	0,21 \pm 0,01 (24,7 \pm 0,2)	0,29 \pm 0,01 (62,1 \pm 0,3)	1,00 \pm 0,04 (14,1 \pm 0,3)
43 	15,5 \pm 0,2 (26 \pm 1)	13,1 \pm 0,5 (38 \pm 1)	i.a. (30)

Zuletzt wurden durch die Kombination aus dem Dichlorderivat **31** und der *meta*-Benzoessäure **35** weitere Strukturmerkmale vereinigt, die zuvor eine Subtypenpräferenz implementieren konnten (**43**). **43** zeigte ebenfalls keine Aktivität an RXR γ (bis 30 μ M), aber aktivierte RXR α und RXR β mit ausgewogener, moderater Potenz.

Als Zwischenfazit lässt sich feststellen, dass aus dem neuen Chemotypus der Leitstruktur **18** gleich mehrere Derivate mit Subtypenpräferenz, sowohl in Form von unterschiedlichen EC₅₀-Werten, als auch in Bezug auf unterschiedliche Aktivierungseffizienzen, hervorgegangen sind und die Möglichkeiten der präferentiellen Aktivierung einzelner Subtypen realisierbar erscheinen lassen.

Zusätzlich sollte erstmals auch eine gezielte Studie zur Heterodimer-selektiven Aktivierung durch RXR-Agonisten durchgeführt werden und der Einfluss verschiedener Substituenten auf die Aktivierung sowohl des LXR/RXR- als auch des PPAR γ /RXR-Heterodimers erforscht werden. Da es sich hierbei um einen neuen Chemotyp handelt, gibt es bislang noch keine Daten, wie sich diese Grundstruktur auf die RXR-Heterodimer-Aktivierung auswirkt. Für die systematische Untersuchung solcher Unterschiede ist der Gal4-Hybrid-Reporter-Gen-Assay unzureichend, da hier für die Aktivierung schon die Bindung an ein Monomer/Homodimer ausreicht. Für Studien zur Heterodimerisierung und die Aktivität von Substanzen an diesen Heterodimeren bedarf es komplexerer Testsysteme, wie z.B. Vollängen (VL)-Reporter-Gen-Assays, in denen vollständige humane Heterodimere die Reporter-Aktivierung kontrollieren.

Die hier eingesetzten VL-Assays verlaufen methodisch identisch wie der zuvor beschriebene Gal4-Hybrid-Reporter-Gen-Assay (HEK293T Zellen, transiente Transfektion mit Lipofectamin LTX). Es werden allerdings nur zwei Plasmide transfiziert: das *Renilla*-Luciferase-Konstrukt zur Normierung und ein Reporterplasmid, bei dem die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle eines humanen response Elements für PPAR γ /RXR oder LXR/RXR steht. Es wird keine erhöhte Expression der Rezeptoren PPAR γ , LXR oder RXR induziert. Die Aktivität entsteht durch die natürlich enthaltenen Rezeptoren der humanen Nierenzelllinie.

In dieser Studie wurden zwei unterschiedliche permissive RXR-Heterodimere untersucht, nämlich LXR/RXR und PPAR γ /RXR. Ob sich die Biphenylstrukturklasse auch für Heterodimer-selektive Modulation der RXRs nutzen lässt, wurde am Beispiel einer kleinen Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudie untersucht, bei der vielversprechende Derivate an den Heterodimeren charakterisiert wurden (Abbildung 22). Ausgewählt wurden die beiden potentesten RXR-Agonisten aus dem Gal4-Hybrid-Reporter-Gen-Assay **33** und **41**, die sich nur in der Doppelsubstitution (**33**: di-*tert*-Butyl vs **41**: Bistrifluormethyl) unterscheiden. Zudem wurde das RXR β -selektive Derivat **37** getestet, das sich von der Leitstruktur **18** nur durch die *ortho*-Methylgruppe unterscheidet. **40** wurde ausgewählt, da es sich von **37** wiederum nur durch die Doppelsubstitution unterscheidet (**37**: di-*tert*-Butyl vs **40**: Bistrifluormethyl) und sich dabei gleichzeitig zu einem sehr ausgeglichenen RXR α/β -selektiven Agonisten umwandelte. In **42** sind alle potenz- und selektivitätsfördernden Variationen vereinigt, weshalb es zusätzlich einen interessanten Testkandidaten darstellte. Es wurde jeweils eine Ein-Punkt-Messung bei einer möglichst niedrigen Konzentration vorgenommen, die aber oberhalb des EC₉₀ hinsichtlich der Potenz der jeweiligen Verbindung an RXR (Gal4-Assay) liegen sollte.

In diesem physiologischeren Versuchsaufbau im Vergleich zum standardisierten Gal4-Hybrid-Reporter-Gen-Assay zeigten die beiden potentesten RXR-Agonisten **33** und **41** eine deutliche Aktivierung des PPAR γ /RXR-Heterodimers. Der Austausch der di-*tert*-Butylgruppen in **33** zu den Bistrifluoromethylgruppen in **41** verstärkt nicht nur den RXR-agonistischen Effekt, er führt auch in diesem Heterodimer-versuchsaufbau zu einer deutlich verstärkten Induktion. Die Induktion durch **41** war vergleichbar mit der Aktivierung durch Bexaroten (**1**) und übertraf sogar die Aktivierung durch den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon (**15**). Die drei anderen Substanzen, die

allesamt über die *ortho*-Methylgruppe verfügten, zeigten eine deutlich reduzierte (**42**) oder gar antagonistische Aktivität. Am deutlichsten wurde der Unterschied im Vergleich von **41** mit **42**. Der einzige Veränderung zwischen diesen Substanzen war die Einführung einer *ortho*-Methylsubstitution und dies war ausreichend, um die PPAR γ /RXR-Aktivierung trotz Konzentrationsanpassung annähernd zu halbieren.

Bei der LXR/RXR-Heterodimer Untersuchung zeigte sich, dass keines der getesteten Derivate eine nennenswerte Aktivierung des Heterodimers bewirkte (Abbildung 22). **33**, das im Dimer mit PPAR γ noch eine deutliche Aktivierung induzierte, schien keinerlei Einfluss auf dieses Heterodimer zu haben und auch **41** zeigte nur minimale Aktivität. Für die drei anderen Substanzen bot sich ein ähnliches Bild wie im PPAR γ /RXR-Heterodimer, auch hier kam es zu keiner Induktion und die ersten Ergebnisse ließen eher auf einen Antagonismus schließen.

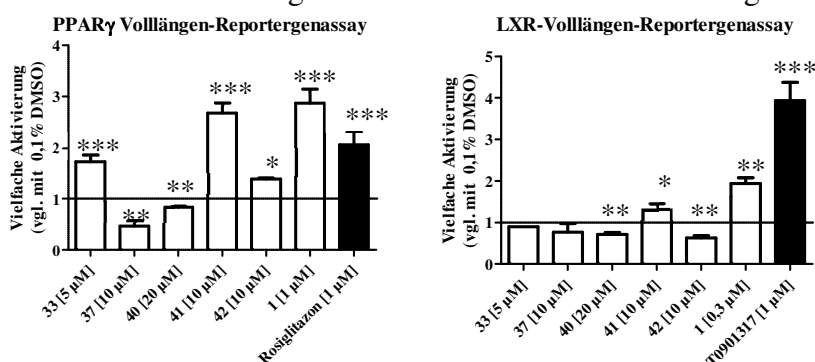


Abbildung 22 Vollängen-Reporterassay (HEK293T, Transfektion mit Lipofectamin LTX, Normierung mit Kontroll-Luciferase). Die Substanzen wurden bei einer Konzentration $\geq EC_{90}$ getestet oder der höchsten tolerierten Konzentration. $n \geq 3$. Ergebnisse sind dargestellt als $MW \pm SD$. Einseitiger studentischer t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ gegen 0,1% DMSO.

Nachfolgend sollte überprüft werden, ob die RXR-Agonisten in der Lage sind, synergistische Effekte in diesen permissiven Heterodimeren auszulösen oder in welcher Form sie die Aktivität der Heterodimere noch beeinflussen. Dafür wurden die Substanzen gleichzeitig mit dem Agonisten des jeweiligen Heterodimerpartners inkubiert (Abbildung 23).

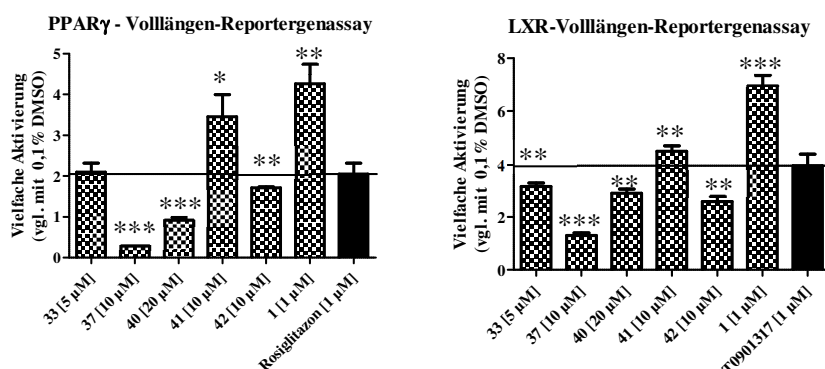


Abbildung 23 Vollängen-Reporterassay zur Untersuchung von synergistischen oder antagonistischen Effekten. Getestete Konzentration $\geq EC_{90}$ oder der höchsten tolerierten Konzentration in Kombination mit 1 μ M des Agonisten des Heterodimerpartners, $n \geq 3$; Ergebnisse sind dargestellt als $MW \pm SD$. Einseitiger studentischer t-Test: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ gegen 1 μ M Referenzagonist.

41 zeigte für das PPAR γ /RXR-Heterodimer einen Synergismus, der auf gleiche Weise auch von Bexaroten (**1**) vermittelt wurde. **33**, das sich von **41** nur durch den Austausch der Trifluormethylgruppen zu zwei *tert*-Butylgruppen unterscheidet, ist schon nicht mehr in der Lage die durch Rosiglitazon vermittelte Aktivierung noch weiter zu steigern, obwohl **33** alleine eine signifikante Induktion des Heterodimers zeigte. Die drei Substanzen, die eine *ortho*-Methylgruppe besitzen (**37**, **40** und **42**), führten in Kombination mit Rosiglitazon zu einer deutlichen

Reduktion der PPAR γ /RXR-Aktivierung.

Ein ähnliches Bild ergab sich aus der Testung am LXR/RXR-Heterodimer bei der Kombination der Substanzen mit dem Referenzagonisten T0901317: Während die Kombination mit **1** zu einem ausgeprägten Synergismus führte, kam es bei den Biphenylderivaten nur zu einer minimalen Aktivierung über das Grundniveau hinaus und das auch nur bei dem potentesten RXR-Agonisten **41**. Die Einführung einer *ortho*-Methylgruppe führte in diesem Versuchsaufbau zu einem deutlichen Aktivitätsverlust, signifikant unterhalb der alleinigen Aktivierung durch den Referenzagonisten, sodass die Substanzen über RXR eine Repression des LXR/RXR Heterodimers zu bewirken scheinen.

Im Gal4-Hybrid-Reporterassay zeigten die Substanzen keine ausgeprägte Interaktion mit PPAR γ oder den LXRs³¹¹, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die im VL-Assay beobachtete Hemmung über RXR vermittelt ist. Für **37** könnte die niedrige Maximalaktivierung an RXR β und die fehlende Aktivität an den anderen RXR-Subtypen eine plausible Erklärung liefern, doch insbesondere **42** ist ein potenter und effektiver RXR-Agonist im Hybrid-Assay, der aber bei der Interaktion mit den Heterodimeren nur schwache Effekte offenbart.

Diese ersten Einblicke in die SAR der Biphenylderivate zur Aktivität an zwei unterschiedlichen Heterodimeren geben Hinweise darauf, dass ein Heterodimer-selektiver Agonismus nicht nur möglich, sondern gezielt über medizinisch-chemische Variationen induzierbar ist. Für genauere Erklärungen bedarf es allerdings noch deutlich ausgeweiteter Studien an den Heterodimeren. Das neuartige Biphenyl-Grundgerüst könnte dafür ein vielversprechender Ausgangspunkt sein.

In Zusammenarbeit mit Dr. Apirat Chaikuad gelang es die Co-Kristallstruktur der LBD von RXR α im Komplex mit **41** zu lösen und somit Einblicke in die Interaktionen des Liganden mit dem Rezeptor zu erhalten (Abbildung 24).

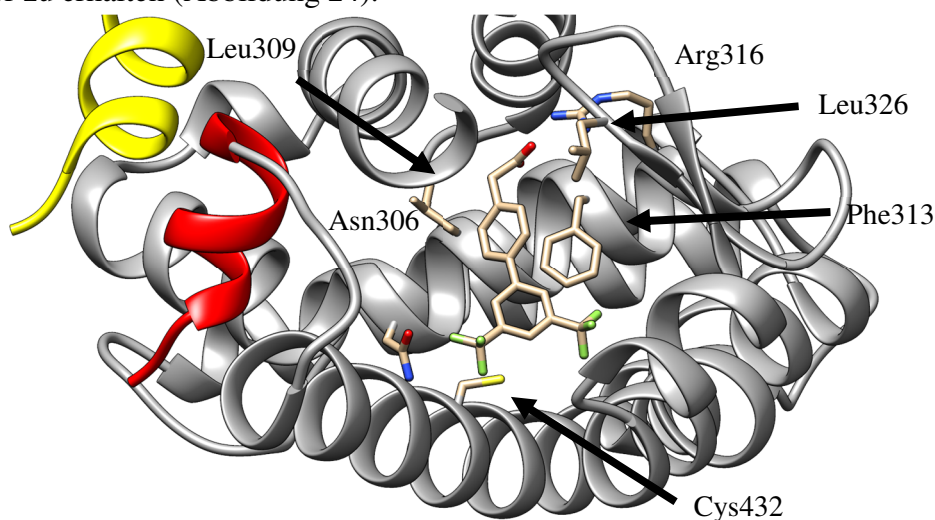


Abbildung 24 Kristallstruktur von **41** im Komplex mit der LBD von RXR α . Die Carbonsäure geht die klassische, starke Interaktion mit Arg316 ein. Die beiden Trifluormethylgruppen füllen den lipophilen Bereich zwischen Helix 7, 8 und 11 aus. Cys432 befindet sich räumlicher Nähe zum Liganden und könnte durch eine elektrophile Gruppe adressiert werden. Helix 12, in aktiver Konformation, ist dargestellt in Rot. Die gelbe Helix kennzeichnet das mitkristallisierte Coaktivatorpeptid.

Die Kristallstruktur bestätigte zunächst die orthosterische Bindung von **41** mit der klassischen polaren Interaktion der Carbonsäure mit Arg316. Die hier geformten Wasserstoffbrückenbindungen sind die einzige vorhandene polare Wechselwirkung. Arg316 ist tief in der Bindetasche verborgen und der Zugang ist nur durch einen engen Tunnel möglich, der aus überwiegend lipophilen Aminosäuren geformt wird (u.a. Leuc309, Phe313 und Leu326, Abbildung 24).

Dieser Tunnel wird durch den Phenylring bereits ausgefüllt, was eine mögliche Erklärung dafür liefert, dass Variationen in diesem Bereich mit starken Aktivitätsveränderungen assoziiert waren (vgl. Tabelle 6). Der lipophile Charakter dieses Bereiches könnte auch erklären, warum die Pyridinderivate (**38**, **39**) nicht toleriert wurden (vgl. Tabelle 6).

Durch die lineare Struktur des Biphenyl-Grundgerüsts zeigt der restliche Teil der Substanz in den hinteren, ebenfalls sehr lipophilen Bereich der Bindetasche. Durch den Winkel der beiden Trifluormethylgruppen wird der lipophile Raum gut ausgefüllt (Abbildung 24) und über Modi-

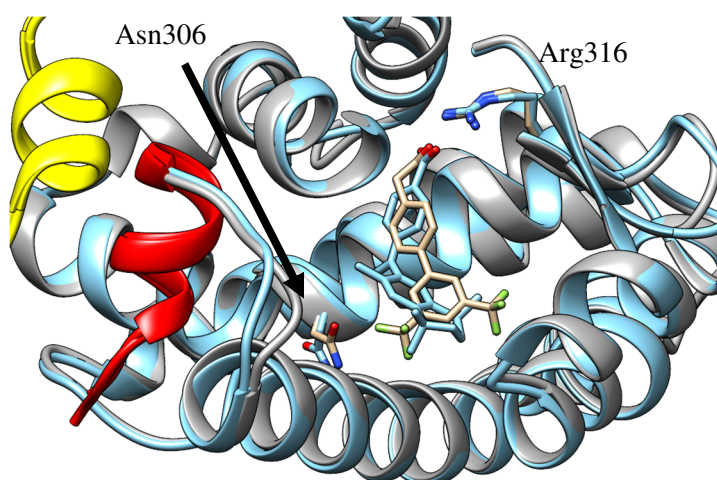


Abbildung 25 Die Überlagerung der Kristallstruktur von RXRα mit **41**(grau) und Bexaroten (**I**) (blau) hebt den neuartigen Bindungsmodus hervor. Die lineare Struktur von **41** adressiert dabei nicht das volle Volumen der Bindetasche, so ist Asn306 in Richtung des Liganden gedreht, während es im Kristall mit Bexaroten vom Liganden abgekehrt vorliegt. Helix 12, in aktiver Konformation, ist dargestellt in Rot. Die gelbe Helix kennzeichnet das mitkristallisierte Coaktivatorpeptid.

wird (Abbildung 25). Durch weitere Modifikationen, die auch noch diesen Teil der Bindetasche adressieren, könnte eine weitere deutliche Steigerung der Potenz möglich sein. Dies könnte allerdings einen Verlust an Selektivität zur Folge haben, da dann vom einmaligen linearen Chemotypen abgewichen wird. Bisher ist nur die Kristallstruktur in RXRα verfügbar, doch sollte es gelingen, die gleiche Substanz in allen drei RXR-Subtypen zu kristallisieren, ließen sich eventuell auch selektivitätsfördernde Variationen entdecken.

fikationen am zweifach substituierten Ring erscheint die Einführung einer reaktiven Gruppe zur Erzeugung einer kovalenten Bindung an Cys432 möglich. Ein solches reaktives Zentrum und die darüber vermittelte Bindung könnte eine deutliche Affinitäts- und Aktivitätssteigerung zur Folge haben³¹².

Die Linearität des Biphenylchemotyps führt allerdings auch dazu, dass nicht die ganze Bindetasche adressiert wird: Asn306 zeigt nicht wie im Kristall mit Bexaroten nach außen, sondern in Richtung des Liganden, wodurch die Bindetasche verkleinert

Diese Ergebnisse wurden veröffentlicht in der Publikation:

Pollinger, J.; Schierle, S.; Gellrich, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heitel, P.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D. A Novel Biphenyl-Based Chemotype of Retinoid X Receptor Ligands Enables Subtype and Heterodimer Preferences. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1346–1352. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00306>.

Eigener Beitrag: Synthese aller Verbindungen, vollständige Charakterisierung der Substanzen durch Gal4-Hybrid-Reporterassays sowie Durchführung des PPAR- und LXR-Volllängenassays. Verfassen des Manuskripts.

3.2 Wy14,643 als Leitstruktur für selektive und duale PPAR und RXR Modulation

Wy14,643 (**19**, Abbildung 26) wurde in den 1970er Jahren erstmals synthetisiert und als potenter Lipidsenker publiziert^{292,293}. Zunächst war der zugrundeliegende Mechanismus dieser Aktivität noch unbekannt, später wurde **19** jedoch als dualer Agonist für PPAR α ($EC_{50} = 36 \pm 3 \mu\text{M}$) und PPAR γ ($EC_{50} = 54 \pm 1 \mu\text{M}$) identifiziert²⁹⁴. In der ursprünglichen Anwendung als Lipidsenker hat es **19** nie bis zu Humanstudien geschafft, es wurde allerdings intensiv als Referenzsubstanz, besonders zur Untersuchung von PPAR α , genutzt. Positive Effekte wurden sowohl bei *in vitro* Untersuchungen, aber besonders bei Applikationen in Tiermodellen der verschiedensten Erkrankungen beobachtet⁴⁷. In den vergangenen vier Jahrzehnten wurden über 20 Patente zu **19** in Bereichen jenseits der ursprünglichen metabolischen Indikationen⁴⁷ veröffentlicht. Bei genauerem Studium der zugehörigen Literatur fiel auf, dass einige der geschützten oder veröffentlichten Effekte von **19** mit dessen bisher bekannter Wirkungsweise nicht zufriedenstellend erklärt werden konnten. So zeigt Wy14,643 z.B. positive Effekte bei mehreren Modellen der atopischen Dermatitis^{313–315}, sowie einer *in vitro*-Studie zur Bildung und Sekretion des A β 42-Proteins, bei dem **19** eine dosisabhängige Reduktion induzierte³¹⁶ und offenbarte immunmodulierende Eigenschaften in einem Tiermodell für MS³¹⁷. Die Effekte, die in diesen Studien gezeigt wurden, konnten entweder nicht durch selektive PPAR α -Agonisten reproduziert werden – im Falle der Alzheimer Studie kam es sogar zum gegenteiligen Effekt – oder ließen sich durch einen Knockout von PPAR α nicht unterdrücken⁴⁷. Nach dieser intensiven Literaturrecherche entstand die Hypothese, dass **19** die RXRs als weitere molekulare Zielstruktur modulieren könnte.

Aufgrund des Aufbaus (Abbildung 26) von **19** als Fettsäuremimetikum³⁰¹ galten weitere nukleäre Rezeptoren als naheliegende potentielle Zielstrukturen. Im Rahmen des Gal4-Hybrid-Reporterassays (Durchführung s. Kapitel 3.1) wurde eine Testung auf elf pharmazeutisch relevanten NRs durchgeführt und Wy14,643 dabei als Agonist für alle drei RXR-Subtypen identifiziert (Abbildung 26). Im Zuge der Untersuchung der vollen Dosis-Wirkungs-Kurven ergaben sich sogar niedrigere EC_{50} -Werte an den RXRs als für die PPARs¹³⁰.

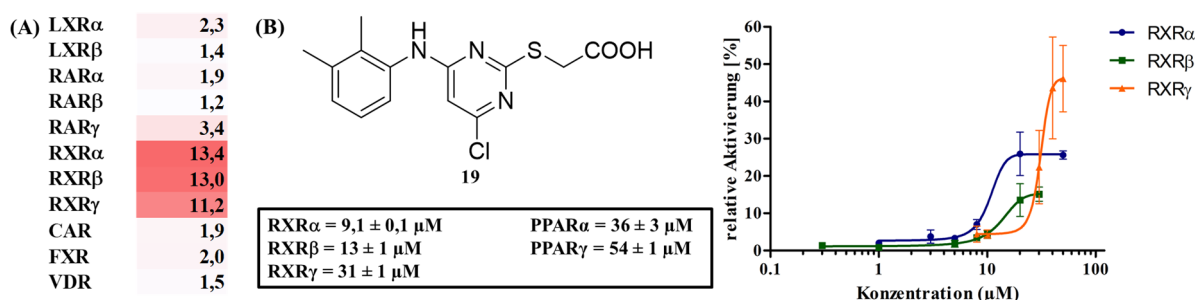
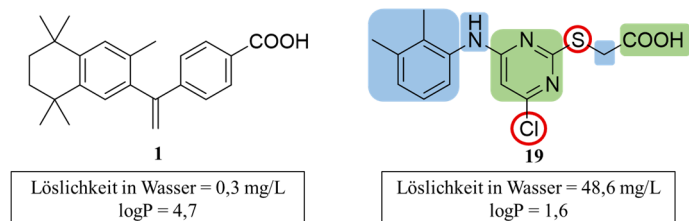


Abbildung 26 (A) Wy14,643 (**19**) zeigt bei $30 \mu\text{M}$ in Gal4-Hybrid-Reporterassays eine deutliche Aktivierung (vielfach im Vergleich zur Grundaktivität von 0,1% DMSO) aller drei RXR-Subtypen, während die anderen nukleären Rezeptoren nicht signifikant aktiviert werden. (B) Volle Dosis-Wirkungs-Kurven ergeben EC_{50} -Werte, die niedriger liegen als für die bereits bekannten PPAR-Interaktionen. Alle Werte sind Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD); Gal4-Hybrid-Reporterassay; HEK293T, Transfektion mit Lipofectamin LTX, Normierung mittels konstitutiver Kontroll-Luciferase; $n \geq 3$. Relative Aktivierung in Bezug auf die Aktivierung durch $1 \mu\text{M}$ Bexaroten.

Diese Entdeckung lieferte eine schlüssige mechanistische Erklärung für die vielfältigen positiven Effekte, die für Wy14,643 (**19**) berichtet wurden⁴⁷. Hervorzuheben ist außerdem, dass **19** für einen RXR-Agonisten überlegene Wirkstoffeigenschaften aufweist: Trotz seines fettsäuremimetischen Aufbaus besitzt **19** mit dem Pyrimidinring eine sehr vorteilhafte Struktur, die eine

ungewöhnlich gute Löslichkeit (48,6 mg/L)¹³⁰ und eine geringe Lipophilie (logP = 1,6)¹³⁰ ermöglicht. Besonders im Vergleich mit dem bisherigen Goldstandard in der RXR-Forschung und -Medikation, Bexaroten (**1**, Abbildung 27), werden die Vorzüge neuer, von Wy14,643 abgeleiteter RXR-Agonisten deutlich. Andererseits besitzt **19** auch zwei unvorteilhafte Strukturelemente, denn die Thioetherstruktur ist oxidationsempfindlich und der Chlor-Substituent am zentralen Pyrimidin birgt als reaktives Zentrum das Potential für unspezifische Interaktionen und Toxizität.



*Abbildung 27 Der Vergleich von Wy14,643 (**19**) mit Bexaroten (**1**) verdeutlicht die strukturelle Ähnlichkeit. **19** besticht dabei allerdings mit überlegenen physikochemischen Eigenschaften. Die grün hinterlegten Fragmente sollen unverändert bleiben. An den blau hinterlegten Bereichen sollen Variationen überprüft werden. Rot umrandet sind reaktive Zentren, die idealerweise in einem optimierten Molekül ersetzt werden sollten. Für die Bestimmung der Löslichkeit wurden jeweils 3 mg Substanz für 24 Std. bei 37 °C in 2 ml dest. Wasser gelöst. Quantifizierung mittels HPLC. Bestimmung des logP über Retentionszeit an der HPLC.*

Durch die neuentdeckte Interaktion mit den RXRs ergibt sich die Möglichkeit, eine umfassende Struktur-Wirkungs-Beziehung an sechs pharmazeutisch relevanten Rezeptoren durchzuführen. Sowohl die PPARs als auch die RXRs besitzen besonders im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen ein noch nicht ausgeschöpftes Potential. Ein Ziel dieser Arbeit war die Modifikation der Leitstruktur hin zu potenteren und selektiven Derivaten. Mit einem

Set aus einem PPAR-selektiven, RXR-selektiven und dual-aktiven Derivat gleichen Chemotyps könnte ein vertiefendes Verständnis der (patho-)physiologischen Interaktionen dieser Rezeptoren erlangt werden. Um detaillierte medizinal-chemische Einblicke in die Ligand-Rezeptor-Interaktion zu erhalten, sollten systematisch die Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht werden. Abschließend sollte das gesammelte SAR-Wissen kombiniert und ein selektiver, potenter RXR-Agonist gewonnen werden, der dem bisherigen Goldstandard Bexaroten hinsichtlich physikochemischer Eigenschaften überlegen ist.

Aus vorangegangenen Arbeiten des Arbeitskreises Schubert-Zsilavec^{294,318}, in denen Wy14,643 auf die duale Aktivität an PPAR α und γ optimiert wurde, konnten elf Derivate wiederverwendet und auf RXR-agonistische Aktivität in Gal4-Hybrid-Reporterassays getestet werden. Am α -C-Atom der 2-Mercaptoessigsäure wiesen sechs dieser Derivate einen lipophilen Substituenten auf. Diese Variation führten zu einer Steigerung der Potenz an den PPARs, während die Derivate auf den RXRs deutliche Aktivitätsverluste verzeichneten. Die Einführung einer lipophilen Seitenkette stellt somit eine effektive Modifikation dar, um gleichzeitig die duale PPAR α und γ Potenz zu fördern und die Aktivität an den RXRs zu umgehen. Aus dieser Serie entstammt der potenteste selektive PPAR-Agonist der hier beschriebenen Verbindungen (**44**, Tabelle 8).

Weitere Derivate, die gezielte Modifikationen in allen Molekülteilen umfassen – ausgenommen des Pyrimidin-Kernfragments und der Carbonsäuren-Kopfgruppe – wurden basierend auf publizierten Synthesewegen²⁹² mit geeigneten Anpassungen hergestellt und in Gal4-Hybrid-Reporterassays auf ihre Aktivität an allen drei RXR und allen drei PPAR-Subtypen getestet.

Eine weitere Möglichkeit zur Verlagerung der Selektivität wurde durch verschiedene Variationen des reaktiven Chlor-Substituenten entdeckt (Tabelle 8). Ohne einen Substituenten an dieser Position wird RXR (bis 50 μ M) nicht aktiviert, während das Derivat (**45**) auf den PPARs

potenter wird. Der bioisostere Ersatz^{309,319} des Chloratoms durch eine Trifluormethylgruppe, der bereits in der Biphenylstruktur erfolgreich umgesetzt wurde (vgl. Kapitel 3.1), bevorzugte dafür die RXRs leicht, während die Substanz (**46**) besonders an PPAR γ Aktivität verlor.

Tabelle 8 SAR von Wy14,643: Variationen am α -C-Atom und Ersatz des zentral Chlorsubstituenten.

Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reportergenassay (HEK293T, Transfektion mit Lipolectamin LTX, Normierung mittels konstitutiver Kontroll-Luciferase) durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in μM . Aktivität als % des jeweiligen Referenzagonisten (Bexaroten (RXRs), GW7647 (PPAR α), Rosiglitazon (PPAR γ), L165,041 (PPAR δ)) bei $1\ \mu\text{M}$ angegeben. * = relative Aktivierung bezieht sich auf **19** bei $100\ \mu\text{M}$. Alle Werte sind $\text{MW}\pm\text{SD}$, $n\geq 3$; Die Aktivität an den PPARs von **19** und **44** wurde zuvor publiziert²⁹⁴.

ID	R ¹	R ²	EC ₅₀ [μM] (max. rel. Aktivierung)					
			RXR α	RXR β	RXR γ	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
19	H	Cl	9,1 \pm 0,1 (26 \pm 1%)	13 \pm 1 (16 \pm 1%)	31 \pm 1 (46 \pm 1%)	36 \pm 3 (100%)*	54 \pm 1 (19 \pm 1%)	>100
44	nButyl	Cl	i.a. (50)	i.a. (50)	i.a. (50)	1,2 \pm 0,2 (132 \pm 7%)*	3,0 \pm 0,1 (28 \pm 8%)	i.a. (30)
45	H	H	< 10% (50)	i.a. (50)	i.a. (50)	14 \pm 2 (119 \pm 8%)	36 \pm 1 (14 \pm 1%)	i.a. (50)
46	H	CF ₃	10 \pm 1 (16 \pm 1%)	10,1 \pm 0,2 (12 \pm 1%)	21 \pm 2 (15 \pm 1%)	5,4 \pm 0,4 (29 \pm 1%)	< 10% (50)	6,8 \pm 0,2 (20 \pm 1%)

Als stabilere Alternative zum oxidationsempfindlichen Schwefel wurde zunächst eine normale Etherstruktur (**47**) getestet. Dies führte allerdings auf allen sechs Rezeptoren zu Inaktivität bis $50\ \mu\text{M}$, was die herausragende Funktion der Carbonsäure-Rezeptor-Interaktion noch einmal verdeutlicht. Als Hypothese wurde angenommen, dass durch den etwas kleineren Sauerstoff und die veränderte Geometrie des Ethers die Carbonsäure nicht mehr die richtige Distanz zu Arg316 einnehmen kann. Deshalb wurde eine homologe Erweiterung des Essigsäurederivats zu einem Propansäurederivat (**48**) vorgenommen, was nicht nur die Aktivität wiederherstellte und die Potenz an allen Rezeptoren im Vergleich mit dem Thioether verbesserte, es förderte auch besonders die maximale relative Aktivierung auf den RXRs (Tabelle 9).

Tabelle 9 SAR von Wy14,643: Variationen am Thioether und verbrückendem Amin

Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reportergenassay durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in μM . Aktivität als % des jeweiligen Referenzagonisten (Bexaroten (RXRs), GW7647 (PPAR α), Rosiglitazon (PPAR γ), L165,041 (PPAR δ)) bei $1\ \mu\text{M}$ angegeben. * = relative Aktivierung bezieht sich auf **19** bei $100\ \mu\text{M}$. Alle Werte sind $\text{MW}\pm\text{SD}$, $n\geq 3$; Die Aktivität an den PPARs von **19** wurde zuvor publiziert²⁹⁴.

ID	X	Y	EC ₅₀ [μM] (max. rel. Aktivierung)					
			RXR α	RXR β	RXR γ	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ
19	S	NH	9,1 \pm 0,1 (26 \pm 1%)	13 \pm 1 (16 \pm 1%)	31 \pm 1 (46 \pm 1%)	36 \pm 3 (100%)*	54 \pm 1 (19 \pm 1%)	>100
47	O	NH	i.a. (50)	i.a. (50)	i.a. (50)	i.a. (50)	i.a. (50)	i.a. (50)
48	O-CH ₂	NH	6,8 \pm 0,8 (47 \pm 1%)	11,1 \pm 0,3 (28 \pm 1%)	26 \pm 2 (50 \pm 4%)	26 \pm 4 (29 \pm 2%)	14 \pm 1 (14 \pm 1%)	13 \pm 2 (16 \pm 1%)
49	S	O	4,7 \pm 0,1 (26 \pm 1%)	6,8 \pm 0,2 (18 \pm 1%)	26,2 \pm 0,8 (34 \pm 1%)	14 \pm 2 (30 \pm 2%)	<10% (50)	<10% (50)
50	S	NMe	2,8 \pm 0,1 (19 \pm 1%)	5,5 \pm 0,2 (20 \pm 1%)	17,1 \pm 0,8 (45 \pm 1%)	<10% (50)	<10% (50)	<10% (50)

Eine große Bedeutung kommt auch dem sekundären Amin zu. Der Austausch zu einer Etherfunktion (**49**) wurde von den RXRs präferiert und führte auf den PPARs zu einem Aktivitätsverlust. Diese Tendenz ließ sich durch die Methylierung desamins noch verstärken und führte zu einem ersten selektiven RXR-Agonisten (**50**, Tabelle 9).

Für die abschließende Optimierung wurde der 2,3-Dimethylphenylsubstituent variiert. Eine

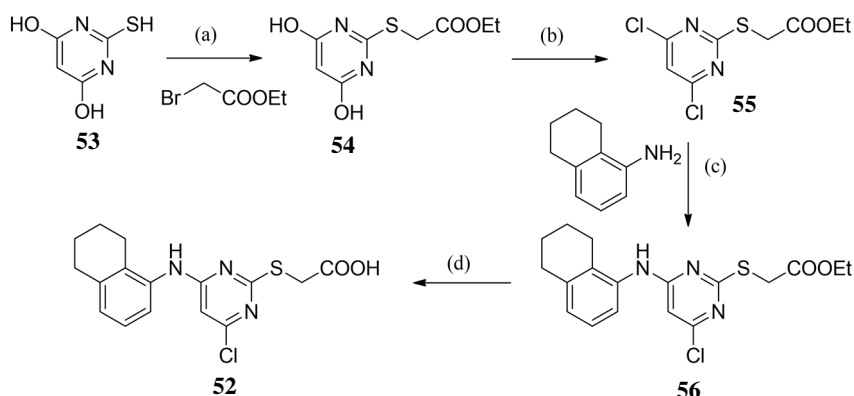
Verkleinerung des lipophilen Bereichs führte zu Einbußen bei Potenz und Aktivität an den RXRs, während die PPARs von diesen Veränderungen wenig betroffen waren.

Tabelle 10 SAR von Wy14,643: Variationen am 2,3-Dimethylphenylsubstituenten.

ID	R ³	EC ₅₀ [μM] (max. rel. Aktivierung)					
		RXRα	RXRβ	RXRγ	PPARα	PPARγ	PPARδ
19		9,1±0,1 (26±1%)	13±1 (16±1%)	31±1 (46±1%)	36±3 (100%)*	54±1 (19±1%)	>100
51		1,5±0,1 (50±1%)	3,1±0,2 (23±1%)	5,6±0,2 (49±1%)	16±1 (95±8%)*	38±1 (16±3%)	>100
52		1,4±0,1 (43±1%)	2,3±0,2 (39±1%)	3,2±0,2 (43±1%)	1,2±0,2 (55±3%)	2,1±0,2 (14±1%)	7,1±0,8 (30±2%)

Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reporterassay durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in μM. Aktivität als % des jeweiligen Referenzagonisten (Bexaroten (RXRs), GW7647 (PPARα), Rosiglitazon (PPARγ), L165,041 (PPARδ)) bei 1 μM angegeben. * = relative Aktivierung bezieht sich auf **19** bei 100 μM. Alle Werte sind MW±SD, n≥3; Die Aktivität an den PPARs von **19** und **51** wurde bereits zuvor publiziert²⁹⁴.

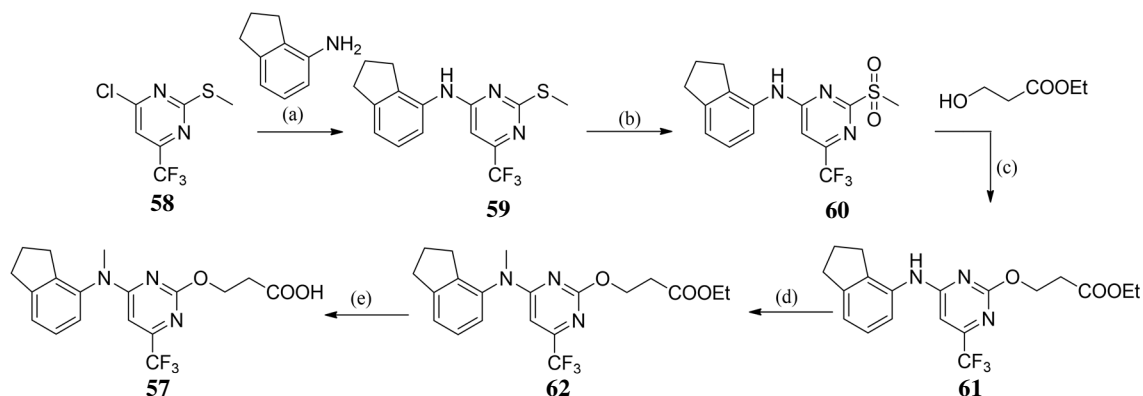
Eine Vergrößerung zum Indan steigerte die Aktivität wiederum besonders für die RXRs (**51**), während eine weitere Vergrößerung zum 5,6,7,8-Tetrahydro-1-naphthalenamin (**52**, Schema 2) von allen sechs nukleären Rezeptoren bevorzugt wurde, sodass **52** keine RXR-Präferenz mehr aufweist. **52** stellte einen potenten und sehr ausgeglichenen dualen Agonisten dar, der sowohl



Schema 2 Synthese von **52**. (a) Ethanol, H₂O, NaOH, 60 °C, 3,5 Std, 37%; (b) POCl₃, N,N-Diethylanilin, 90 °C, 5 Std, 78%; (c) Triethylanilin, Ethanol, Mikrowelle, 120 °C, 4 Std, 64%; (d) LiOH, Ethanol, H₂O, Tetrahydrofuran, rt, 16 Std, 77%

die RXRs als auch die PPARs aktiviert (Tabelle 10).

Im Zuge der systematischen SAR-Untersuchung konnten vier RXR-favorisierende Strukturmodifikationen identifiziert werden: I) Ersatz des Thioethers durch einen Ether mit homologer Erweiterung der Kettenlänge führt zu einer Potenz- und Aktivitätssteigerung, besonders ausgeprägt auf den RXRs. II) Der Ersatz des zentralen Chlor-Atoms durch das Trifluormethyl-Bioisoster³²⁰ reduziert die Aktivität an den PPARs, während die RXRs diese Veränderung leicht bevorzugen. III) Eine Vergrößerung des Dimethylanilins zum Indanamin bevorzugt RXR über PPAR. IV) Durch Methylierung des sekundärenamins wird die Potenz an RXR gesteigert und die Aktivität an den PPARs eliminiert. Diese vier Erkenntnisse wurden in einem Derivat kombiniert (Schema 3) und dadurch ein hochpotenter und selektiver RXR-Agonist erhalten (**57**, Tabelle 11).



Scheme 3 Synthese des kombiniert RXR-favorisierenden Derivates **57**. (a) Triethylamin, Ethanol, Mikrowelle, 120 °C, 4 Stunden, 38%; (b) Na₂WO₄, H₂O₂, Eisessig, Raumtemperatur (rt), 24 Stunden, 78%; (c) Lithium bis(trimethylsilyl)amid, Tetrahydrofuran, rt, 4 Stunden, 63%; (d) Methyljodid, K₂CO₃, DMF, rt, 24 Stunden, 77%; (e) CF₃COOH, H₂O, rt, 24 Stunden, 63%

Die in den Schemen 2 und 3 dargestellten Synthesen stehen repräsentativ für alle selbst erzeugten Derivate.

Tabelle 11 Aktivitätsprofil des Derivats, das durch Kombination aller RXR-favorisierender Strukturmerkmale entstand.

ID	EC ₅₀ [μM] (max. rel. Aktivierung)					
	RXRα	RXRβ	RXRγ	PPARα	PPARγ	PPARδ
19	9,1±0,1 (26±1%)	13±1 (16±1%)	31±1 (46±1%)	36±3 (100%)*	54±1 (19±1%)	>100
57	0,093±0,001 (43±1%)	0,143±0,003 (46±1%)	0,36±0,04 (54±1%)	< 10% (50)	< 10% (50)	< 10% (50)

Die Testung wurde im Gal4-Hybrid-Reporterassay durchgeführt. i.a., inaktiv zur angegebenen Konzentration in μM. Aktivität als % des jeweiligen Referenzagonisten (Bexaroten (RXR_α), GW7647 (PPAR_α), Rosiglitazon (PPAR_γ), L165,041 (PPAR_δ)) bei 1 μM angegeben. * = relative Aktivierung bezieht sich auf **19** bei 100 μM. Alle Werte sind Mittelwert MW ± SD, n ≥ 3; Die Aktivität an den PPARs von **19** wurde bereits zuvor publiziert²⁹⁴.

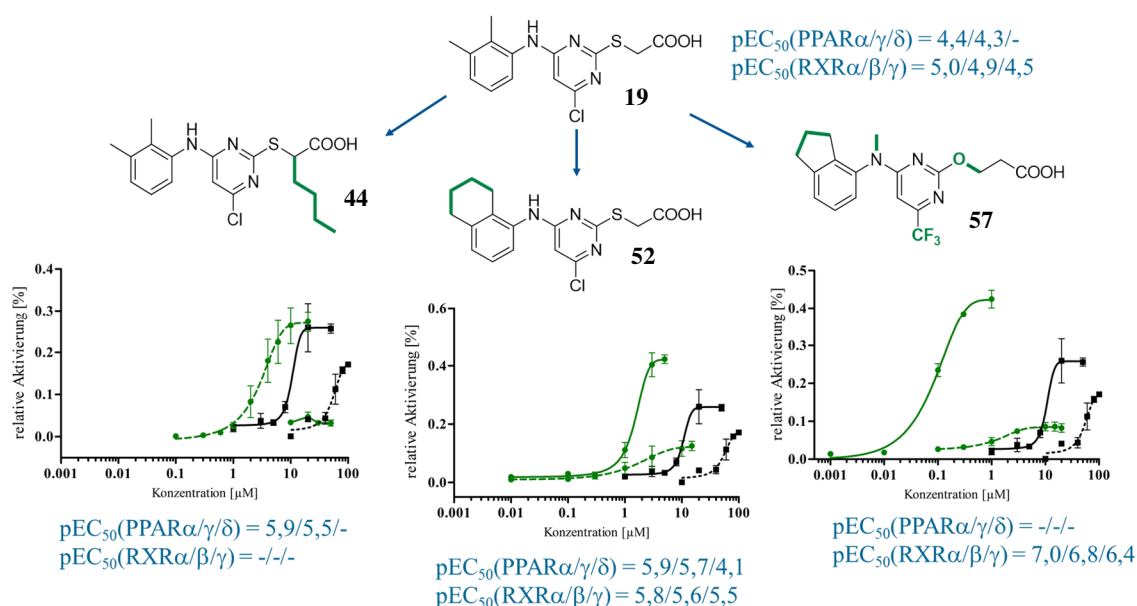


Abbildung 28 Leitstruktur **19** und die optimierten Derivate **44**, **52** und **57**. Die strukturellen Veränderungen sind in grün gekennzeichnet. Die Veränderung in der Aktivierung wird exemplarisch an RXRα (durchgezogene Linien) und PPARγ (gestrichelte Linien) durch die Kurvendiagramme wiedergegeben. In grün jeweils die Kurven der optimierten Substanzen. In schwarz zum Vergleich die Kurven der Leitstruktur Wy14,643.

Es ist somit gelungen, mittels systematischer Untersuchungen aus Wy14,643 ein Set von drei Derivaten zu generieren, die auf dem gleichen Chemotyp basieren und strukturell eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, aber über sehr unterschiedliche Aktivitätsprofile an den RXRs und PPARs verfügen (Abbildung 28). Es wurde nicht nur die pan-PPAR/pan-RXR Potenz von Wy14,643 im Derivat **52** auf allen Rezeptoren massiv gesteigert, **44** stellt auch ein potentes PPAR-selektives Derivat dar. Die deutlichste Steigerung gelang aber durch die Kombination des gesammelten SAR-Wissens in einem einzigen Molekül (**57**), bei dem ein RXR-selektiver Agonist mit annähernd 100-facher Steigerung der Potenz erhalten wurde.

Dieses RXR-selektive Derivat (**57**) stand im Fokus der weiteren Charakterisierung. Im Gal4-Hybrid-Reporterassay zeigte es Selektivität gegenüber acht weiteren, verwandten nukleären Rezeptoren u.a. den RARs und den LXRs¹³⁰.

Darüber hinaus gelang in **57** die Erhaltung der günstigen physikochemischen Eigenschaften von Wy14,643, die besonders anschaulich an der überlegenen Löslichkeit in Wasser zu erkennen sind (Abbildung 29).

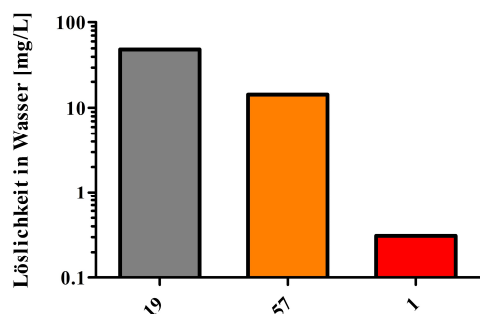


Abbildung 29 Vergleich der Löslichkeit in Wasser der Leitstruktur Wy14,643 (**19**), dem RXR-selektiven Derivat **57** und dem Referenzagonisten Bexaroten (**1**). **57** verliert an Löslichkeit, für einen RXR-Agonisten ist sie aber immer noch hervorragend (**57:1** = 46:1). Für die Bestimmung wurden je 3 mg Substanz für 24 Std. bei 37 °C in 2 ml dest. Wasser gelöst. Quantifizierung mittels HPLC.

Gegenüber der Leitstruktur hat es zwar leicht an Löslichkeit verloren, der Vergleich mit Bexaroten (0,3 mg/L) hebt aber nochmal die herausragenden Eigenschaften hervor. Das RXR-selektive Derivat **57** besitzt eine annähernd 50-fach höhere Löslichkeit in Wasser (14,3 mg/L).

Da es sich bei **57** um eine völlig neue Klasse von RXR-Modulatoren handelt, wurde die *in vitro* pharmakologische Charakterisierung von **57** noch weiter fortgeführt. In einem PPAR γ -Vollängen-Assay (beschrieben in Kapitel 3.1) zeigte sich zunächst nur eine schwache Aktivierung, in Kombination mit dem Referenzagonisten Rosiglitazon wird allerdings ein deutlich synergistischer Effekt beobachtet. Hierbei wird der Effekt einer beidseitigen Aktivierung in einem permissiven Heterodimer ersichtlich. Ohne komplementären PPAR γ -Agonisten ist die beobachtete Heterodimeraktivierung durch **57** gering, wird PPAR γ jedoch auch aktiviert (Rosiglitazon), steigt die Aktivierung deutlich an (Abbildung 30).

Die biologische Aktivität von **57** konnte auch durch Quantifizierung der mRNA von PPAR γ -regulierten Genen mittels einer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) bestätigt werden (Abbildung 30). Dabei wurden hepatozelluläre Karzinomzellen (HepG2) für 12 Stunden inkubiert (das Medium mitsamt Substanz wurde nach 6 Stunden einmal erneuert) und anschließend die Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Zur Normierung wurde die mRNA-Expression des Referenzgens Glyzerylaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) quantifiziert. Die Auswertung erfolgte mittels vergleichender $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

Die PPAR γ /RXR-regulierten Gene ApoE und das Angiopoetin-ähnliche Protein 4 (*angiopoetin-like peptide 4*, ANGPTL4) wurden untersucht. Während **57** bei der ANGPTL4-Induktion keinen statistisch signifikanten Effekt erreichte, konnte bei ApoE eine stärkere Induktion beobachtet werden. Die ApoE-Expression ist bekanntermaßen stark von RXR-Aktivität abhängig,

sodass sich der selektive RXR-Agonismus von **57** hier deutlicher bemerkbar macht²⁶¹ (Abbildung 30).

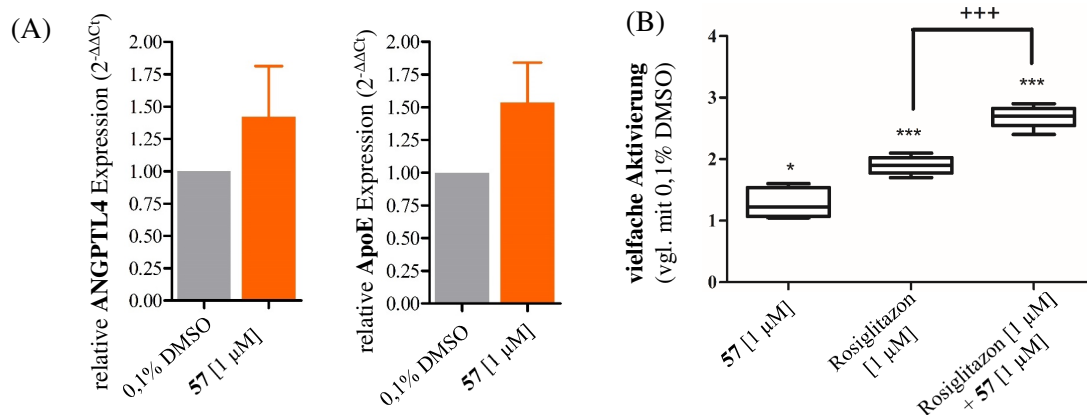


Abbildung 30 *In vitro* pharmakologische Charakterisierung von **57**. (A) Bei der qRT-PCR zeigte sich bei den PPAR γ -Zielgenen *ANGPTL4* und *ApoE* eine Tendenz zur verstärkten Induktion. # = $p < 0,1$ vs 0,1% DMSO; HepG2 Zellen, 12 Std. Inkubation, RNA-Extraktion und Umschreiben in cDNA mittels Kits, Auswertung nach $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, Normierung auf GAPDH; $n=4$, Ergebnisse $MW \pm S.E.M.$ (B) Im PPAR γ VL-Reporter-genassay induzierte **57** nur eine schwache Aktivierung des Heterodimers. In Kombination mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon zeigte sich eine deutliche synergistische Aktivierung. * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$ vs 0,1% DMSO; +++ = $p < 0,001$ vs Rosiglitazon [1 μ M] $n \geq 3$; HEK293T Zellen, Transfektion mittels Lipofectamin LTX, Normierung mittels konstitutiver Kontroll-Luciferase. Bearbeitet nach [130]; Genehmigung erteilt durch American Chemical Society (2019).

Eine der häufigsten Nebenwirkungen von RXR-Agonisten ist die Erhöhung der Triglyzeridspiegel¹²⁷, die zumindest teilweise auf eine Induktion des LXR/RXR-Heterodimers zurückzuführen ist. Ein wichtiger Indikator dafür ist die erhöhte Expression des regulatorischen Sterol-Bindungselement-1c (*sterol regulatory binding-element-1c*, SREBP-1c). Bexaroten bewirkte *in vitro* in HepG2 Zellen eine deutliche Induktion dieses LXR-regulierten Gens, während **57** *in vitro* keine Induktion von SREBP-1c auslöste, sondern sogar die SREBP-1c-Induktion durch den LXR-Agonisten T0901317 verringerte (Abbildung 31). Über den Gal4-Hybrid-Reporter-genassay konnte bestätigt werden, dass dieser Effekt nicht auf einen orthosterischen Antagonismus an LXR zurückzuführen ist (Abbildung 31). Basierend auf den bisherigen Ergebnissen lässt sich somit die Hypothese ableiten, dass **57** zumindest teilweise ein Heterodimer-selektiver RXR-Agonist ist, der das LXR/RXR-Heterodimer nicht adressiert.

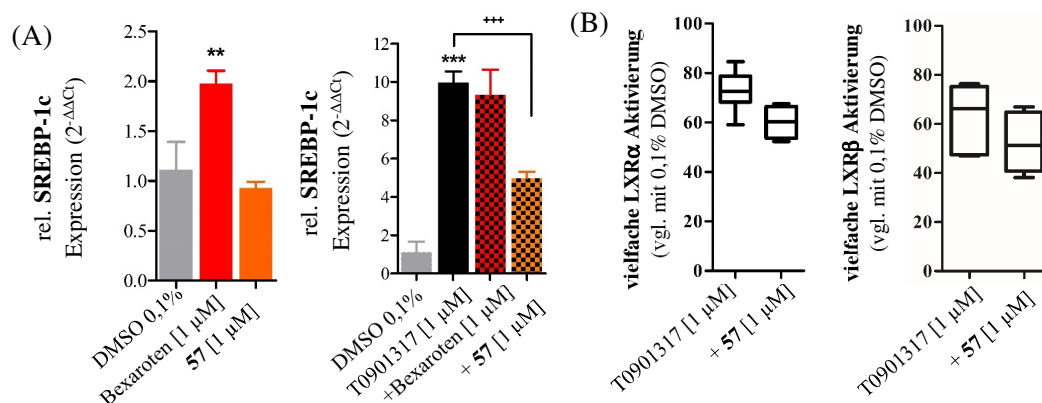


Abbildung 31 *In vitro* pharmakologische Untersuchung des potentiellen Nebenwirkungsprofils von **57**. (A) **57** induziert keine verstärkte Expression des SREBP-1c. Bei gleichzeitiger Stimulation des LXR-Heterodimerpartners wird die Aktivierung durch **57** sogar gehemmt. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ vs 0,1% DMSO, +++ = $p < 0,001$ vs T0901317 [1 μ M]; Ergebnisse $MW \pm S.E.M.$ $n=4$; HepG2, 12 Std. Inkubation, RNA-Extraktion und Umschreiben in cDNA mittels Kits, Auswertung nach $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode, Normierung auf GAPDH (B) Durch den Gal4-Hybrid-Reporter-genassay konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf einem LXR-Antagonismus beruht. HEK293T, Transfektion mit Lipofectamin LTX, Normierung mittels konstitutiver Kontroll-Luciferase. $n=6$; Bearbeitet nach [131]; Genehmigung erteilt durch American Chemical Society (2019).

Da sich **57** *in vitro* als RXR-Agonist mit überzeugenden Charakteristika hinsichtlich Potenz, Selektivität und physikochemischen Eigenschaften erwiesen hat, wurde eine Pilot-Tierstudie bei der Firma Pharmacelsus (Saarbrücken, Deutschland) in Auftrag gegeben. Neun Mäuse erhielten eine einmalige orale Dosis **57** (10 mg/kg Körpergewicht) suspendiert in Wasser mit 1% Hydroxypropylmethylcellulose/Tween 80 (Verhältnis 99:1). In der Studie wurden die pharmakokinetischen Parameter bestimmt (Abbildung 32) und offenbarten eine hohe Bioverfügbarkeit, eine rasche Aufnahme ($t_{max} = 15$ Minuten), günstige Plasmaspiegel ($C_{max} = 30 \mu\text{g/ml}$) und eine vorteilhafte Halbwertszeit von etwas über vier Stunden.

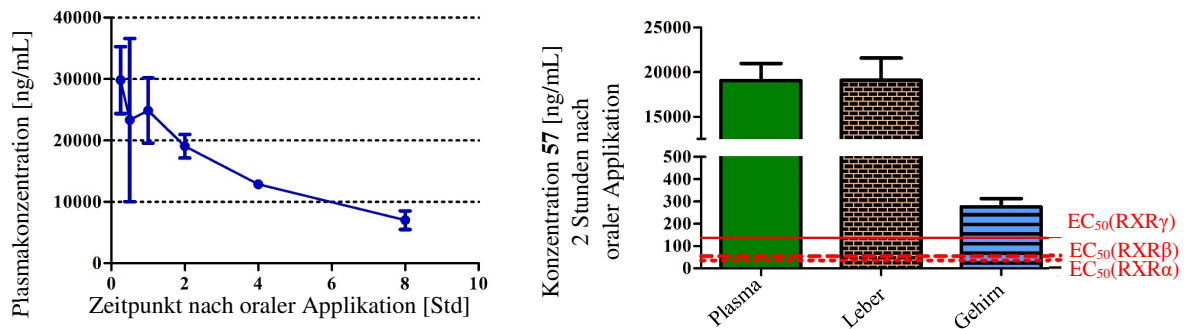


Abbildung 32 Ergebnisse der pharmakokinetischen *in vivo* Studie. 9 Mäuse erhielten jeweils 10 mg/KG Körpergewicht **57** oral appliziert. Mit einer C_{max} bei $30 \mu\text{g/mL}$, t_{max} von 15 Minuten und einer Halbwertszeit von 4,2 Stunden offenbart **57** eine gute Pharmakokinetik mit hoher Bioverfügbarkeit. Nach 2 Stunden zeigt sich keine Anreicherung in Leber. Zusätzlich kann **57** im Gehirn nachgewiesen werden. Die roten Linien geben die Konzentrationen von **57** an den drei EC_{50} -Werten an. Ergebnisse dargestellt als $MW \pm SD$, $n = 3$. Quantifizierung mittels LC-MS. Bearbeitet nach [130]; Genehmigung erteilt durch American Chemical Society (2019).

Nach zwei Stunden wurden bei drei Mäusen die Spiegel von **57** in Plasma, Leber und Gehirn bestimmt. Dabei konnte bestätigt werden, dass es nicht zu einer Anreicherung in der Leber kommt, es konnten aber vor allem auch ausreichende Mengen für eine RXR-Aktivierung im Gehirn nachgewiesen werden (Abbildung 32). Es konnte noch nicht endgültig geklärt werden, ob die Substanz wirklich die BHS passieren kann oder ob es hier eventuell dosisabhängige Effekte zu berücksichtigen gibt, sodass weitere Untersuchungen nötig sind. Allein die Option, dass ein RXR-Agonist mit diesen Eigenschaften teilweise ZNS-gängig sein könnte, lässt die Substanz aber als sehr attraktiven Ausgangspunkt für weitere intensive Forschung erscheinen.

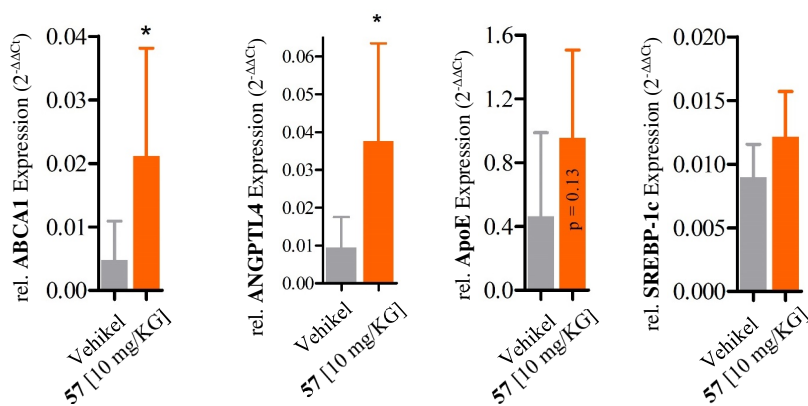


Abbildung 33 Ergebnisse der *in vivo* pharmakologischen Untersuchungen. Die murinen (*m*) Zielgene ABCA1 und ANGPTL4 wurden induziert und belegen eine Aktivität von **57** im Tiermodell. Bei mApoE lässt sich ebenfalls eine Tendenz erkennen. mSREBP-1c wird nicht signifikant induziert. Einseitiger studentischer *t*-Test: * $p < 0,05$ (10 mg/KG **57** vs Vehikel). $n \geq 3$. Zellen gewonnen aus murinen Leberhomogenaten, Lebern entnommen 8 Std nach oraler Applikation von Verum und Vehikel RNA-Extraktion und umschreiben in cDNA mittels Kits, Auswertung nach $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode, Normierung auf mGAPDH. Bearbeitet nach [130]; Genehmigung erteilt durch American Chemical Society (2019)

Neben der Bestimmung der pharmakokinetischen Daten von **57** wurde auch die Modulation von RXR in den Tieren studiert. Hierzu wurde an Lebergewebe mittels qRT-PCR die Induktion

von Genen studiert, die durch RXR-Heterodimere reguliert werden (Abbildung 33). Dabei konnten die Beobachtungen aus den *in vitro* Untersuchungen bestätigt und gezeigt werden, dass **57** auch *in vivo* RXR aktiviert, aber keine Induktion von SREBP-1c hervorruft.

In Zusammenarbeit mit Dr. Apirat Chaikuad ist es gelungen, RXR α im Komplex mit **57** zu kristallisieren (Abbildung 34). **57** bindet an die orthosterische Ligandbindestelle von RXR mit einem klassischen Bindemodus, in dem die Carbonsäure als einzigen hydrophilen Kontakt Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg316 ausbildet. Die Methylgruppe des verbrückenden Amins liegt in einem sehr engen, lipophilen Bereich des Rezeptors, was die deutliche Aktivitätssteigerung durch die Methylierung erklären könnte. Im Gegensatz zur Kristallstruktur des optimierten Biphenyls **41** (Abbildung 24 Kapitel 3.1) klappt Asn306 vom gebundenen Liganden weg, wodurch sich die Bindungstasche vergrößert. Eine lineare Erweiterung im Bereich der Trifluormethylgruppe könnte diese Region noch günstiger ausfüllen und eine weitere Potenzsteigerung ermöglichen. Im direkten Vergleich der Kristallstrukturen von **41** und **57** (Abbildung 34) wird deutlich, dass **57** hinsichtlich seiner Geometrie eher einem klassischen RXR-Agonisten gleicht (vgl. dazu Abbildung 25 Kapitel 3.1). Aus der Überlagerung lässt sich erkennen, dass im hinteren Bereich am Indan-Substituenten noch Raum für (lipophile) Substituenten vorhanden ist. Da im Biphenylderivat **41** in diesem Bereich eine Trifluormethylgruppe positioniert ist, könnte auch in **57** ein Elektronen-ziehender Substituent akzeptiert werden.

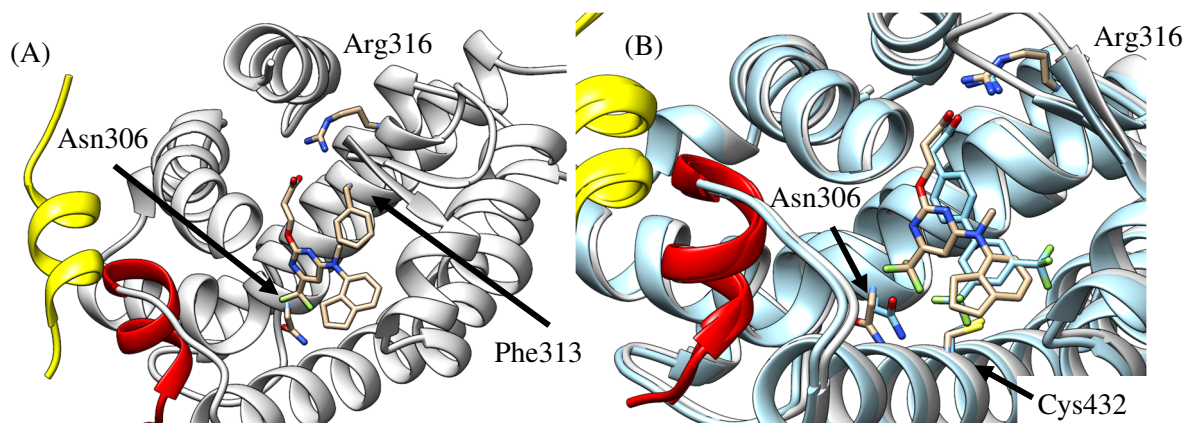


Abbildung 34 Kristallstruktur von RXR α in der Bindung mit **57**. (A) Die Carbonsäure von **57** geht die klassische Interaktion mit Arg316 ein. Die N-Methylgruppe liegt in einem sehr lipophilen Bereich der Bindungsstelle, was ihren großen Einfluss erklären könnte. Asn306 orientiert sich vom Molekül weg und gibt weiteren Raum für Optimierungen frei. (B) Die Überlagerung der Kristallstrukturen von **57** und **41** offenbart die Unterschiede dieser Chemotypen. Anstelle des Indan-Rests von **57** könnte ein Elektronen-ziehender Substituent akzeptiert werden. Für **41** ergeben sich ebenfalls Rückschlüsse: bei gleicher Säurekette müsste ein Stickstoffatom am ersten Ring toleriert werden. In Rot Helix 12 in aktiver Konformation, in Gelb das Coaktivatorpeptid.

Cys432 wäre auch von **57** durch eine elektrophile Gruppe adressierbar, um eine kovalente Bindung mit RXR zu erzeugen³¹². Zur Einführung käme die noch unsubstituierte Position des Pyrimidinrings infrage, eine solche Strukturvariation stellt in **57** ohne weitere strukturelle Änderungen jedoch eine große synthetische Herausforderung dar. Das Biphenylderivat **41** erscheint daher wegen seines simpleren Molekülaufbaus und Synthesewegs als der geeignetere Kandidat für erste Studien zu einer kovalenten Bindung an RXR. Die Verbindung besitzt aber nicht die vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften von **57**.

Umgekehrt lassen sich aus der Überlagerung der beiden Ligand-gebundenen RXR-Strukturen auch Hypothesen zur Optimierung des Biphenylchemotyps von **41** ableiten, die zur Verbesserung von dessen physikochemischen Eigenschaften beitragen könnten. Beispielsweise bindet die *meta*-Position der Phenyllessigsäureteilstruktur von **41** genau an der gleichen Stelle der

RXR-Bindetasche wie ein Stickstoffatom des Pyrimidinrings von **57**, sodass es möglich erscheint an dieser Position eine hydrophile Komponente zu integrieren, um die Lipophilie der Biphenylstrukturen abzumildern. Dabei ist darauf zu achten, dass die Carbonsäure als verlängerte Kette (wie in **41**) vorliegt, da sich die genannten Positionen nur dann überlagern (Abbildung 34).

Auch die Co-Kristallisation von PPAR γ mit dem panPPAR/panRXR-Agonisten **52** ist gelungen (Abbildung 35), wobei der Kristall die Besonderheit offenbarte, dass **52** zweimal an die LBD von PPAR γ gebunden vorliegt. Ein Molekül liegt dabei in der kanonischen, orthosterischen Bindungsstelle der PPAR γ -Agonisten, während sich ein zweites Molekül an eine weitere Bindestelle orientiert. Diese Bindestelle wird, nach aktuellem Forschungsstand, bisher von keinem PPAR γ -Liganden selektiv adressiert. Sie wird u.a. mit Phosphorylierungsvorgängen^{321,322} in Verbindung gebracht und könnte eine Option für PPAR γ -Modulatoren mit reduziertem Nebenwirkungsprofil darstellen^{215,323}. Größere Vertreter von PPAR γ -Liganden, wie das Lobeglitazon, erreichen die alternative Bindestelle nur teilweise als Nebenarm ihrer primären Bindung^{215,324}. Bemerkenswert ist, dass **52** in der alternativen Bindestelle

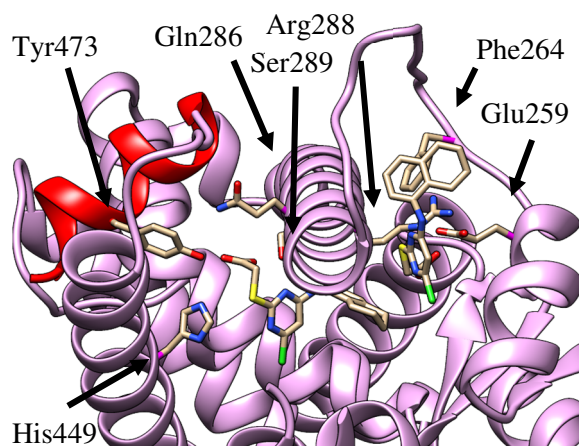


Abbildung 35 Kristallstruktur von **52** in PPAR γ . Zwei Moleküle **52** interagieren mit unterschiedlichen Bindungsstellen. Ein Molekül geht die kanonische Bindung unter Beteiligung von Tyr473, His449, Gln286 und Ser289 ein. Das zweite Molekül **52** bindet in der alternativen Bindungsstelle. Dabei entsteht eine Wasserstoffbrückenbindung der Carbonsäure mit Arg288 und eine weitere über das sekundäre Amin mit Glu259. In Rot Helix 12 in aktiver Konformation.

zwei starke Wasserstoffbrückenbindungen mit Arg288 und Glu259 eingeht (Abbildung 35). Diese Entdeckung eröffnet völlig neue Forschungsmöglichkeiten an einem der am besten untersuchten nukleären Rezeptoren. **52** könnte sich als Startpunkt für eine selektive Adressierung der zweiten Bindestelle erweisen. Ein selektiv allosterischer PPAR γ -Ligand wäre von großem Nutzen für die Erforschung PPAR-vermittelter Effekte und könnte den Grundstein für eine neue Klasse von PPAR γ -Modulatoren legen.

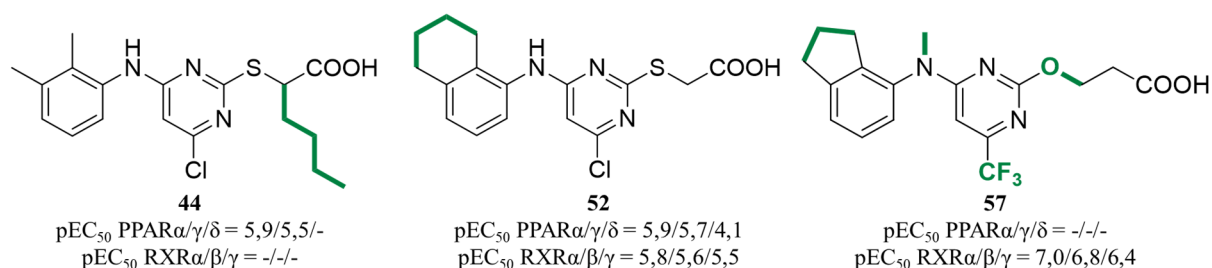


Abbildung 36 Derivate von Wy14,643 und ihre Selektivitätsprofile. Aus dieser Arbeit geht ein Set von drei Derivaten mit minimalen Änderungen und identischen Chemotyp aber mit deutlich unterschiedlicher Aktivität hervor. Dieses Set kann als pharmakologisches Werkzeug eingesetzt werden um die Interaktionen und die Synergien von PPAR und RXR zu entschlüsseln.

Aus dieser Arbeit konnte nicht nur eine mechanistische Erklärung für die ungewöhnlichen Effekte der weitverbreiteten Referenzsubstanz Wy14,643 geliefert werden, es entstanden auch drei strukturell eng verwandte Substanzen (Abbildung 36), die durch kleinste Strukturvariationen spezifische Selektivität und Potenzsteigerung erzielten. Diese drei Substanzen als Set können als pharmakologische Werkzeuge dienen, um den Einfluss und die Synergien durch

RXR- und PPAR-Modulation zu verstehen und eventuell neue Therapieoptionen zu entwickeln. Sie ermöglichen es z.B. in einem Tiermodell PPAR-selektiv, RXR-selektiv oder dual zu intervenieren, die Effekte zu vergleichen und dabei die Wahrscheinlichkeit von substanzspezifischen Nebeneffekten zu minimieren, da alle Verbindungen auf dem gleichen Chemotyp beruhen.

Mit dem RXR-selektivem Derivat **57** wurde ein derzeit einmaliger RXR-Agonist entwickelt. Seine besonderen Strukturmerkmale, die herausragenden physikochemischen Eigenschaften und die vorteilhaften pharmakokinetischen Daten machen diese Substanz zu einem der fortschrittlichsten RXR-Agonisten, die momentan verfügbar sind. Basierend auf den beschriebenen *in vitro* und *in vivo* Daten und den vorliegenden Kristallstrukturen, die weitere Optimierungspositionen aufdecken, hat diese Arbeit einen großen Schritt in Richtung einer neuen Generation von verbesserten RXR-Modulatoren und damit der Erschließung neuer RXR-vermittelter Therapieoptionen gemacht.

Diese Ergebnisse wurden veröffentlicht in den Publikationen:

Pollinger, J.; Merk, D. Therapeutic Applications of the Versatile Fatty Acid Mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, 27 (4), 517–525.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1272578>.

Eigener Beitrag: Literaturrecherche und Verfassen des Manuskripts.

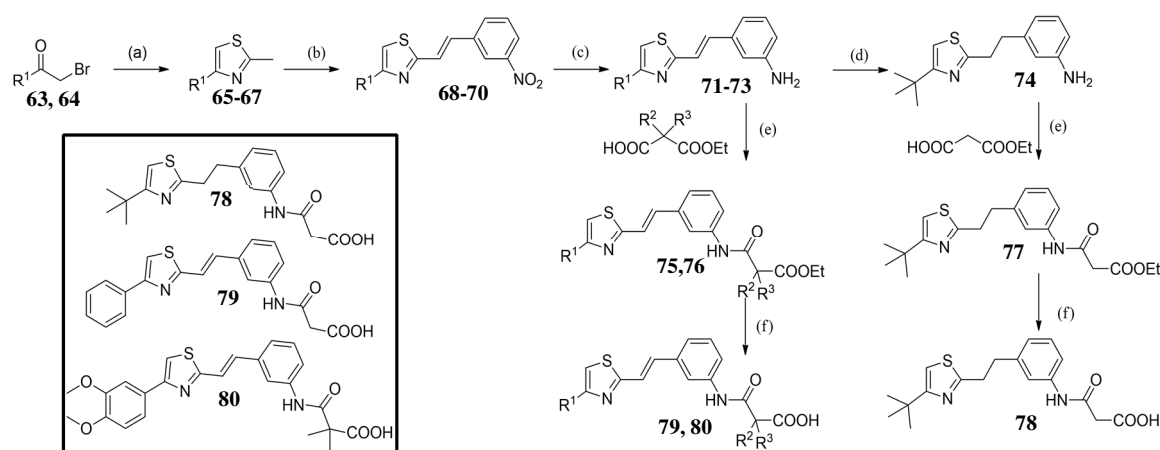
Pollinger, J.; Gellrich, L.; Schierle, S.; Kilu, W.; Schmidt, J.; Kalinowsky, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heering, J.; Proschak, E.; Merk, D. Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (4), 2112–2126. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01848>.

Eigener Beitrag: Synthese der neuen Verbindungen, vollständige Charakterisierung aller Substanzen durch Gal4-Hybrid-Reporterassays sowie Durchführung des PPAR-Volllängenassays, der Quantifizierung der RXR-regulierten mRNA Expression und Toxizitätsmessung. Verfassen des Manuskripts.

3.3 Computergestützte selektive Optimierung der Nebenaktivität von Cinalukast an PPAR α

Die systematische Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, wie sie in den beiden vorherigen Projekten durchgeführt wurde, ist mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden. Design, Synthese und biologische Charakterisierung einer großen Anzahl von Derivaten, die in ständiger Rückkopplung mit Veränderungen in der biologischen Aktivität entstehen, ist sowohl zeit- als auch kostenintensiv. Um diesem Nachteil zu begegnen, können computergestützte Methoden Anwendung finden, mit deren Hilfe die Anzahl an tatsächlich hergestellten Derivaten deutlich reduziert werden kann³²⁵. Eine solche Strategie sollte auf das Fettsäuremimetikum³⁰¹ Cinalukast³²⁶ (**20**) angewendet und mit dem Prinzip der selektiven Optimierung von Nebenaktivitäten (*selective optimization of side-activities*, SOSA) verbunden werden, bei der ein zugelassener oder experimenteller Wirkstoff hinsichtlich seiner Nebenaktivität optimiert und gleichzeitig seine ursprüngliche Hauptaktivität reduziert oder eliminiert wird^{304,305}. Die meisten biologisch aktiven Moleküle besitzen neben ihrer gewünschten Aktivität auch noch (schwache) Interaktionen mit anderen Zielstrukturen. Im Fall zugelassener Wirkstoffe mit solchen Nebenaktivitäten bietet sich der Vorteil, dass sie bereits hinsichtlich physikochemischer Eigenschaften wie z.B. Löslichkeit optimiert sind. Daher ist die Wahrscheinlichkeit, dass von ihnen abgeleitete, neue Moleküle diese Eigenschaften teilen, deutlich höher als bei anderen Methoden zur Leitstrukturidentifikation^{304,305}.

Für dieses Projekt wurde der CysLT₁R-Antagonist Cinalukast^{326,327} als Modellsubstanz (**20**, Abbildung 37) ausgewählt, da in Vorarbeiten eine schwache Aktivierung von PPAR α beobachtet wurde ($EC_{50} = 10 \pm 2 \mu\text{M}$, $5,3 \pm 0,6$ max. vielfache Aktivierung) und die Synthese^{302,303} dieses Moleküls und seiner Derivate (vgl. Schema 4) mit fünf bis sechs Schritten, niedrigen Ausbeuten und der Bildung von Stereoisomeren aufwändig ist. Eine systematische SAR-Untersuchung wäre daher langwierig und kostenintensiv, sodass Cinalukast ein ideales Beispiel für eine computergestützte Optimierung eines Fettsäuremimetikums darstellt.



Schema 4 Synthese der Cinalukast-Derivate **78**, **79** und **80**. (a) Thioacetamid, DMF, reflux, 4 Std, 74-82%; (b) 3-Nitrobenzaldehyd, Natriumacetat, Eisessig, reflux, 10 Std, 14-24%; (c) SnCl₂, Ethanol, 65 °C, 2-3 Std, 55-66%; (d) H₂ (1 bar), Pd(C), rt, 18 Std, 94%; (e) EDC·HCl, 4-DMAP, CHCl₃, 60 °C, 12-16 Std, 14-28%; (f) LiOH, THF/H₂O, rt, 12 Std, 21-71%; Bearbeitet nach [344], Genehmigung von Wiley (2019) erteilt.

Zur Vorhersage potentieller Strukturoptimierungen zur Steigerung der Potenz an PPAR α wurde die HYDE-Software von BioSolveIT genutzt, bei der die Energie, die in Folge einer Bindung frei wird, aus den entstehenden Wasserstoffbrückenbindungen und aus der Verdrängung von Wasser aus der Bindestelle kalkuliert wird³²⁸. Diese Methode erstellt eine Energiebilanz, die

sich sowohl aus Veränderungen der Enthalpie als auch der Entropie ergibt³²⁸. Dieser Ansatz hat sich bereits für lipophile Bindungsstellen als geeignet erwiesen^{329,330} und wurde deswegen als Basis für die Untersuchung der Ligandbindung an PPAR α ausgewählt. Die Software benötigt eine Kristallstruktur im Komplex mit einem Liganden. Die Güte der Vorhersage nimmt zu, je ähnlicher der vorhandene Ligand mit den zu untersuchenden Molekülen ist. Als Vorlage wurde die Kristallstruktur PDB ID 4CI4³³¹ ausgewählt, da der hier co-kristallisierte Ligand (**81**, Abbildung 37) ein Fettsäuremimetikum darstellt, das ähnlich wie Cinalukast über aromatische Ringe verfügt, bei deren Verknüpfung eine Doppelbindung beteiligt ist.

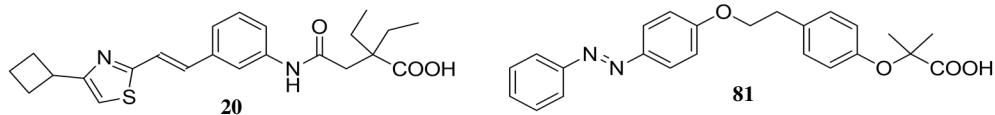


Abbildung 37 Cinalukast (**20**) und der kokristallisierte Ligand **81** aus der Kristallstruktur, die als Vorlage genutzt wurde. Je ähnlicher die Leitstruktur der Vorlage ist, umso zuverlässiger werden die Vorhersagen, da davon ausgegangen wird, dass sich der Rezeptor in einer ähnlichen Weise verhält.

Für sämtliche Software, die nachfolgend erwähnt wird, wurden die voreingestellten Standardeinstellungen übernommen. Sofern von den Standardwerten abgewichen wurde, werden die Änderungen explizit im Text erwähnt.

Zuerst wurde die Eignung und Übertragbarkeit der HYDE-Vorhersage für PPAR α überprüft. Hierfür wurden 31 einfach zugängliche Derivate von Cinalukast manuell erstellt und ihre 3D-Struktur mittels FlexX³³², einer Software zur Generierung der möglichen Konformationen eines Moleküls, im LeadIT-Programm³³³ für die in der Kristallstruktur vorhandene Bindungstasche optimiert (maximal 200 Konformationen pro Derivat). Die Konfiguration mit dem günstigsten FlexX-Wert wurde anschließend mittels HYDE in SeeSAR³³⁴ auf die vorhergesagte freie Energie untersucht.

Die Derivate enthielten Variationen in jedem Bereich der Leitstruktur, so wurden der Cyclobutanrest mit unterschiedlichsten Strukturelementen ersetzt, die Geometrie der Struktur durch Verschiebung der Verknüpfung – aus der *meta*- in die *para*-Position – untersucht und die saure Kopfgruppe mit unterschiedlichen Kettenlängen variiert. Außerdem wurde exemplarisch versucht die saure Kopfgruppe durch andere Struktur motive wie z.B. einem Amid oder einem Nitril zu ersetzen.

Aus dieser ersten Überprüfung ergaben sich wichtige Erkenntnisse für die anschließende prospektive Validierung: zum einen ist die Geometrie des Liganden entscheidend – die *para*-Position wird nicht toleriert – zum anderen ist im Bereich des Cyclobutanrestes eine größere Variation möglich. Auch die Reduktion der Doppelbindung wird toleriert. Für eine starke Interaktion ist die Carbonsäure als Kopfgruppe essentiell, was aufgrund der Ähnlichkeit zu Fettsäuren³⁰¹ ein erwartbares Ergebnis war. Aus diesen Erkenntnissen wurden zwei Derivate synthetisiert und ihre Aktivität im Assay bestimmt. Unter Einbeziehung der Leitstruktur ergab sich keine direkte Korrelation, aber die Reihenfolge der Potenzen wurde von der Software korrekt vorhergesagt, insbesondere wenn man nicht nur den EC₅₀-Wert, sondern auch die maximale Aktivierung berücksichtigt (Abbildung 38).

Nachdem sich HYDE als geeignet erwiesen hatte, die Aktivität qualitativ richtig vorherzusagen, wurde basierend auf den Beobachtungen der Voruntersuchungen eine kombinatorische Bibliothek aus fast 8000 Cinalukast-Derivaten erstellt. Die Variationen beschränkten sich dabei auf das lipophile Ende und verschiedenste Veränderungen (linear und verzweigt; verbunden über

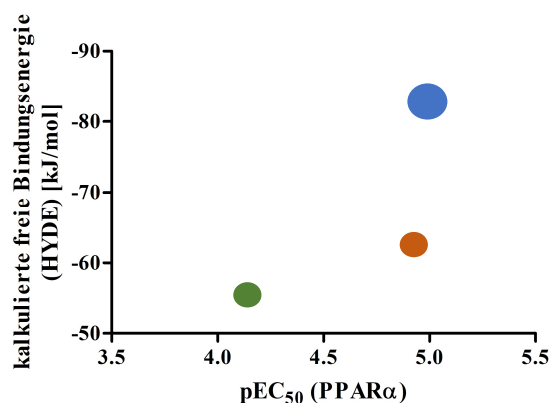


Abbildung 38 Korrelation der kalkulierten freien Bindungsenergie mit den in vitro ermittelten EC₅₀-Werten. Es ergab sich kein linearer Zusammenhang, allerdings wurde mittels HYDE eine qualitativ richtige Vorhersage getroffen. Die Größe der Punkte gibt die max. vielfache Aktivierung im Assay qualitativ wieder. Blau = Cinalukast; Grün = 78; Orange = 79

in die Bindungstasche platziert und energetisch minimiert. Die freie Bindungsenergie wurde mittels eines HYDE-Knotens („Assess Affinity with HYDE in SeeSAR“) kalkuliert. Um in Folge dieser Variationen nicht zu lipophile Derivate zu erhalten (Einhaltung des SOSA-Prinzips), wurden die entstandenen Moleküle, die einen berechneten logP > 4 aufweisen, aus der Auswertung entfernt. Die Top 5 Derivate aus diesem Ranking zeigten berechnete freie Bindungsenergien, die vergleichbar mit der Leitstruktur waren (**20**: - 83 kJ/mol vs Top5: - 85 bis - 69 kJ/mol). Die Derivate sollten also vergleichbare Affinitäten aufweisen, allerdings mit einem eventuell optimierten Bindungsmodus.

Der zweite wichtige Teil eines erfolgreichen SOSA-Projektes besteht in der Reduktion der ursprünglichen Hauptaktivität. Da es zum damaligen Zeitpunkt noch keine Kristallstruktur des G-Protein gekoppelten CysLT₁R in der PDB gab, wurde ein ligandenbasierter Ansatz über maschinelles Lernen gewählt. In der ChEMBL³³⁹- Datenbank standen ein großer Datensatz von CysLT₁R-Liganden mit sowohl hoher Potenz (215 Moleküle mit IC₅₀ < 1 μ M) als auch viele Moleküle mit nachgewiesener niedriger Aktivität oder Inaktivität an diesem Rezeptor (904 Moleküle, IC₅₀ > 1 μ M oder inaktiv) zur Verfügung. Mit diesem Datensatz wurde in KNIME mittels RDKit-Knoten³³⁷ ein Random Forest Modell trainiert. Dabei entwickelt der Algorithmus basierend auf einem Trainingsset mit bekannten Eigenschaften (in diesem Fall die IC₅₀-Klassifizierung als hoch potent oder schwach potent) eine eigenständige Unterscheidungsgrundlage, um diese beiden Gruppen voneinander zu trennen. Als Basis für die Unterscheidung wurden unterschiedliche molekulare Deskriptoren, sogenannte „Fingerabdrücke“ (*fingerprints*), genutzt (Morgan³⁴⁰: Radius 2, NumBits 1024; MACCS³⁴¹ und AtomPair³⁴²: einbezogene Bindungen: 1-30, NumBits 1024), die die Molekülstruktur in einem für den Computer verarbeitbaren Format wiedergeben. Um die Güte dieser Deskriptoren und Vorhersagen zu überprüfen, wurde eine Cross-Validierung vorgenommen. Dafür wurden die Datensätze in jeweils zwei gleich große Sets aufgeteilt (Gruppe 1a+1b bzw. Gruppe 2a + 2b). Eine Kombination (1a+2a) aus der hoch potenten und schwach potenten Gruppe wurde zum Training des Random Forest, die andere (1b+2b) zur Überprüfung genutzt. Anschließend wurden Trainings- und Testgruppen vertauscht und die Methode wiederholt. Aus den Ergebnissen dieser Validierung ließen sich die Präzision, die Selektivität und die Non-Error-Rate bestimmen³⁴³. Alle

Amide oder sekundäre Amine) an der sauren Kopfgruppe. Die Kalkulation der energetisch günstigsten Derivate wurde mittels eines selbstkreierten Arbeitsablaufs im Konstanz Information Miner (KNIME)^{335,336} mithilfe der frei zugänglichen RDKit³³⁷ Software/Knoten und den KNIME-Knoten von BioSolveIT³³⁸ erstellt. Im Rahmen des Arbeitsablaufs wurden zunächst die SMILES-Codes in 3D-Strukturen umgewandelt („Generate 3D Coordinates“), die 3D-Struktur energetisch minimiert (RDKit „Optimize Geometry“ Voreinstellung: MMFF94) und basierend auf FlexX in einem LeadIT-Knoten („Compute LeadIT Docking“, BioSolveIT, max. 500 Konformationen, 4CI4³³¹ als Vorlage) automatisch

Deskriptoren ergaben sehr gute Werte³⁴⁴, sodass alle für die eigentliche Untersuchung genutzt wurden. Hierfür wurde die CysLT₁R-Aktivität von Cinalukast sowie der Top 5 Derivate aus der PPAR α -Optimierung mithilfe des Random Forest Modells berechnet. Cinalukast wurde korrekt als hochpotenter CysLT₁R-Antagonist vorhergesagt und alle Derivate der Top 5 als nur schwache Antagonisten charakterisiert.

Basierend auf diesen vielversprechenden Vorhersagen sollte zum Abschluss der prospektiven Anwendung ein Cinalukast-Derivat hergestellt und biologisch charakterisiert werden.

Aufgrund der Verfügbarkeit der Chemikalien und der sehr geringen Unterschiede in der vorhergesagten Aktivität der Top 5 Derivate wurde das Cinalukastanalog mit Rang 3 synthetisiert und charakterisiert (**80**, Schema 4). **80** besaß einen HYDE-Wert von - 81 kJ/mol (Cinalukast: - 83 kJ/mol) und zeigte bei einem EC₅₀-Wert von 8,1 \pm 0,1 μ M (Cinalukast: 10 \pm 2 μ M) eine maximale vielfache Aktivierung von 13,7 \pm 0,1 (Cinalukast: 5,3 \pm 0,6) im Vergleich zur Grundaktivität, bestimmt über den Gal4-Hybrid-Reportergenassay. **80** besaß damit eine sehr ähnliche Potenz an PPAR α wie die Leitstruktur, allerdings ergab sich hier aus der Bindung eine deutlich stärkere Aktivierung (Abbildung 39).

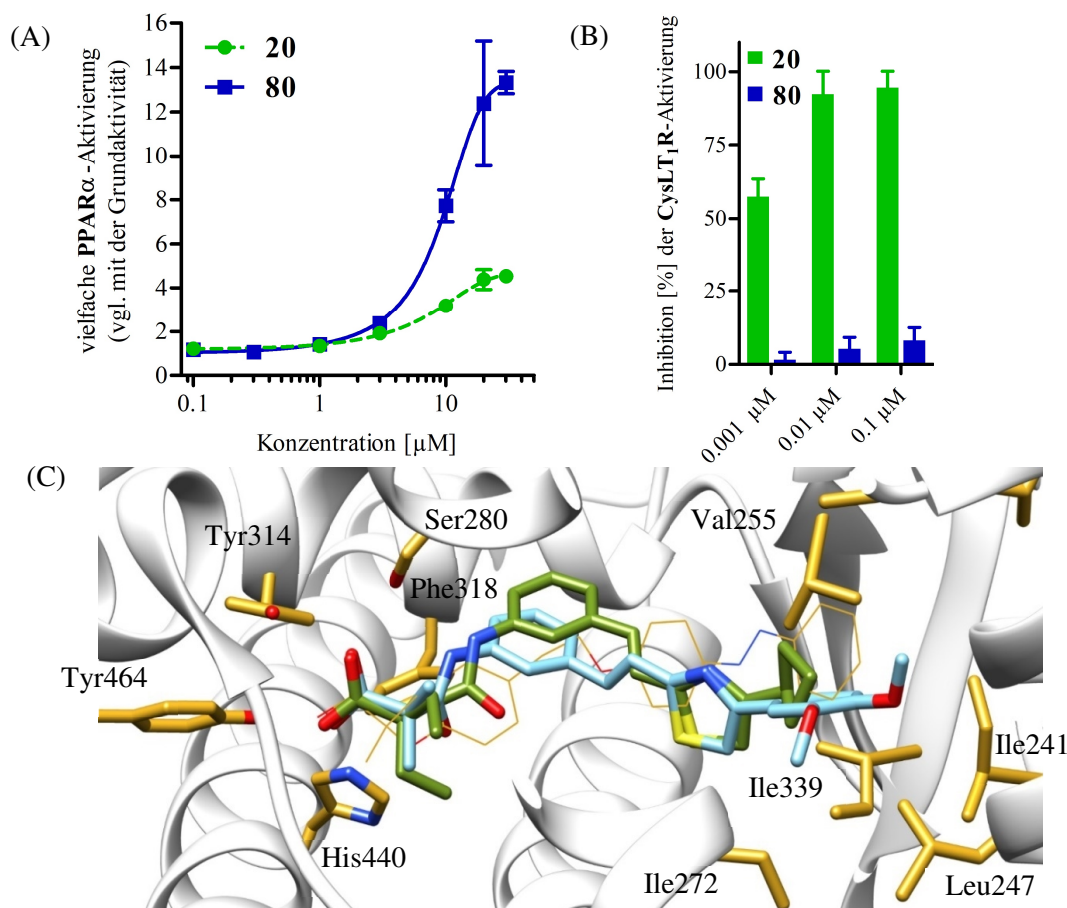


Abbildung 39 Ergebnisse des computergestützten SOSA-Ansatzes. (A) Die Leitstruktur Cinalukast **20** induziert nur eine schwache Aktivierung im Gal4-Hybrid-Reportergenassay, das optimierte Derivat **80** zeigt eine deutliche Steigerung der Aktivierungseffizienz. HEK293T Zellen, Transfektion mit Lipofectamin LTX, Normierung mittels konstitutiver Kontroll-Luciferase. Ergebnisse sind MW \pm S.E.M, n \geq 3 (B) **80** inhibierte den CysLT₁R nur noch minimal, während **20** schon im niedrigen nanomolaren Bereich seine maximale Wirkung entfaltet. CHO-K1-Zellassay, Antagonismus von 0,1 nM Leukotrien D₄, Ergebnisse dargestellt als MW \pm S.E.M. n = 3; (C) Der Vergleich der postulierten Bindungsmodi von **20** (grün) und **80** (blau) ergibt eine hohe Übereinstimmung. Durch die kürzere Kette ist das Styrylthiazol-Kernfragment von **80** tiefer in die Bindetasche gezogen und der Dimethoxyphenylring am lipophylen Ende füllt den lipophilen Bereich großzügiger aus. In dünnen Linien ist der kokristallisierte Ligand **81** aus der Kristallstruktur angegeben. Bearbeitet aus [344]; Genehmigung von Wiley (2019) erteilt.

Am Vergleich der postulierten Bindemodi von Cinalukast und **80** (vgl. Abbildung 39) ließ sich erkennen, dass **80** durch die Veränderung der Kopfgruppe das Kernfragment tiefer in den lipophilen Bereich drückt und gleichzeitig der vergrößerte Dimethoxyphenylrest die lipophile Bindetasche am Ende vorteilhaft ausfüllt, was eine Erklärung für die erhöhte Aktivierungseffizienz sein könnte.

Die Bestimmung des CysLT₁R-Antagonismus erfolgte extern durch den kommerziellen Anbieter Cerep³⁴⁵, wobei in einem CHO-K1-basiertem Zellassay der Ca²⁺-Influx als Resultat des Antagonismus der Testsubstanzen bei 1, 10 und 100 nM gegenüber 0,1 nM des Agonisten Leukotrien D₄ gemessen wird. Die Ergebnisse bestätigten für Cinalukast einen geschätzten IC₅₀-Wert im einstelligen nanomolaren Bereich, während das optimierte Derivat nur einen schwachen Antagonismus mit einem geschätzten IC₅₀-Wert von deutlich über 100 nM zeigte (Abbildung 39). Zusätzlich ist es gelungen, die Löslichkeit (**20**: 1,1 mg/L vs. **80**: 21,7 mg/L) und die Lipophile (**20**: logP = 2,2 vs. **80**: logP = 1,6) der optimierten Struktur in einem gewünschten Bereich zu erhalten³⁴⁴ und somit dem SOSA-Konzept in allen Belangen gerecht zu werden.

Im Rahmen dieses Projekts wurde eine Methode zur computergestützten Optimierung von Fettsäuremimetika als Liganden nukleärer Rezeptoren beispielhaft am PPAR α -Rezeptor etabliert und prospektiv angewendet. Mit den entwickelten Arbeitsabläufen gelang es, mit nur drei synthetisierten Derivaten eine Optimierung der Leitstruktur sowohl für ihre neue Zielstruktur (erhöhte Aktivierungseffizienz) zu erreichen, als auch die ursprüngliche Hauptaktivität zu minimieren. Diese erfolgreiche Fallstudie zum SOSA-Konzept in Kombination mit *in silico* Methoden etabliert diese Vorgehensweise als hilfreiche Werkzeuge, um mit reduziertem zeitlichen, synthetischen und finanziellem Aufwand eine frühe Strukturoptimierung zu ermöglichen. Die entwickelten und erprobten Arbeitsabläufe sind nun auf verschiedenste Projekte anwendbar.

Diese Ergebnisse wurden veröffentlicht in der Publikation:

Pollinger, J.; Schierle, S.; Neumann, S.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Merk, D. Computer-assisted Selective Optimization of Side-Activities - from Cinalukast to a PPAR α Modulator. *ChemMedChem* **2019**, *14* (14), 1343–1348. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900286>.

Eigener Beitrag: Etablierung des computergestützten Arbeitsablaufs, Design der virtuellen Cinalukast-Analoga für die Untersuchungen. computergestützte Untersuchung und Klassifizierung der Analoga in Bezug auf ihre PPAR α agonistischen Eigenschaften, sowie computergestützte Klassifizierung der Analoga in Bezug auf ihre Eigenschaften als CysLT₁-Antagonisten. Durchführung der Reporterassays.

4. Zusammenfassung

Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren umfasst 48 ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, die über die Regulation der Genexpression an verschiedensten (patho-)physiologischen Vorgängen wie Metabolismus, Entzündungen und Zelldifferenzierung beteiligt sind^{1,2,5}.

Die Modulation dieser Rezeptoren durch niedermolekulare Verbindungen führt durch die veränderte Genexpression zu einem langanhaltenden Effekt, was sie in den Blickpunkt der Arzneistoffentwicklung gerückt hat. In einigen Indikationen, besonders bei metabolischen Erkrankungen, haben Modulatoren von nukleären Rezeptoren bereits Zulassungen erhalten oder befinden sich in späten Phasen der klinischen Entwicklung⁷⁻⁹.

Im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer Demenz (AD) und Multiple Sklerose (MS) werden mehrere nukleäre Rezeptoren als potentielle Zielstrukturen untersucht und offenbaren teilweise vielversprechende neue Therapieansätze^{10,11}. Die Krankheitsbilder der AD und MS verbindet, dass bei beiden eine lokale neuronale Entzündung zur Pathophysiologie beiträgt und es zu einem Verlust von funktionalen Nervenzellen kommt^{10,243,245}. Während bei der MS die auto-immune Demyelinisierung der Neurone im Vordergrund steht^{239,242}, gehen bei der AD primär cholinerge Neurone verloren. Als Ursache der AD stehen insbesondere zytotoxische Ablagerungen von β -Amyloid ($A\beta$) zur Diskussion^{239,241}. Für diese pathophysiologischen Symptomkomplexe zeigten sich in den letzten Jahren besonders für die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) und Retinoid X Rezeptoren (RXRs) positive Einflüsse in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

Für die PPARs wird vor allem ein regulierender Einfluss auf die neuronale Entzündung postuliert, sowohl auf Ebene relevanter Zytokine, als auch durch die Kontrolle von Zelldifferenzierung und -aktivierung^{166,187,189,198}. Außerdem wurde für PPAR γ wiederholt ein positiver Einfluss auf Bildung und Abbau von $A\beta$ nachgewiesen,^{254,255} wodurch es besonders für die AD als molekulare Zielstruktur relevant scheint.

Auch bei den RXRs steht im Bereich der AD, eine Reduktion der neuronalen Entzündung und die Modulation von Bildung und Transport von $A\beta$ im Fokus. Wichtige Proteine im Zusammenhang mit $A\beta$, wie das Apolipoprotein E (ApoE), stehen transkriptionell unter starkem Einfluss der RXRs, weshalb deren Modulation verstärkt als Therapieoption getestet wird²⁶¹. Dass die RXRs eine Sonderstellung als neue Zielstrukturen besitzen, besonders für die MS, verdanken sie allerdings bemerkenswerten Berichten über potentiell neuroregenerative Effekte^{11,12,283,287}. RXRs üben einen bedeutenden Einfluss auf die Differenzierung und Aktivierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OPCs) aus, die an der Bildung der Myelinschicht beteiligt sind^{288,289}. Sollte es möglich sein, über die gezielte Aktivierung der RXRs die Remyelinisierung der Neurone zu fördern, könnte das eine regenerative Therapie der MS ermöglichen¹¹.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Charakterisierung von neuen Liganden der genannten nukleären Rezeptoren. Besonders im Fokus standen dabei die RXRs, da hier sowohl ein großes Potential bei neurodegenerativen Erkrankungen vermutet wird, als auch ein großer Bedarf an neuen, innovativen Liganden besteht. Die aktuell zur Verfügung stehenden Modulatoren besitzen keine Subtypenselektivität und auch nur geringe Subtypenpräferenz. Die Entwicklung von subtypenselektiven RXR-Agonisten wird dadurch erschwert, dass die Ligandbindestellen aller drei RXR-Subtypen aus den identischen Aminosäuren aufgebaut sind⁵⁶.

Ein weiteres Hindernis für die zukünftige Charakterisierung der postulierten Effekte und der weiteren Erschließung der RXRs als therapeutische Zielstrukturen liegt in den unvorteilhaften physikochemischen Eigenschaften der bisher zu Verfügung stehenden Modulatoren⁵⁸. Besonders das Bexaroten (**1**, Abbildung 41), der einzige synthetische RXR-Agonist mit einer Zulassung als Arzneistoff, besitzt eine geringe Löslichkeit in Wasser (0,3 mg/L) und eine hohe Lipophilie (logP = 4,7). Dementsprechend war ein weiteres Ziel dieser Arbeit eine neue Leitstruktur für RXR-Liganden mit günstigen physikochemischen Attributen zu identifizieren und durch systematische Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) zu selektiven und potenten RXR-Agonisten weiterzuentwickeln, die dem bisherigen Goldstandard Bexaroten überlegen sind.

Zuletzt sollte eine computergestützte Methode zur Optimierung von synthetisch anspruchsvollen Fettsäuremimetika³⁰¹ etabliert werden, um die zeit- und kostenintensiven systematischen SAR-Untersuchungen zu automatisieren.

Ein kürzlich publizierter RXR-Ligand (**18**, Abbildung 40)²⁹¹ stellt mit einer linearen Biphenylstruktur einen völlig neuen Chemotyp für RXR-Agonisten dar. Zudem besitzt er ein ungewöhnliches Aktivitätsprofil: Bei vergleichbaren EC₅₀-Werten (RXR $\alpha/\beta/\gamma$ = 12/12/14 μ M) werden RXR β und γ stark aktiviert, während die Bindung an RXR α nur eine minimale Aktivierung induziert (RXR α : max. 5-fach vs. RXR β/γ : 60- bis 70-fach im Vergleich zur Grundaktivität). Wegen dieses attraktiven Aktivitätsprofils sollten die SAR der Verbindung als RXR-Modulator an allen drei Subtypen untersucht werden, um sowohl selektivitäts- als auch potenzvermittelnde Strukturelemente zu identifizieren.

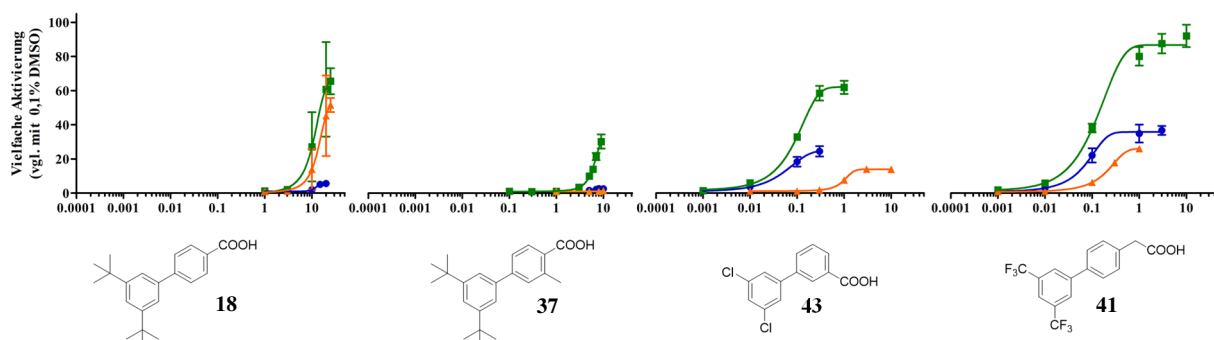


Abbildung 40 Aktivitätsprofil der Leitstruktur **18** und ausgewählter Derivate. Gezielte Optimierungen identifizierten sowohl aktivitätssteigernde als auch selektivitätsfördernde Strukturelemente. Blau = RXR α ; Grün = RXR β ; Orange = RXR γ ; Gal4-Hybrid-Reporterassay; HEK293T, Transfektion mit Lipofectamin LTX, Normierung mittels konstitutiver Kontroll-Luziferase; vielfache Aktivierung in Bezug auf 0,1% DMSO, Ergebnisse dargestellt als MW \pm SD; n \geq 3.

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden 24 Derivate von **18**, bei denen sowohl gezielte strukturelle Veränderungen zur systematischen Untersuchung der SAR als auch die Kombinationen von bevorzugten Strukturmotiven umgesetzt und biologisch charakterisiert wurden. So gelang es nicht nur ein etwa 100-fach potenteres Derivat zu erzeugen (**41**), es wurden auch kritische Strukturmerkmale für eine Präferenz zwischen den drei RXR-Subtypen identifiziert und kombiniert. Ein erster synthetischer RXR β -selektiver Ligand (**37**) konnte ebenso identifiziert werden wie eine Reihe von RXR α - und β -präferenzialer Derivate (**43**) (Abbildung 40).

Zusätzlich wurde erstmals systematisch eine Form der Heterodimerselektivität untersucht. Durch einen Vergleich der Aktivierung in einem LXR/RXR- und einem PPAR γ /RXR-Voll-längensassay konnten Struktur motive für ein unterschiedliches Ansprechen der Heterodimere identifiziert werden. Insbesondere für die Umgehung des LXR/RXR-Heterodimerpaares wurden

kritische Strukturmerkmale entdeckt. Diese Form der Selektivität könnte für die klinische Entwicklung von RXR-Agonisten von großer Bedeutung sein, da hiermit potentielle Nebenwirkungen umgangen werden könnten¹²⁷.

Die Aufklärung der Kristallstruktur eines optimierten Derivats (**41**) in RXR α legte noch weitere Strukturoptimierungen an diesem Ligandentypus nahe, u.a. die Möglichkeit über Cys432 eine kovalente Bindung mit dem Rezeptor zu initiieren.

Diese Studie legt den Grundstein für die Erschließung eines neuartigen Chemotyps, der neue Erkenntnisse über RXR-Subtypenselektivität liefert und mit ersten Einblicken in die SAR der Heterodimerpräferenz demonstriert, dass auch über diese Strategie Fortschritte in Bezug auf die Sicherheit einer therapeutischen RXR Modulation möglich sind.

Wy14,643²⁹² (**19**) wurde erstmals in den 1970er Jahren als Lipidsenker beschrieben und seit der Entdeckung seiner molekularen Zielstrukturen²⁹⁴ – PPAR α und γ – intensiv als Referenzsubstanz, besonders für PPAR α -vermittelte Effekte, genutzt. Dabei wurde durch *in vitro* und *in vivo* Versuche eine Vielzahl von positiven Effekten in verschiedenen Bereichen außerhalb der ursprünglich anvisierten metabolischen Indikationen entdeckt⁴⁷. Durch eine ausgedehnte Literaturrecherche⁴⁷ der Studienlage fielen Effekte auf, die mit dem bis dato bekannten Aktivitätsprofil von **19** nicht ausreichend erklärt werden konnten. **19** zeigte u.a. *in vivo* einen immunmodulierenden Effekt in einem Tiermodell der MS³¹⁷, ebenso wie es die Bildung und Sekretion der mit AD assoziierten A β 42-Plaques dosisabhängig reduzierte³¹⁶. Auf Grundlage der Vielfalt der Beobachtungen, den Ähnlichkeiten zu Effekten, die für RXR-Agonisten beschrieben

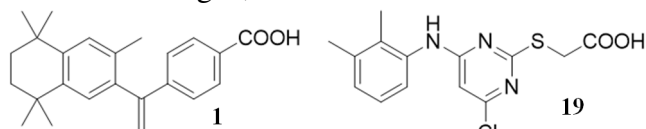


Abbildung 41 Der Goldstandard in der RXR-Forschung Bexarotene (**1**) und die neue Leitstruktur Wy14,643 (**19**). Der direkte Vergleich offenbart die überlegenen Strukturmerkmale.

sind^{313,315} und der strukturellen Nähe von **19** zu **1** (Abbildung 41) entstand die Hypothese, dass **19** als weitere molekulare Zielstruktur die RXRs adressieren könnte.

Nachdem diese Aktivität *in vitro* (Gal4-Hybrid-Reporterassay) bestätigt werden konnte, wurde **19** aufgrund seiner, für einen RXR-Agonisten einzigartigen, physikochemischen Eigenschaften (**19**: Löslichkeit in Wasser = 48,6 mg/L; logP = 1,6) und seiner günstigen Strukturelemente als Startpunkt für eine systematische Charakterisierung seiner SAR an allen drei RXR- und allen drei PPAR-Subtypen ausgewählt. Insgesamt 27 Derivate von **19** wurden charakterisiert und offenbarten gleich mehrere Positionen bzw. Strukturvariationen, die für die Aktivität an den verschiedenen Rezeptoren essentiell, förderlich oder ungünstig waren. Im Zuge der SAR-Aufklärung wurden sowohl ein potenteres PPAR-selektives Derivat (**44**, Abbildung 42) als auch ein panRXR/panPPAR-Agonist (**52**, Abbildung 42) entwickelt, der auf allen sechs untersuchten Rezeptoren eine sehr ausgeglichene Aktivierungseffizienz und Potenz offenbarte. Durch die Kombination aller RXR-favorisierenden Strukturmerkmale, die in der systematischen Untersuchung identifiziert wurden, gelang es, einen selektiven RXR-Agonisten mit annähernd 100-facher Potenzsteigerung (**57**, Abbildung 42) zu entwickeln.

57 demonstrierte potenten RXR-Agonismus in mehreren orthogonalen *in vitro*-Studien und konservierte die günstigen physikochemischen Eigenschaften seiner Leitstruktur. Neben einer umfassenden *in vitro*-pharmakologischen Charakterisierung, wurden auch die pharmakokinetischen Parameter *in vivo* bestimmt. **57** offenbarte dabei nicht nur eine hohe Bioverfügbarkeit nach einmaliger oraler Gabe, auch die Halbwertszeit lag mit etwas über vier Stunden in einem

günstigen Bereich. Nach zwei Stunden wurden im ZNS der Mäuse Konzentrationen von **57** gemessen, die für eine RXR-Aktivierung ausreichend wären.

Somit resultierte aus dieser Arbeit mit **57** ein hochpotenter RXR-Agonist mit einzigartigen Charakteristika, der dem Goldstandard Bexaroten in seinen physikochemischen Eigenschaften deutlich überlegen ist. Die Co-Kristallstruktur der LBD von RXR α im Komplex mit **57** zeigt zunächst eine ähnliche orthosterische Bindung, vergleichbar mit der Bindung des Bexarotens. Ausgehend vom zentralen Pyrimidinkern offenbart sich ein günstiger Winkel, für die Adressierung von Cys432 zur Etablierung einer kovalenten Bindung. Zusätzlich zeigt die Kristallstruktur ungenutzten Raum in der Bindestelle im Bereich des 4-Indanamins und lässt eine Vergrößerung des Trifluoromethylsubstituenten als vorteilhafte Strukturoptimierung erscheinen.

Auch für den panRXR/panPPAR-Agonisten **52** gelang die Kristallisation im Komplex mit der LBD von PPAR γ . Diese Struktur zeigte, dass **52** zweifach in der LBD bindet und ein Molekül dabei isoliert in einer alternativen Bindungstasche von PPAR γ vorliegt. Diese Kristallstruktur könnte als Basis für die Entwicklung selektiver Liganden der alternativen PPAR γ -Bindestelle dienen und damit eine neue Klasse von PPAR γ -Agonisten begründen.

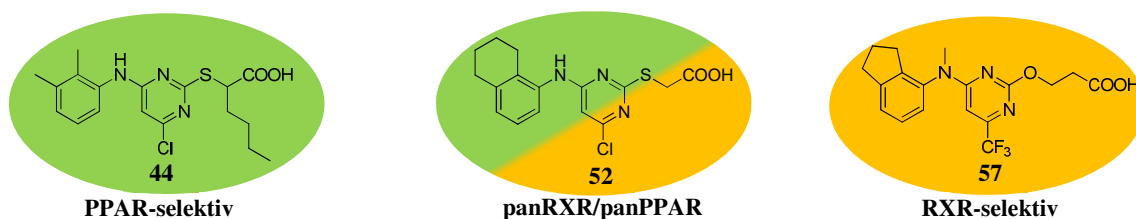


Abbildung 42 Optimierte Derivate von **19** mit selektivem und dual-aktivem Aktivitätsprofil.

Neben dem in **52** und **57** liegenden Potential stellt das in dieser Studie entwickelte Set aus drei Substanzen gleichen Chemotyps mit deutlich unterschiedlichen pharmakodynamischen Eigenschaften – einem PPAR-selektiven, einem panRXR/panPPAR dual-aktiven und einem RXR-selektiven Derivat – (Abbildung 42) wertvolle Werkzeuge zur Entschlüsselung des Zusammenspiels zwischen den PPARs und den RXRs dar.

Die systematische Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und die darauf basierende Optimierung einer Leitstruktur, wie sie in den vorangegangenen Projekten betrieben wurde, benötigt häufig eine hohe Anzahl an Derivaten. Da diese idealerweise nacheinander nur minimale strukturelle Variationen beinhalten sollten, um valide Aussagen treffen zu können, kann dies, je nach Komplexität der Leitstruktur, ein zeit- und kostenintensiver Ansatz sein. Im dritten Projekt dieser Arbeit wurde daher ein Ansatz verfolgt, diese negativen Aspekte einer systematischen Strukturoptimierung mithilfe eines computergestützten Arbeitsablaufs³²⁵ zu umgehen. Diese Modellstudie sollte prüfen, ob auf diesem Weg die Anzahl an tatsächlich synthetisierten Derivaten reduziert werden kann. Als Beispiel diene das Fettsäuremimetikum³⁰¹ Cinalukast^{326,327} (**20**, Abbildung 43), das als Cysteinyleukotrienrezeptor 1 (CysLT₁R)-Antagonist zugelassen ist, aber zusätzlich eine Nebenaktivität an PPAR α ($EC_{50} = 10 \pm 2 \mu\text{M}$; maximal 5-fache

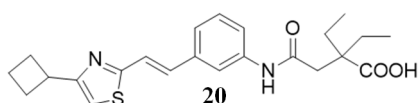


Abbildung 43 CysLT₁R-Antagonist Cinalukast (**20**) der aufgrund seiner PPAR α -modulatorischen Nebenaktivität als Fallstudie zur computergestützten Strukturoptimierung ausgewählt wurde

Aktivierung) offenbarte. Gemäß dem Konzept der selektiven Optimierung von Nebenaktivitäten (SOSA)³⁰⁵, sollte die Aktivität von **20** an PPAR α mit dem computergestützten Verfahren optimiert werden. Da die Synthese von **20** mit niedrigen Ausbeuten und der Bildung von Stereoisomeren

verbunden ist, eignet sich die Verbindung als idealer Kandidat für eine Fallstudie zur computer-gestützten Strukturoptimierung.

Die Vorhersagequalität des Verfahrens und der ausgewählten Software (SeeSAR³³⁴, FlexX³⁴⁶ und LeadIT³³³ von BioSolveIT, St. Augustin, Deutschland) wurde durch die Charakterisierung zweier synthetisch vergleichsweise einfach zugänglicher Derivate überprüft und bestätigt. Im Anschluss wurde ein automatisierter Arbeitsablauf kreiert, durch den eine kombinatorische Bibliothek aus annähernd 8000 Derivaten von **20** generiert und auf ihre vorhergesagte PPAR α -Aktivität untersucht wurde.

Für die erfolgreiche Anwendung eines SOSA-Ansatzes musste allerdings nicht nur die Nebenaktivität optimiert werden, es bedurfte auch einer Verringerung der ursprünglichen Hauptaktivität. Die Top5 gelisteten Derivate aus der PPAR α -Optimierung wurden daher in einem separaten Arbeitsablauf durch ein Random Forest Modell (maschinelles Lernen) hinsichtlich ihrer Aktivität am CysLT₁R klassifiziert und als schwache CysLT₁R-Antagonisten vorhergesagt. Ein exemplarisches Cinalukast-Derivat aus der automatisierten Vorhersage wurde synthetisiert, um die Methode prospektiv zu validieren. Dessen *in vitro*-Charakterisierung bestätigte die erfolgreiche Anwendung des SOSA-Ansatzes und damit die erfolgreiche Etablierung einer computer-gestützten Methode zur automatisierten Optimierung von Fettsäuremimetika.

Die nukleären Rezeptoren RXR und PPAR besitzen großes pharmazeutisches Potential im Hinblick auf neue Therapien neurodegenerativer Erkrankungen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Studien zur Optimierung von Modulatoren dieser Rezeptoren hinsichtlich Aktivierungseffizienz, Potenz und Selektivität durchgeführt. Insbesondere für die RXR-Liganden wurden bedeutende Erkenntnisse zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen erlangt und Strukturmerkmale zur Erzeugung von Subtypenselektivität identifiziert. Mit **41** und Analoga gelang es einen RXR-Modulator Chemotyp mit Subtypenpräferenz zu charakterisieren, ausgehend von den Erkenntnissen dieser Arbeit kann die Entwicklung subtypenselektiver RXR-Liganden mit dem linearen Chemotyp der Biphenyle fortgesetzt und ein tieferes Verständnis der medizinisch-chemischen Einflussmöglichkeiten für implementierte Heterodimerpräferenz erlangt werden. Zudem ergibt sich aus der Kristallstruktur die Möglichkeit, zielgerichtet strukturbasierte Modifikationen einzuführen, die diesen Chemotyp als RXR-Agonisten weiter optimieren.

Durch seine einzigartigen physikochemischen Eigenschaften ist mit **57** ein fortschrittlicher RXR-Agonist entstanden, der für pharmakologische Untersuchungen des therapeutischen Potenzials von RXR-Liganden nützlich sein kann. Besonders im Zusammenspiel mit dem PPAR-selektiven Liganden (**44**) und der panRXR/panPPAR-aktiven Substanz (**52**) sind fundierte mechanistische Untersuchungen möglich, bei denen das Risiko substanzspezifischer Nebeneffekte durch den gemeinsamen Chemotyp deutlich reduziert ist. Basierend auf den beiden Kristallstrukturen ergeben sich weitere Variationsmöglichkeiten zur Optimierung der RXR-agonistischen Fähigkeiten von **57**, ebenso wie sie die Grundlage für eine völlig neue Klasse von PPAR γ -Modulatoren basierend auf **52** liefert.

Zusätzlich zu diesen systematisch entwickelten Verbindungen wurde in einem Modellprojekt beispielhaft gezeigt, dass die strukturelle Optimierung komplexer, fettsäuremimetischer Moleküle mithilfe computergestützter Verfahren zukünftig auch mit geringerem synthetischen und finanziellen Aufwand erreicht werden kann.

5. English Summary

Nuclear receptors (NRs) are ligand-activated transcription factors which translate a small molecule signal into changes in gene expression of a cell². Due to this key regulatory activity, NRs are involved in a variety of physiological and pathophysiological processes like metabolism, inflammation and cell differentiation^{1,2,347} and some of these proteins arise as promising targets for the future therapy of neurodegenerative diseases¹⁰. Encouraging reports ascribe especially the peroxisome proliferator-activated receptors¹⁵⁰ (PPARs) and the retinoid X receptors⁵⁵ (RXRs) great potential for novel treatment strategies for Alzheimer's disease^{10,261} (AD) and multiple sclerosis (MS)^{10,11,348}. Recent observations even indicate the possibility of a regenerative therapy for MS via activation of RXR γ ^{12,283,349}. Available RXR ligands suffer from poor physicochemical properties and insufficient subtype selectivity. To address the urgent need for innovative RXR ligands with improved selectivity and physicochemical properties, this thesis has focused on the synthesis and characterization of novel RXR modulators.

Recently, a novel biphenyl-based RXR agonist chemotype was published²⁹¹ that comprises an unusual linear scaffold. The unique geometry of this ligand was accompanied by an attractive activity profile: although the EC₅₀-values on all three subtypes are comparable (RXR $\alpha/\beta/\gamma$ = 12/12/14 μ M), the molecule induces only a weak RXR α activation (max. 5-fold activation), while RXR β and RXR γ are strongly activated (60 – 70-fold activation). The molecular basis of this subtype-preferential profile has not been studied, however. In this thesis, the structure-activity relationship (SAR) of this RXR ligand chemotype has been studied to identify structural motives to enhance potency and selectivity. Synthesis and characterization of 24 derivatives revealed a variety of crucial structural features for potency and subtype-preference. Fusion of all SAR knowledge enabled the design of a derivative with nearly 100-fold improved potency, a selective RXR β ligand and RXR α/β preferential analogues. Moreover, *in vitro* characterization in human full-length RXR heterodimer assays revealed heterodimer-preferential ligands and characterized structural motifs in this biphenyl-based chemotype to spare activation of the LXR/RXR-heterodimer which might help the development of RXR agonist with reduced side-effects¹²⁷. The X-ray structure of the RXR α ligand-binding domain (LBD) in complex with the optimized derivative **41** (EC₅₀(RXR $\alpha/\beta/\gamma$) = 0.08/0.15/0.22 μ M) has provided crucial insights into the binding mode of the RXR ligand chemotype and can serve as a basis for further structural refinement.

As outlined above, the available RXR agonists are mostly highly lipophilic molecules with poor physicochemical properties like the above described biphenyl scaffold or the only approved synthetic agent bexarotene (**1**)^{57,119}. To overcome this issue, a novel lead structure with improved physicochemical properties was needed. The fatty acid mimetic³⁰¹ Wy14,643²⁹² (**19**) has been described in the 1970s as a potent lipid-lowering agent and later characterized as a dual PPAR α and γ agonist²⁹⁴. Over the past decades, more than 20 patented clinical effects of **19** beyond its original indication in metabolic disorders accumulated, e.g. beneficial activity in a rodent model of MS³¹⁷ and *in vitro*-modulatory effects on the production of β -amyloid. Some of these observations could not be explained by the PPAR-agonistic profile of the molecule⁴⁷. In this thesis, **19** was characterized as an RXR agonist with EC₅₀ values exceeding its previously known activity on the PPARs (EC₅₀(PPAR $\alpha/\gamma/\delta$) = 36/54/- μ M, EC₅₀(RXR $\alpha/\beta/\gamma$) = 9.1/13/31 μ M). **19** provides favourable physicochemical features and was, therefore, employed as starting point of a systematic SAR investigation to decipher its ligand-receptor-interaction

with all three PPARs and RXRs. During this evaluation, a selective PPAR-agonistic derivative was identified (**44**), alongside with a well-balanced markedly improved panRXR/panPPAR agonist (**52**). The co-crystal structure of the panRXR/panPPAR-derivative (**52**) bound to the PPAR γ LBD revealed two molecules of **52** bound to different regions one of which exclusively occupied an alternative binding site. The compound could thus serve as starting point for a novel class of PPAR γ ligands with potentially unique modulatory properties. Furthermore, the combination of all gathered SAR knowledge from 24 systematically varied derivatives enabled the design of a selective RXR agonist **57** ($EC_{50}(\text{PPAR}\alpha/\gamma/\delta) = -/-/ - \mu\text{M}$, $EC_{50}(\text{RXR}\alpha/\beta/\gamma) = 0.09/0.14/0.36 \mu\text{M}$).

Compared to **19**, **57** was nearly 100-fold more potent on all RXRs and simultaneously inherited the favourable physicochemical properties (**57**: aqueous solubility 14.3 mg/L) of the lead structure (**19**). Also, co-crystallization of the RXR α LBD in complex with this RXR-selective derivative **57** succeeded and revealed promising points for future potency-driving modifications. In total, the study has yielded a set of three pharmacological tools with minor structural variance but pronounced differences in their pharmacological profiles. These compounds can serve as unique set of tools to further investigate the (patho-)physiological interplay of RXRs and PPARs.

The systematic optimization of bioactive small molecules, as applied in the studies before, can be an expensive and synthetically challenging endeavour. Striving to follow a faster and cheaper workflow to structurally optimize fatty acid mimetics, a case study for computer-aided selective optimization of side-activities (SOSA) was performed with the cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT $_1$ R) antagonist Cinalukast (**20**) which also comprises weak agonistic potency on PPAR α .

The study employed an automated workflow that was first validated for sufficient prediction quality concerning affinity to PPAR α . Subsequently, a virtual combinatorial library of ~8000 analogues of **20** was computationally generated and ranked for predicted PPAR α affinity. As further aspect of SOSA, top-ranking compounds were additionally classified for predicted antagonism on CysLT $_1$ R by machine learning. Synthesis and *in vitro* characterization of a computationally favoured derivative confirmed successful application of this computer-aided SOSA approach with markedly enhanced PPAR α agonism and diminished potency on CysLT $_1$ R. The successful workflow may now be applicable to structural optimization of other fatty acid mimetic chemotypes.

Taken together, this thesis has obtained deep insights in the structure-activity relationships of two novel RXR ligand chemotypes and achieved remarkable optimization in the field of RXR modulators. The biphenyl-based scaffold has enabled progress in deciphering subtype- and heterodimer-preference as an important basis for future studies. The systematic evaluation and optimization of Wy14,643 (**19**) as nuclear receptor ligand yielded a set of three close analogues with distinct pharmacological profiles, including one of the most advanced RXR agonists currently available. With their superior physicochemical characteristics, these compounds form a new class of RXR ligands which could unlock a variety of novel possibilities in RXR-based research. With the implementation of an automated workflow for the structural refinement of fatty acid mimetics, future optimization endeavours might be performed faster and with less synthetic effort.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Evans, R. M. The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Science* **1988**, *240* (4854), 889–895.
- (2) Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157* (1), 255–266.
- (3) Committee, N. R. N. A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* **1999**, *97*, 161–163.
- (4) Jensen, E. V.; Jacobson, H. I.; Flesher, J. W.; Saha, N. N.; Gupta, G. N.; Smith, S.; Colucci, V.; Shiplacof, D.; Neuman, H. G.; Desombre, E. R.; et al. *Estrogen Receptors in Target Tissues in “Steroid Dynamics: Proceedings of the Symposium on the Dynamics of Steroid Hormones Held in Tokyo, May, 1965” Eds. by G. Pinucs, T. Nakao, J. F. Tait (New York: Academic Press); 1966.*
- (5) Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; et al. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* **1995**, *83* (6), 835–839.
- (6) Volle, D. H. Nuclear Receptors as Pharmacological Targets, Where Are We Now? *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73* (20), 3777–3780.
- (7) Ratziu, V.; Harrison, S. A.; Francque, S.; Bedossa, P.; Lehert, P.; Serfaty, L.; Romero-Gomez, M.; Boursier, J.; Abdelmalek, M.; Caldwell, S.; et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and - δ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **2016**, *150* (5), 1147-1159.e5.
- (8) Gellrich, L.; Merk, D. Therapeutic Potential of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Nucl. Recept. Res.* **2017**, *4*.
- (9) Adorini, L.; Pruzanski, M.; Shapiro, D. Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (17–18), 988–997.
- (10) Skerrett, R.; Malm, T.; Landreth, G. Nuclear Receptors in Neurodegenerative Diseases. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *72*, 104–116.
- (11) Merk, D. Chances and Challenges of RXR γ Targeting for Regenerative Multiple Sclerosis Treatment. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (18), 2411–2413.
- (12) Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Nait Oumesmar, B.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Baron-Van Evercooren, A.; et al. Retinoid X Receptor Gamma Signaling Accelerates CNS Remyelination. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (1), 45–53.
- (13) Hanafy, K. A.; Sloane, J. A. Regulation of Remyelination in Multiple Sclerosis. *FEBS Lett.* **2011**, *585* (23), 3821–3828.
- (14) Aranda, A.; Pascual, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* **2001**, *81* (3), 1269–1304.
- (15) Laudet, V. Evolution of the Nuclear Receptor Superfamily: Early Diversification from an Ancestral Orphan Receptor. *J. Mol. Endocrinol.* **1997**, *19* (3), 207–226.

- (16) Smirnov, A. N. Nuclear Receptors: Nomenclature, Ligands, Mechanisms of Their Effects on Gene Expression. *Biokhimiya* **2002**, *67* (9), 1157–1181.
- (17) Safe, S.; Jin, U. H.; Hedrick, E.; Reeder, A.; Lee, S. O. Minireview: Role of Orphan Nuclear Receptors in Cancer and Potential as Drug Targets. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28* (2), 157–172.
- (18) Raghuram, S.; Stayrook, K. R.; Huang, P.; Rogers, P. M.; Nosie, A. K.; McClure, D. B.; Burris, L. L.; Khorasanizadeh, S.; Burris, T. P.; Rastinejad, F. Identification of Heme as the Ligand for the Orphan Nuclear Receptors REV-ERB α and REV-ERB β . *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14* (12), 1207–1213.
- (19) Solt, L. A.; Burris, T. P. Action of RORs and Their Ligands in (Patho)Physiology. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23* (12), 619–627.
- (20) Yuan, X.; Ta, T. C.; Lin, M.; Evans, J. R.; Dong, Y.; Bolotin, E.; Sherman, M. A.; Forman, B. M.; Sladek, F. M. Identification of an Endogenous Ligand Bound to a Native Orphan Nuclear Receptor. *PLoS One* **2009**, *4* (5).
- (21) Tanabe, O.; McPhee, D.; Kobayashi, S.; Shen, Y.; Brandt, W.; Jiang, X.; Campbell, A. D.; Chen, Y. T.; Chang, C. S.; Yamamoto, M.; et al. Embryonic and Fetal β -Globin Gene Repression by the Orphan Nuclear Receptors, TR2 and TR4. *EMBO J.* **2007**, *26* (9), 2295–2306.
- (22) Lee, Y. F.; Lee, H. J.; Chang, C. Recent Advances in the TR2 and TR4 Orphan Receptors of the Nuclear Receptor Superfamily. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *81* (4–5), 291–308.
- (23) Mohideen-Abdul, K.; Tazibt, K.; Bourguet, M.; Hazemann, I.; Lebars, I.; Takacs, M.; Cianféroni, S.; Klaholz, B. P.; Moras, D.; Billas, I. M. L. Importance of the Sequence-Directed DNA Shape for Specific Binding Site Recognition by the Estrogen-Related Receptor. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2017**, *8* (JUN), 1–17.
- (24) Grossmann, C.; Ruhs, S.; Langenbruch, L.; Mildenerger, S.; Strätz, N.; Schumann, K.; Gekle, M. Nuclear Shuttling Precedes Dimerization in Mineralocorticoid Receptor Signaling. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (6), 742–751.
- (25) Scheepstra, M.; Andrei, S. A.; De Vries, R. M. J. M.; Meijer, F. A.; Ma, J. N.; Burstein, E. S.; Olsson, R.; Ottmann, C.; Milroy, L. G.; Brunsveld, L. Ligand Dependent Switch from RXR Homo- to RXR-NURR1 Heterodimerization. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (9), 2065–2077.
- (26) Giner, X. C.; Cotnoir-White, D.; Mader, S.; Lévesque, D. Selective Ligand Activity at Nur/Retinoid X Receptor Complexes Revealed by Dimer-Specific Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Sensors. *FASEB J.* **2015**, *29* (10), 4256–4267.
- (27) Sablin, E. P.; Blind, R. D.; Uthayaruban, R.; Chiu, H. J.; Deacon, A. M.; Das, D.; Ingraham, H. A.; Fletterick, R. J. Structure of Liver Receptor Homolog-1 (NR5A2) with PIP3 Hormone Bound in the Ligand Binding Pocket. *J. Struct. Biol.* **2015**, *192* (3), 342–348.
- (28) Lazarus, K. A.; Wijayakumara, D.; Chand, A. L.; Simpson, E. R.; Clyne, C. D. Therapeutic Potential of Liver Receptor Homolog-1 Modulators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *130* (3–5), 138–146.
- (29) Sablin, E. P.; Woods, A.; Krylova, I. N.; Hwang, P.; Ingraham, H. A.; Fletterick, R. J.

- The Structure of Corepressor Dax-1 Bound to Its Target Nuclear Receptor LRH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (47), 18390–18395.
- (30) Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. Å.; Laudet, V. Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 950–964.
- (31) Helsen, C.; Claessens, F. Looking at Nuclear Receptors from a New Angle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *382* (1), 97–106.
- (32) Takimoto, G. S.; Tung, L.; Abdel-Hafiz, H.; Abel, M. G.; Sartorius, C. A.; Richer, J. K.; Jacobsen, B. M.; Bain, D. L.; Horwitz, K. B. Functional Properties of the N-Terminal Region of Progesterone Receptors and Their Mechanistic Relationship to Structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *85* (2–5), 209–219.
- (33) Juge-Aubry, C. E.; Hammar, E.; Siegrist-Kaiser, C.; Pernin, A.; Takeshita, A.; Chin, W. W.; Burger, A. G.; Meier, C. A. Regulation of the Transcriptional Activity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor by Phosphorylation of a Ligand-Independent Trans-Activating Domain. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (15), 10505–10510.
- (34) Shalev, A.; Siegrist-Kaiser, C. A.; Yen, P. M.; Wahli, W.; Burger, A. G.; Chin, W. W.; Meier, C. A. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Is a Phosphoprotein: Regulation by Insulin. *Endocrinology* **1996**, *137* (10), 4499–4502.
- (35) Hu, E.; Kim, J. B.; Sarraf, P.; Spiegelman, B. M. Inhibition of Adipogenesis through MAP Kinase-Mediated Phosphorylation of PPARgamma. *Science* **1996**, *274* (5295), 2100–2103.
- (36) Helsen, C.; Kerkhofs, S.; Clinckemalie, L.; Spans, L.; Laurent, M.; Boonen, S.; Vanderschueren, D.; Claessens, F. Structural Basis for Nuclear Hormone Receptor DNA Binding. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *348* (2), 411–417.
- (37) Luisi, B. F.; Xu, W. X.; Otwinowski, Z.; Freedman, L. P.; Yamamoto, K. R.; Sigler, P. B. Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA. *Nature* **1991**, *352*, 497–505.
- (38) Bain, D. L.; Heneghan, A. F.; Connaghan-Jones, K. D.; Miura, M. T. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annu. Rev. Physiol.* **2007**, *69* (1), 201–220.
- (39) Wurtz, J.-M., Bourguet, W., Renaud, J.-P., Vivat, V., Chambon, P., Moras, D., & Gronemeyer, H. A Canonical Structure for the Ligand-Binding Domain of Nuclear Receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3* (1), 87–94.
- (40) Moras, D.; Gronemeyer, H. The Nuclear Receptor Ligand-Binding Domain : Structure and Function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10* (3), 384–391.
- (41) Puigserver, P.; Wu, Z.; Park, C. W.; Graves, R.; Wright, M.; Spiegelman, B. M. A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* **1998**, *92* (6), 829–839.
- (42) Parker, M. G.; White, R. Nuclear Receptors Spring into Action. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3* (2), 113–115.
- (43) Gampe, J.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Wisely, G. B.; Milburn, M. V.; Xu, H. E. Structural Basis for Autorepression of Retinoid X Receptor by Tetramer Formation and the AF-2 Helix. *Genes Dev.* **2000**, *14* (17), 2229–2241.
- (44) Boerma, L. J.; Xia, G.; Qui, C.; Cox, B. D.; Chalmers, M. J.; Smith, C. D.; Lobo-

- Ruppert, S.; Griffin, P. R.; Muccio, D. D.; Renfrow, M. B. Defining the Communication between Agonist and Coactivator Binding in the Retinoid X Receptor α Ligand Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (2), 814–826.
- (45) Ordóñez-Morán, P.; Muñoz, A. Nuclear Receptors: Genomic and Non-Genomic Effects Converge. *Cell Cycle* **2009**, *8* (11), 1675–1680.
- (46) Piomelli, D.; Loverme, J. WO 2005/115370 A2 Compounds and Methods for Treating Non-Inflammatory Pain Using PPAR Alpha Agonists, 2005.
- (47) Pollinger, J.; Merk, D. Therapeutic Applications of the Versatile Fatty Acid Mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27* (4), 517–525.
- (48) Ordóñez-Morán, P.; Larriba, M. J.; Pálmer, H. G.; Valero, R. A.; Barbáchano, A.; Duñach, M.; De Herreros, A. G.; Villalobos, C.; Berciano, M. T.; Lafarga, M.; et al. RhoA - ROCK and P38MAPK-MSK1 Mediate Vitamin D Effects on Gene Expression, Phenotype, and Wnt Pathway in Colon Cancer Cells. *J. Cell Biol.* **2008**, *183* (4), 697–710.
- (49) Lösel, R.; Wehling, M. Nongenomic Actions of Steroid Hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (1), 46–56.
- (50) Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. The RXR Heterodimers and Orphan Receptors. *Cell* **1995**, *83*, 841–850.
- (51) Vivanco Ruiz, M. M.; Bugge, T. H.; Hirschmann, P.; Stunnenberg, H. G. Functional Characterization of a Natural Retinoic Acid Responsive Element. *EMBO J.* **1991**, *10* (12), 3829–3838.
- (52) Maders, S.; Leroy, P.; Chen, J.; Chambon, P. Multiple Parameters Control the Selectivity of Nuclear Receptors for Their Response Elements. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (1), 591–600.
- (53) Kurokawa, R.; Drenzo, J.; Boehm, M.; Sugarman, J.; Gloss, B.; Rosenfeld, M. G.; Heyman, R. A.; Glass, C. K. Regulation of Retinoid Signalling by Receptor Polarity and Allosteric Control of Ligand Binding. *Nature* **1994**, *371* (6497), 528–531.
- (54) Mangelsdorf, D. J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R. A.; Zhou, J. Y.; Ong, E. S.; Oro, A. E.; Kakizuka, A.; Evans, R. M. Characterization of Three RXR Genes That Mediate the Action of 9-Cis Retinoic Acid. *Genes Dev.* **1992**, *6* (3), 329–344.
- (55) Germain, P.; Chambon, P.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Lazar, M. A.; Leid, M.; de Lera, A. R.; Lotan, R.; Mangelsdorf, D. J.; Gronemeyer, H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (4), 760–772.
- (56) de Lera, A. R.; Bourguet, W.; Altucci, L.; Gronemeyer, H. Design of Selective Nuclear Receptor Modulators: RAR and RXR as a Case Study. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (10), 811–820.
- (57) Dominguez, M.; Alvarez, S.; de Lera, A. R. Natural and Structure-Based RXR Ligand Scaffolds and Their Functions. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (6), 631–662.
- (58) Schierle, S.; Merk, D. Therapeutic Modulation of Retinoid X Receptors – SAR and Therapeutic Potential of RXR Ligands and Recent Patents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2019**, *29* (8), 605–621.
- (59) Egea, P. F.; Mitschler, A.; Moras, D. Molecular Recognition of Agonist Ligands by

- RXRs. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16* (5), 987–997.
- (60) Ijpenberg, A.; Tan, N. S.; Gelman, L.; Kersten, S.; Seydoux, J.; Xu, J.; Metzger, D.; Canaple, L.; Chambon, P.; Wahli, W.; et al. In Vivo Activation of PPAR Target Genes by RXR Homodimers. *EMBO J.* **2004**, *23* (10), 2083–2091.
- (61) Kliewer, S. A.; Umesono, K.; Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. Retinoid X Receptor Interacts with Nuclear Receptors in Retinoic Acid, Thyroid Hormone and Vitamin D3 Signalling. *Nature* **1992**, *355* (January), 446–449.
- (62) Forman, B. M.; Umesono, K.; Chen, J.; Evans, R. M. Unique Response Pathways Are Established by Allosteric Interactions among Nuclear Hormone Receptors. *Cell* **1995**, *81* (4), 541–550.
- (63) Shulman, A. I.; Larson, C.; Mangelsdorf, D. J.; Ranganathan, R. Structural Determinants of Allosteric Ligand Activation in RXR Heterodimers. *Cell* **2004**, *116*, 417–429.
- (64) Shulman, A. I.; Mangelsdorf, D. J. Retinoid X Receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353* (6), 604–615.
- (65) Putcha, B. D. K.; Wright, E.; Brunzelle, J. S.; Fernandez, E. J. Structural Basis for Negative Cooperativity within Agonist-Bound TR:RXR Heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (16), 6084–6087.
- (66) Minucci, S.; Leid, M.; Toyama, R.; Saint-Jeannet, J. P.; Peterson, V. J.; Horn, V.; Ishmael, J. E.; Bhattacharyya, N.; Dey, A.; Dawid, I. B.; et al. Retinoid X Receptor (RXR) within the RXR-Retinoic Acid Receptor Heterodimer Binds Its Ligand and Enhances Retinoid-Dependent Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17* (2), 644.
- (67) Schulman, I. G.; Li, C.; Schwabe, J. W. R.; Evans, R. M. The Phantom Ligand Effect: Allosteric Control of Transcription by the Retinoid X Receptor. *Genes Dev.* **1997**, *11* (3), 299–308.
- (68) Repa, J. J.; Turley, S. D.; Lobaccaro, J. M. A.; Medina, J.; Li, L.; Lustig, K.; Shan, B.; Heyman, R. A.; Dietschy, J. M.; Mangelsdorf, D. J. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science* (80-.). **2000**, *289* (5484), 1524–1529.
- (69) Brocard, J.; Kastner, P.; Chambon, P. Two Novel RXR α Isoforms from Mouse Testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *229* (1), 211–218.
- (70) Nagata, T.; Kanno, Y.; Ozato, K.; Taketo, M. The Mouse Rxrb Gene Encoding RXR β : Genomic Organization and Two mRNA Isoforms Generated by Alternative Splicing of Transcripts Initiated from CpG Island Promoters. *Gene* **1994**, *142* (2), 183–189.
- (71) Liu, Q.; Linney, E. The Mouse Retinoid-X Receptor-Gamma Gene: Genomic Organization and Evidence for Functional Isoforms. *Mol. Endocrinol.* **1993**, *7* (5), 651–658.
- (72) Krežel, W.; Kastner, P.; Chambon, P. Differential Expression of Retinoid Receptors in the Adult Mouse Central Nervous System. *Neuroscience* **1999**, *89* (4), 1291–1300.
- (73) Zetterström, R. H.; Lindqvist, E.; Mata de Urquiza, A.; Tomac, A.; Eriksson, U.; Perlmann, T.; Olson, L. Role of Retinoids in the CNS: Differential Expression of Retinoid Binding Proteins and Receptors and Evidence for Presence of Retinoic Acid. *Eur. J. Neurosci.* **1999**, *11* (2), 407–416.

- (74) Ferré, S.; Fredholm, B. B.; Morelli, M.; Popoli, P.; Fuxe, K. Adenosine – Dopamine Receptor – Receptor Interactions as an Integrative Mechanism in the Basal Ganglia. *Trends Neurosci.* **1997**, *2236* (1985), 0–5.
- (75) McCaffery, P.; Drager, U. C. High Levels of a Retinoic Acid-Generating Dehydrogenase in the Meso- Telencephalic Dopamine System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91* (16), 7772–7776.
- (76) Moreno, S.; Farioli-vecchioli, S.; Cerù, M. P. Immunolocalization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Retinoid X Receptors in the Adult Rat CNS. *Neuroscience* **2004**, *123* (1), 131–145.
- (77) Kastner, P.; Grondona, J. M.; Mark, M.; Gansmuller, A.; LeMeur, M.; Decimo, D.; Vonesch, J. L.; Dollé, P.; Chambon, P. Genetic Analysis of RXR α Developmental Function: Convergence of RXR and RAR Signaling Pathways in Heart and Eye Morphogenesis. *Cell* **1994**, *78* (6), 987–1003.
- (78) Wan, Y.-J. Y.; An, D.; Cai, Y.; Repa, J. J.; Hung-Po Chen, T.; Flores, M.; Postic, C.; Magnuson, M. A.; Chen, J.; Chien, K. R.; et al. Hepatocyte-Specific Mutation Establishes Retinoid X Receptor Alpha as a Heterodimeric Integrator of Multiple Physiological Processes in the Liver. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (12), 4436–4444.
- (79) Kastner, P.; Mark, M.; Leid, M.; Gansmuller, A.; Chin, W.; Grondona, J. M.; Décimo, D.; Krezel, W.; Dierich, A.; Chambon, P. Abnormal Spermatogenesis in RXR β Mutant Mice. *Genes Dev.* **1996**, *10* (1), 80–92.
- (80) Krezel, W.; Ghyselinck, N.; Samad, T. A.; Dupé, V.; Kastner, P.; Borrelli, E.; Chambon, P. Impaired Locomotion and Dopamine Signaling in Retinoid Receptor Mutant Mice. *Science* (80-.). **2019**, *279* (5352), 863–867.
- (81) Krezel, W.; Dupé, V.; Mark, M.; Dierich, A.; Kastner, P.; Chambon, P. RXR γ Null Mice Are Apparently Normal and Compound RXR α +/- /RXR β +/- /RXR γ +/- Mutant Mice Are Viable. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 9010–9014.
- (82) Brown, N. S.; Smart, A.; Sharma, V.; Brinkmeier, M. L.; Greenlee, L.; Camper, S. A.; Jensen, D. R.; Eckel, R. H.; Krezel, W.; Chambon, P.; et al. Thyroid Hormone Resistance and Increased Metabolic Rate in the RXR- γ - Deficient Mouse. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106* (1), 73–79.
- (83) Morley, J. E.; Damassa, D. A.; Gordon, J.; Pekary, E.; Hershman, J. M. Thyroid Function and Vitamin A Deficiency. *Life Sci.* **1978**, *22* (21), 1901–1906.
- (84) Haugen, B. R.; Brown, N. S.; Wood, W. M.; Gordon, D. F.; Ridgway, E. C. The Thyrotrope-Restricted Isoform of the Retinoid-X Receptor- γ 1 Mediates 9-Cis-Retinoic Acid Suppression of Thyrotropin- β Promoter Activity. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11* (4), 481–489.
- (85) Sherman, S. I.; Gopal, J.; Haugen, B. R.; Chiu, A. C.; Whaley, K.; Nowlakha, P.; Duvic, M. Central Hypothyroidism Associated with Retinoid X Receptor–Selective Ligands. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340* (14), 1075–1079.
- (86) Mark, M.; Ghyselinck, N. B.; Chambon, P. Function of Retinoid Nuclear Receptors: Lessons from Genetic and Pharmacological Dissections of the Retinoic Acid Signaling Pathway During Mouse Embryogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46* (1), 451–480.

- (87) Heyman, R. A.; Mangelsdorf, D. J.; Dyck, J. A.; Stein, R. B.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Thaller, C. 9-Cis Retinoic Acid Is a High Affinity Ligand for the Retinoid X Receptor. *Cell* **1992**, *68* (2), 397–406.
- (88) Levin, A. A.; Sturzenbecker, L. J.; Kazmer, S.; Bosakowski, T.; Huselton, C.; Allenby, G.; Speck, J.; Kratzeisen, C.; Rosenbergt, M.; Loveyt, A.; et al. 9-Cis Retinoic Acid Stereoisomer Binds and Activates the Nuclear Receptor RXR α . *Nature* **1992**, *355*, 359–361.
- (89) Goldstein, J. T.; Dobrzyn, A.; Clagett-Dame, M.; Pike, J. W.; DeLuca, H. F. Isolation and Characterization of Unsaturated Fatty Acids as Natural Ligands for the Retinoid-X Receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *420* (1), 185–193.
- (90) Fitzgerald, P.; Teng, M.; Chandraratna, R. A. S.; Heyman, R. A.; Allegretto, E. A. Retinoic Acid Receptor Expression Correlates with Retinoid-Induced Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells Regardless of Estrogen Receptor Status. *Cancer Res.* **1997**, *57* (13), 2642–2650.
- (91) Vuligonda, V.; Thacher, S. M.; Chandraratna, R. A. S. Enantioselective Syntheses of Potent Retinoid X Receptor Ligands: Differential Biological Activities of Individual Antipodes. *J. Med. Chem.* **2001**, *44* (14), 2298–2303.
- (92) Boehm, M. F.; McClurg, M. R.; Pathirana, C.; Mangelsdorf, D.; White, S. K.; Hebert, J.; Winn, D.; Goldman, M. E.; Heyman, R. A. Synthesis of High Specific Activity [3H]-9-Cis-Retinoic Acid and Its Application for Identifying Retinoids with Unusual Binding Properties. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (3), 408–414.
- (93) Allenby, G.; Bocquel, M. T.; Saunders, M.; Kazmer, S.; Speck, J.; Rosenberger, M.; Lovey, A.; Kastner, P.; Grippo, J. F.; Chambon, P.; et al. Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors: Interactions with Endogenous Retinoic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (1), 30–34.
- (94) Wolf, G. Is 9-Cis-Retinoic Acid the Endogenous Ligand for the Retinoic Acid-X Receptor? *Nutr. Rev.* **2006**, *64* (12), 532–538.
- (95) Kane, M. A. Analysis, Occurrence, and Function of 9-Cis-Retinoic Acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **2012**, *1821* (1), 10–20.
- (96) Calléja, C.; Messaddeq, N.; Chapellier, B.; Yang, H.; Krezel, W.; Li, M.; Metzger, D.; Mascrez, B.; Ohta, K.; Kagechika, H.; et al. Genetic and Pharmacological Evidence That a Retinoic Acid Cannot Be the RXR-Activating Ligand in Mouse Epidermis Keratinocytes. *Genes Dev.* **2006**, *20* (11), 1525–1538.
- (97) Blair, H. A.; Scott, L. J. Alitretinoin: A Review in Severe Chronic Hand Eczema. *Drugs* **2016**, *76* (13), 1271–1279.
- (98) Cheer, S. M.; Foster, R. H. Alitretinoin. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2000**, *1* (5), 307–314.
- (99) Son, J. H.; Park, S. Y.; Cho, Y. S.; Byun, Y. S.; Chung, B. Y.; Cho, H. J.; Kim, H. O.; Park, C. W. Two Cases of Successful Treatment of Refractory Chronic Inflammatory Skin Disease, Atopic Dermatitis and Psoriasis with Oral Alitretinoin. *Ann. Dermatol.* **2017**, *29* (4), 503–506.
- (100) Rühl, R.; Krzyżosiak, A.; Niewiadomska-Cimicka, A.; Rochel, N.; Szeles, L.; Vaz, B.; Wietrzyk-Schindler, M.; Álvarez, S.; Szklenar, M.; Nagy, L.; et al. 9-Cis-13,14-Dihydroretinoic Acid Is an Endogenous Retinoid Acting as RXR Ligand in Mice. *PLoS*

- Genet.* **2015**, *11* (6), 1–16.
- (101) De Lera, Á. R.; Krezel, W.; Rühl, R. An Endogenous Mammalian Retinoid X Receptor Ligand, at Last! *ChemMedChem* **2016**, *11* (10), 1027–1037.
- (102) Egea, P. F.; Mischler, A.; Rochel, N.; Ruff, M.; Chambon, P.; Moras, D. Crystal Structure of the Human RXR α Ligand-Binding Domain Bound to Its Natural Ligand : 9- Cis Retinoic Acid. *EMBO J.* **2000**, *19* (11), 2592–2601.
- (103) Huang, P.; Chandra, V.; Rastinejad, F. Retinoic Acid Actions through Mammalian Nuclear Receptors. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (1), 233–254.
- (104) Bourguet, W.; Vivat, V.; Wurtz, J. M.; Chambon, P.; Gronemeyer, H.; Moras, D. Crystal Structure of a Heterodimeric Complex of RAR and RXR Ligand-Binding Domains. *Mol. Cell* **2000**, *5* (2), 289–298.
- (105) Mata de Urquiza, A.; Liu, S.; Sjöberg, M.; Zetterström, R. H.; Griffiths, W.; Sjövall, J.; Perlmann, T. Docosahexaenoic Acid, a Ligand for the Retinoid X Receptor in Mouse Brain. *Science* **2000**, *290* (5499), 2140–2144.
- (106) Neuringer, M.; Anderson, G. J.; Connor, W. E. The Essentiality of N-3 Fatty Acids for the Development and Function of the Retina and Brain. *Annu. Rev. Nutr.* **1988**, *8*, 517–541.
- (107) Moore, S. A.; Yoder, E.; Murphy, S.; Dutton, G. R.; Spector, A. A. Astrocytes, Not Neurons, Produce Docosahexaenoic Acid (22:6 ω -3) and Arachidonic Acid (20:4 ω -6). *J. Neurochem.* **1991**, *56* (2), 518–524.
- (108) Spector, A. A. Essentiality of Fatty Acids. *Lipids* **1999**, *34*, S1–S3.
- (109) LeMotte, P. K.; Keidel, S.; Apfel, C. M. Phytanic Acids Is a Retinoid X Receptor Ligand. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *236* (1), 328–333.
- (110) Kitareewan, S.; Burka, L. T.; Tomer, K. B.; Parker, C. E.; Deterding, L. J.; Stevens, R. D.; Forman, B. M.; Mais, D. E.; Heyman, R. A.; McMorris, T.; et al. Phytol Metabolites Are Circulating Dietary Factors That Activate the Nuclear Receptor RXR. *Mol. Biol. Cell* **1996**, *7* (8), 1153–1166.
- (111) Mize, C. E.; Avigan, J.; Baxter, J. H.; Fales, H. M.; Steinberg, D. Metabolism of Phytol-U-14C and Phytanic Acid-U-14C in the Rat. *J. Lipid Res.* **1966**, *7* (5), 692–697.
- (112) Avigan, J. The Presence of Phytanic Acid in Normal Human and Animal Plasma. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **1966**, *116* (2), 391–394.
- (113) Merk, D.; Grisoni, F.; Friedrich, L.; Gelzinyte, E.; Schneider, G. Computer-Assisted Discovery of Retinoid X Receptor Modulating Natural Products and Isofunctional Mimetics. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (12), 5442–5447.
- (114) Alvarez, R.; Vega, M. J.; Kammerer, S.; Rossin, A.; Germain, P.; Gronemeyer, H.; De Lera, A. R. 9-Cis-Retinoic Acid Analogues with Bulky Hydrophobic Rings: New RXR-Selective Agonists. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (24), 6117–6122.
- (115) Muccio, D. D.; Brouillette, W. J.; Breitman, T. R.; Taimi, M.; Emanuel, P. D.; Zhang, X. K.; Chen, G. Q.; Sani, B. P.; Venepally, P.; Reddy, L.; et al. Conformationally Defined Retinoic Acid Analogues. 4. Potential New Agents for Acute Promyelocytic and Juvenile Myelomonocytic Leukemias. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (10), 1679–1687.
- (116) Desphande, A.; Xia, G.; Boerma, L. J.; Vines, K. K.; Atigadda, V. R.; Lobo-Ruppert,

- S.; Grubbs, C. J.; Moeinpour, F. L.; Smith, C. D.; Christov, K.; et al. Methyl-Substituted Conformationally Constrained Retinoid Agonists for the Retinoid X Receptors Demonstrate Improved Efficacy for Cancer Therapy and Prevention. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (1), 178–185.
- (117) Hibi, S.; Kikuchi, K.; Yoshimura, H.; Nagai, M.; Tai, K.; Hida, T. Syntheses and Structure-Activity Relationships of Novel Retinoid X Receptor Agonists. *J. Med. Chem.* **1998**, *41* (17), 3245–3252.
- (118) Farmer, L. J.; Zhi, L.; Jeong, S.; Kallel, E. A.; Croston, G.; Flatten, K. S.; Heyman, R. A.; Nadzan, A. M. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Potent Conformationally Restricted Retinoid X Receptor Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7* (2), 2747–2752.
- (119) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Badea, B. A.; White, S. K.; Mais, D. E.; Berger, E.; Suto, C. M.; Goldman, M. E.; Heyman, R. A. Synthesis and Structure—Activity Relationships of Novel Retinoid X Receptor-Selective Retinoids. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (18), 2930–2941.
- (120) Heald, P.; Mehlmauer, M.; Martin, A. G.; Crowley, C. A.; Yocum, R. C.; Reich, S. D. Topical Bexarotene Therapy for Patients with Refractory or Persistent Early-Stage Cutaneous T-Cell Lymphoma: Results of the Phase III Clinical Trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2003**, *49* (5), 801–815.
- (121) Wong, S. F. Oral Bexarotene in the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Ann. Pharmacother.* **2001**, *35* (9), 1056–1065.
- (122) Hermann, T. W.; Yen, W. C.; Tooker, P.; Fan, B.; Roegner, K.; Negro-Vilar, A.; Lamph, W. W.; Bissonnette, R. P. The Retinoid X Receptor Agonist Bexarotene (Targretin) Synergistically Enhances the Growth Inhibitory Activity of Cytotoxic Drugs in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Lung Cancer* **2005**, *50* (1), 9–18.
- (123) Qi, L.; Guo, Y.; Zhang, P.; Cao, X.; Luan, Y. Preventive and Therapeutic Effects of the Retinoid X Receptor Agonist Bexarotene on Tumors. *Curr. Drug Metab.* **2016**, *17* (2), 118–128.
- (124) Qu, L.; Tang, X. Bexarotene: A Promising Anticancer Agent. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *65* (2), 201–205.
- (125) Tooker, P.; Yen, W. C.; Ng, S. C.; Negro-Vilar, A.; Hermann, T. W. Bexarotene (LGD1069, Targretin), a Selective Retinoid X Receptor Agonist, Prevents and Reverses Gemcitabine Resistance in NSCLC Cells by Modulating Gene Amplification. *Cancer Res.* **2007**, *67* (9), 4425–4433.
- (126) Steinhoff, M.; Beyer, M.; Roewert-Huber, J.; Lukowsky, A.; Assaf, C.; Sterry, W. Complete Clinical Remission of Tumor-Stage Mycosis Fungoides after Acute Extensive Skin Necroses, Granulomatous Reaction, and Fever under Treatment with Bexarotene, Vorinostat, and High-Dose Fenofibrate. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**, *58*, 88–91.
- (127) Lalloyer, F.; Pedersen, T. Å.; Gross, B.; Lestavel, S.; Yous, S.; Vallez, E.; Gustafsson, J. Å.; Mandrup, S.; Fiévet, C.; Staels, B.; et al. Retinoid Bexarotene Modulates Triglyceride but Not Cholesterol Metabolism via Gene-Specific Permissivity of the RXR/LXR Heterodimer in the Liver. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29* (10), 1488–1495.

- (128) de Vries-van der Weij, J.; de Haan, W.; Hu, L.; Kuif, M.; Oei, H. L. D. W.; van der Hoorn, J. W. A.; Havekes, L. M.; Princen, H. M. G.; Romijn, J. A.; Smit, J. W. A.; et al. Bexarotene Induces Dyslipidemia by Increased Very Low-Density Lipoprotein Production and Cholesteryl Ester Transfer Protein-Mediated Reduction of High-Density Lipoprotein. *Endocrinology* **2009**, *150* (5), 2368–2375.
- (129) Farol, L. T.; Hymes, K. B. Bexarotene: A Clinical Review. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2004**, *4* (2), 180–188.
- (130) Pollinger, J.; Gellrich, L.; Schierle, S.; Kilu, W.; Schmidt, J.; Kalinowsky, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heering, J.; Proschak, E.; et al. Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (4), 2112–2126.
- (131) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Zhi, L.; McClurg, M. R.; Berger, E.; Wagoner, M.; Mais, D. E.; Suto, C. M.; Davies, P. J. A. Design and Synthesis of Potent Retinoid X Receptor Selective Ligands That Induce Apoptosis in Leukemia Cells. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (16), 3146–3155.
- (132) Koch, S. S. C.; Dardashti, L. J.; Cesario, R. M.; Croston, G. E.; Boehm, M. F.; Heyman, R. A.; Nadzan, A. M. Synthesis of Retinoid X Receptor-Specific Ligands That Are Potent Inducers of Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (4), 742–750.
- (133) Winum, J. Y.; Baghdiguian, S.; Commes, T.; Leydet, A.; Montero, J. L. Synthesis of New Targretin® Analogues That Induce Apoptosis in Leukemia HL-60 Cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (24), 3529–3532.
- (134) Dawson, M. I.; Jong, L.; Hobbs, P. D.; Cameron, J. F.; Chao, W. ru; Pfahl, M.; Lee, M. O.; Pfahl, M.; Shroot, B. Conformational Effects on Retinoid Receptor Selectivity. 2. Effects of Retinoid Bridging Group on Retinoid X Receptor Activity and Selectivity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (17), 3368–3383.
- (135) Chen, G. L.; Wang, L. H.; Wang, J.; Chen, K.; Zhao, M.; Sun, Z. Z.; Wang, S.; Zheng, H. L.; Yang, J. Y.; Wu, C. F. Discovery of a Small Molecular Compound Simultaneously Targeting RXR and HADC: Design, Synthesis, Molecular Docking and Bioassay. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (13), 3891–3895.
- (136) Fujii, S.; Ohsawa, F.; Yamada, S.; Shinozaki, R.; Fukai, R.; Makishima, M.; Enomoto, S.; Tai, A.; Kakuta, H. Modification at the Acidic Domain of RXR Agonists Has Little Effect on Permissive RXR-Heterodimer Activation. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (17), 5139–5142.
- (137) Lagu, B.; Lebedev, R.; Pio, B.; Yang, M.; Pelton, P. D. Dihydro-[1H]-Quinolin-2-Ones as Retinoid X Receptor (RXR) Agonists for Potential Treatment of Dyslipidemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (12), 3491–3496.
- (138) Lagu, B.; Pio, B.; Lebedev, R.; Yang, M.; Pelton, P. D. RXR-LXR Heterodimer Modulators for the Potential Treatment of Dyslipidemia. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (12), 3497–3503.
- (139) Ohta, K.; Kawachi, E.; Fukasawa, H.; Shudo, K.; Kagechika, H. Diphenylamine-Based Retinoid Antagonists: Regulation of RAR and RXR Function Depending on the N-Substituent. *Bioorganic Med. Chem.* **2011**, *19* (8), 2501–2507.
- (140) Ohta, K.; Tsuji, M.; Kawachi, E.; Fukasawa, H.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.;

- Kagechicka, H. Potent Retinoid Synergists with a Diphenylamine Skeleton. *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21* (5), 544–546.
- (141) Szanto, A.; Narkar, V.; Shen, Q.; Uray, I. P.; Davies, P. J. A.; Nagy, L. Retinoid x Receptors: X-Ploring Their (Patho)Physiological Functions. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, S126–S143.
- (142) Osorio, J. C.; Stanley, W. C.; Linke, A.; Castellari, M.; Diep, Q. N.; Panchal, A. R.; Hintze, T. H.; Lopaschuk, G. D.; Recchia, F. A. Impaired Myocardial Fatty Acid Oxidation and Reduced Protein Expression of Retinoid X Receptor- α in Pacing-Induced Heart Failure. *Circulation* **2002**, *106* (5), 606–612.
- (143) Michellys, P. Y.; Ardecky, R. J.; Chen, J. H.; Crombie, D. L.; Etgen, G. J.; Faul, M. M.; Faulkner, A. L.; Grese, T. A.; Heyman, R. A.; Karanewsky, D. S.; et al. Novel (2E,4E,6Z)-7-(2-Alkoxy-3,5-Dialkylbenzene)-3-Methylocta-2,4,6-Trienoic Acid Retinoid X Receptor Modulators Are Active in Models of Type 2 Diabetes. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2683–2696.
- (144) Leibowitz, M. D.; Ardecky, R. J.; Boehm, M. F.; Broderick, C. L.; Carfagna, M. A.; Crombie, D. L.; D'Arrigo, J.; Etgen, G. J.; Faul, M. M.; Grese, T. A.; et al. Biological Characterization of a Heterodimer-Selective Retinoid X Receptor Modulator: Potential Benefits for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Endocrinology* **2006**, *147* (2), 1044–1053.
- (145) Lenhard, J. M.; Lancaster, M. E.; Paulik, M. A.; Weiel, J. E.; Binz, J. G.; Sundseth, S. S.; Gaskill, B. A.; Lightfoot, R. M.; Brown, H. R. The RXR Agonist LG100268 Causes Hepatomegaly, Improves Glycaemic Control and Decreases Cardiovascular Risk and Cachexia in Diabetic Mice Suffering from Pancreatic Beta-Cell Dysfunction. *Diabetologia* **1999**, *42* (5), 545–554.
- (146) Standeven, A. M.; Escobar, M.; Beard, R. L.; Yuan, Y.-D.; Chandraratna, R. A. S. Mitogenic Effect of Retinoid X Receptor Agonists in Rat Liver. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 517–524.
- (147) Kapetanovic, I. M.; Horn, T. L.; Johnson, W. D.; Cwik, M. J.; Detrisac, C. J.; McCormick, D. L. Murine Oncogenicity and Pharmacokinetics Studies of 9-Cis-UAB30, an RXR Agonist, for Breast Cancer Chemoprevention. *Int. J. Toxicol.* **2010**, *29* (2), 157–164.
- (148) Issemann, I.; Green, S. Activation of a Member of the Steroid Hormone Receptor Superfamily by Peroxisome Proliferators. *Nature* **1990**, *347* (6294), 645–650.
- (149) Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel, F.; Helftenbein, G.; Wahli, W. Control of the Peroxisomal β -Oxidation Pathway by a Novel Family of Nuclear Hormone Receptors. *Cell* **1992**, *68* (5), 879–887.
- (150) Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J. P.; Chatterjee, V. K.; Glass, C. K.; Gonzalez, F. J.; Grimaldi, P. A.; Kadowaki, T.; Lazar, M. A.; Rahilly, S. O.; et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* **2006**, *58* (4), 726–741.
- (151) Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr. Rev.* **1999**, *20* (5), 649–688.
- (152) Lefebvre, P.; Fruchart, J.; Staels, B.; Lefebvre, P.; Chinetti, G.; Fruchart, J.; Staels, B. Sorting out the Roles of PPAR Alpha in Energy Metabolism and Vascular Homeostasis

Find the Latest Version : Review Series Sorting out the Roles of PPAR α in Energy Metabolism and Vascular Homeostasis. *J Clin Invest.* **2006**, *116* (3), 571–580.

- (153) Mandard, S.; Müller, M.; Kersten, S. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Target Genes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61* (4), 393–416.
- (154) Mukherjee, R.; Jow, L.; Noonan, D.; McDonnell, D. P. Human and Rat Peroxisome Proliferator Activated Receptors (PPARs) Demonstrate Similar Tissue Distribution but Different Responsivness to PPAR Activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *51* (3), 157–166.
- (155) Kersten, S.; Seydoux, J.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J.; Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Mediates the Adaptive Response to Fasting. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103* (11), 1489–1498.
- (156) Staels, B.; Vu-Dac, N.; Kosykh, V. A.; Saladin, R.; Fruchart, J. C.; Dallongeville, J.; Auwerx, J. Fibrates Downregulate Apolipoprotein C-III Expression Independent of Induction of Peroxisomal Acyl Coenzyme A Oxidase. A Potential Mechanism for the Hypolipidemic Action of Fibrates. *J. Clin. Invest.* **1995**, *95* (2), 705–712.
- (157) Vu-Dac, N.; Schoonjans, K.; Kosykh, V.; Dallongeville, J.; Fruchart, J. C.; Staels, B.; Auwerx, J. Fibrates Increase Human Apolipoprotein A-II Expression through Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. *J. Clin. Invest.* **1995**, *96* (2), 741–750.
- (158) Reddy, J. K.; Hashimoto, T. Peroxisomal β -Oxidation and Peroxisome Proliferator – Activated Receptor α : An Adaptive Metabolic System. *Annu. Rev. Nutr.* **2001**, *21* (1), 193–230.
- (159) Fruchart, J.-C.; Duriez, P.; Staels, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha Activators Regulate Genes Governing Lipoprotein Metabolism, Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **1999**, *10*, 245–257.
- (160) Berger, J. P.; Akiyama, T. E.; Meinke, P. T. PPARs: Therapeutic Targets for Metabolic Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **2005**, *26* (5), 244–251.
- (161) Merkel, M.; Eckel, R. H.; Goldberg, I. J. Lipoprotein Lipase: Genetics, Lipid Uptake, and Regulation. *J. Lipid Res.* **2002**, *43* (12), 1997–2006.
- (162) Torra, I. P.; Gervois, P.; Staels, B. PPAR Alpha in Metabolic Disease, Inflammation, Atherosclerosis and Aging. *Curr. Opin. Lipidol.* **1999**, *10*, 151–159.
- (163) Goya, K.; Sumitani, S.; Xu, X.; Kitamura, T.; Yamamoto, H.; Kurebayashi, S.; Saito, H.; Kouhara, H.; Kasayama, S.; Kawase, I. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonists Increase Nitric Oxide Synthase Expression in Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24* (4), 658–663.
- (164) Staels, B.; Koenig, W.; Habib, A.; Merval, R.; Lebret, M.; Torra, I. P.; Delerive, P.; Fadel, A.; Chinetti, G.; Fruchart, J. C.; et al. Activation of Human Aortic Smooth-Muscle Cells Is Inhibited by PPAR α but Not by PPAR γ Activators. *Nature* **1998**, *393* (6687), 790–793.
- (165) Marx, N.; Sukhova, G. K.; Collins, T.; Libby, P.; Plutzky, J. PPAR α Activators Inhibit Cytokine-Induced Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Endothelial Cells. *Circulation* **1999**, *99* (24), 3125–3131.
- (166) Duez, H.; Fruchart, J. C.; Staels, B. PPARs in Inflammation, Atherosclerosis and

- Thrombosis. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2001**, 8 (4), 187–194.
- (167) Pineau, T.; Hudgins, W. R.; Liu, L.; Chen, L.-C.; Sher, T.; Gonzalez, F. J.; Samid, D. Activation of a Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor by the Antitumor Agent Phenylacetate and Its Analogs. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52, 659–667.
- (168) Prasanna, P.; Thibault, A.; Liu, L.; Samid, D. Lipid Metabolism as a Target for Brain Cancer Therapy: Synergistic Activity of Lovastatin and Sodium Phenylacetate Against Human Glioma Cells. *J. Neurochem.* **2002**, 66 (2), 710–716.
- (169) Cullingford, T. E.; Bhakoo, K.; Peuchen, S.; Dolphin, C. T.; Patel, R.; Clark, J. B. Distribution of MRNAs Encoding the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α , β , and γ and the Retinoid X Receptor α , β , and γ in Rat Central Nervous System. *J. Neurochem.* **2002**, 70 (4), 1366–1375.
- (170) D'Agostino, G.; La Rana, G.; Russo, R.; Sasso, O.; Iacono, A.; Esposito, E.; Mattace Raso, G.; Cuzzocrea, S.; LoVerme, J.; Piomelli, D.; et al. Central Administration of Palmitoylethanolamide Reduces Hyperalgesia in Mice via Inhibition of NF-KB Nuclear Signalling in Dorsal Root Ganglia. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, 613, 54–59.
- (171) Xu, J.; Racke, M. K.; Drew, P. D. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist Fenofibrate Regulates IL-12 Family Cytokine Expression in the CNS: Relevance to Multiple Sclerosis. *J. Neurochem.* **2007**, 103 (5), 1801–1810.
- (172) Fajas, L.; Auboeuf, D.; Raspé, E.; Schoonjans, K.; Lefebvre, A. M.; Saladin, R.; Najib, J.; Laville, M.; Fruchart, J. C.; Deeb, S.; et al. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272 (30), 18779–18789.
- (173) Loviscach, M.; Rehman, N.; Carter, L.; Mudaliar, S.; Mohadeen, P.; Ciaraldi, T. P.; Veerkamp, J. H.; Henry, R. R. Distribution of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Human Skeletal Muscle and Adipose Tissue: Relation to Insulin Action. *Diabetologia* **2000**, 43 (3), 304–311.
- (174) Tontonoz, P.; Hu, E.; Spiegelman, B. M. Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ 2, a Lipid-Activated Transcription Factor. *Cell* **1994**, 79 (7), 1147–1156.
- (175) Rosen, E. D.; Walkey, C. J.; Puigserver, P.; Spiegelman, B. M. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Genes Dev.* **2000**, 14, 1293–1307.
- (176) Devine, J. H.; Eubank, D. W.; Clouthier, D. E.; Tontonoz, P.; Spiegelman, B. M.; Hammer, R. E.; Beale, E. G. Adipose Expression of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Promoter Requires Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and 9-Cis-Retinoic Acid Receptor Binding to an Adipocyte-Specific Enhancer in Vivo. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (19), 13604–13612.
- (177) Willson, T. M.; Cobb, J. E.; Cowan, D. J.; Wiethe, R. W.; Correa, I. D.; Prakash, S. R.; Beck, K. D.; Moore, L. B.; Kliwer, S. A.; Lehmann, J. M. The Structure - Activity Relationship between Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Agonism and the Antihyperglycemic Activity of Thiazolidinediones. *J. Med. Chem.* **1996**, 39 (3), 665–668.
- (178) Berger, J.; Bailey, P.; Biswas, C.; Cullinan, C. A.; Doebber, T. W.; Hayes, N. S.; Saperstein, R.; Smith, R. G.; Leibowitz, M. D. Thiazolidinediones Produce a Conformational Change in Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor-Gamma: Binding and Activation Correlate with Antidiabetic Actions in Db/Db Mice.

Endocrinology **1996**, *137* (10), 4189–4195.

- (179) Ye, J. M.; Dzamko, N.; Cleasby, M. E.; Hegarty, B. D.; Furler, S. M.; Cooney, G. J.; Kraegen, E. W. Direct Demonstration of Lipid Sequestration as a Mechanism by Which Rosiglitazone Prevents Fatty-Acid-Induced Insulin Resistance in the Rat: Comparison with Metformin. *Diabetologia* **2004**, *47* (7), 1306–1313.
- (180) Semple, R. K.; Chatterjee, V. K. K.; Rahilly, S. O. PPAR γ and Human Metabolic Disease. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116* (3), 581–589.
- (181) Yamauchi, T.; Kamon, J.; Waki, H.; Terauchi, Y.; Kubota, N.; Hara, K.; Mori, Y.; Ide, T.; Murakami, K.; Tsuboyama-Kasaoka, N.; et al. The Fat-Derived Hormone Adiponectin Reverses Insulin Resistance Associated with Both Lipodystrophy and Obesity. *Nat. Med.* **2001**, *7* (8), 941–946.
- (182) LeBrasseur, N. K.; Kelly, M.; Tsao, T. S.; Farmer, S. R.; Saha, A. K.; Ruderman, N. B.; Tomas, E. Thiazolidinediones Can Rapidly Activate AMP-Activated Protein Kinase in Mammalian Tissues. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **2006**, *291* (1), 175–181.
- (183) Armoni, M.; Kritz, N.; Harel, C.; Bar-Yoseph, F.; Chen, H.; Quon, M. J.; Karnieli, E. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Represses GLUT4 Promoter Activity in Primary Adipocytes, and Rosiglitazone Alleviates This Effect. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (33), 30614–30623.
- (184) Lang, C. H.; Dobrescu, C.; Bagby, G. J. Tumor Necrosis Factor Impairs Insulin Action on Peripheral Glucose Disposal and Hepatic Glucose Output. *Endocrinology* **1992**, *130* (1), 43–52.
- (185) Tanaka, T.; Itoh, H.; Doi, K.; Fukunaga, Y.; Hosoda, K.; Shintani, M.; Yamashita, J.; Chun, T. H.; Inoue, M.; Masatsugu, K.; et al. Down Regulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Expression by Inflammatory Cytokines and Its Reversal by Thiazolidinediones. *Diabetologia* **1999**, *42* (6), 702–710.
- (186) Gosset, P.; Charbonnier, A. S.; Delerive, P.; Fontaine, J.; Staels, B.; Pestel, J.; Tonnel, A. B.; Trottein, F. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activators Affect the Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Eur. J. Immunol.* **2001**, *31* (10), 2857–2865.
- (187) Tontonoz, P.; Nagy, L.; Alvarez, J. G. A.; Thomazy, V. A.; Evans, R. M. PPAR γ Promotes Monocyte/Macrophage Differentiation and Uptake of Oxidized LDL. *Cell* **1998**, *93* (2), 241–252.
- (188) Kawahito, Y.; Kondo, M.; Tsubouchi, Y.; Hahiramoto, A.; Bishop-Bailey, D.; Inoue, K.; Kohno, M.; Yamada, R.; Hla, T.; Sano, H. 14-Deoxy-Delta^{12,14}-PGJ₂ Induces Synoviocyte Apoptosis and Suppresses Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106* (2), 189–197.
- (189) Chinetti, G.; Griglio, S.; Antonucci, M.; Torra, I. P.; Delerive, P.; Majd, Z.; Fruchart, J. C.; Chapman, J.; Najib, J.; Staels, B. Activation of Proliferator-Activated Receptors α and γ Induces Apoptosis of Human Monocyte-Derived Macrophages. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (40), 25573–25580.
- (190) Chinetti, G.; Fruchart, J. C.; Staels, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Nuclear Receptors at the Crossroads between Lipid Metabolism and Inflammation. *Inflamm. Res.* **2000**, *49* (10), 497–505.

- (191) Huang, J. T.; Welch, J. S.; Ricote, M.; Binder, C. J.; Willson, T. M.; Kelly, C.; Witztum, J. L.; Funk, C. D.; Conrad, D.; Glass, C. K. Interleukin-4-Dependent Production of PPAR- γ Ligands in Macrophages by 12/15-Lipoxygenase. *Nature* **1999**, *400* (6742), 378–382.
- (192) Glass, C. K. Potential Roles of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Macrophage Biology and Atherosclerosis. *J. Endocrinol.* **2001**, *169* (3), 461–464.
- (193) Conrad, D. J.; Kuhn, H.; Mulkins, M.; Highland, E.; Sigal, E. Specific Inflammatory Cytokines Regulate the Expression of Human Monocyte 15-Lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (1), 217–221.
- (194) Gordon, S. Alternative Activation of Macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3* (January), 23–25.
- (195) Gordon, S.; Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* **2010**, *32* (5), 593–604.
- (196) Bouhlef, M. A.; Derudas, B.; Rigamonti, E.; Dièvert, R.; Brozek, J.; Haulon, S.; Zawadzki, C.; Jude, B.; Torpier, G.; Marx, N.; et al. PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-Inflammatory Properties. *Cell Metab.* **2007**, *6* (2), 137–143.
- (197) Savill, J.; Hogg, N.; Ren, Y.; Haslett, C. Thrombospondin Cooperates with CD36 and the Vitronectin Receptor in Macrophage Recognition of Neutrophils Undergoing Apoptosis. *J. Clin. Invest.* **1992**, *90* (4), 1513–1522.
- (198) Jiang, C.; Ting, A. T.; Seed, B. PPAR γ Agonists Inhibit Production of Monocyte Inflammatory Cytokines. *Nature* **1998**, *391*, 82–86.
- (199) Warden, A.; Truitt, J.; Merriman, M.; Ponomareva, O.; Jameson, K.; Ferguson, L. B.; Mayfield, R. D.; Harris, R. A. Localization of PPAR Isotypes in the Adult Mouse and Human Brain. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–15.
- (200) Villapol, S. Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma on Brain and Peripheral Inflammation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **2018**, *38* (1), 121–132.
- (201) Roth, A. D.; Leisewitz, A. V.; Jung, J. E.; Cassina, P.; Barbeito, L.; Inestrosa, N. C.; Bronfman, M. PPAR γ Activators Induce Growth Arrest and Process Extension in B12 Oligodendrocyte-like Cells and Terminal Differentiation of Cultured Oligodendrocytes. *J. Neurosci. Res.* **2003**, *72* (4), 425–435.
- (202) Bernardo, A.; Bianchi, D.; Magnaghi, V.; Minghetti, L. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonists Promote Differentiation and Antioxidant Defenses of Oligodendrocyte Progenitor Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2009**, *68* (7), 797–808.
- (203) Liu, Y.; Colby, J. K.; Zuo, X.; Jaoude, J.; Wei, D.; Shureiqi, I. The Role of PPAR- δ in Metabolism, Inflammation, and Cancer: Many Characters of a Critical Transcription Factor. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (11).
- (204) Braissant, O.; Fougère, F.; Scotto, C.; Dauca, M.; Wahli, W. Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Tissue Distribution of PPAR- α , - β and - γ in the Adult Rat. *Endocrinology* **1996**, *137* (1), 354–366.
- (205) Peters, J. M.; Lee, S. S. T.; Li, W.; Ward, J. M.; Gavrilova, O.; Everett, C.; Reitman, M. L.; Hudson, L. D.; Gonzalez, F. J. Growth, Adipose, Brain, and Skin Alterations Resulting from Targeted Disruption of the Mouse Peroxisome Proliferator-Activated

- Receptor Beta (Delta). *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (14), 5119–5128.
- (206) Wang, Y. X.; Lee, C. H.; Tiep, S.; Yu, R. T.; Ham, J.; Kang, H.; Evans, R. M. Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor δ Activates Fat Metabolism to Prevent Obesity. *Cell* **2003**, *113* (2), 159–170.
- (207) Iglesias, J.; Barg, S.; Vallois, D.; Lahiri, S.; Roger, C.; Yessoufou, A.; Pradevand, S.; McDonald, A.; Bonal, C.; Reimann, F.; et al. PPAR β/δ Affects Pancreatic β Cell Mass and Insulin Secretion in Mice. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (11), 4105–4117.
- (208) Romanowska, M.; Reilly, L.; Palmer, C. N. A.; Gustafsson, M. C. U.; Foerster, J. Activation of PPAR β/δ Causes a Psoriasis-like Skin Disease in Vivo. *PLoS One* **2010**, *5* (3).
- (209) Kanakasabai, S.; Chearwae, W.; Walline, C. C.; Iams, W.; Adams, S. M.; Bright, J. J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Agonists Inhibit T Helper Type 1 (Th1) and Th17 Responses in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Immunology* **2010**, *130* (4), 572–588.
- (210) Dunn, S. E.; Bhat, R.; Straus, D. S.; Sobel, R. A.; Axtell, R.; Johnson, A.; Nguyen, K.; Mukundan, L.; Moshkova, M.; Dugas, J. C.; et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Limits the Expansion of Pathogenic Th Cells during Central Nervous System Autoimmunity. *J. Exp. Med.* **2010**, *207* (8), 1599–1608.
- (211) Adhikary, T.; Wortmann, A.; Schumann, T.; Finkernagel, F.; Lieber, S.; Roth, K.; Toth, P. M.; Diederich, W. E.; Nist, A.; Stiewe, T.; et al. The Transcriptional PPAR β/δ Network in Human Macrophages Defines a Unique Agonist-Induced Activation State. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (10), 5033–5051.
- (212) Vosper, H.; Patel, L.; Graham, T. L.; Khoudoli, G. A.; Hill, A.; Macphee, C. H.; Pinto, I.; Smith, S. A.; Suckling, K. E.; Wolf, C. R.; et al. The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ Promotes Lipid Accumulation in Human Macrophages. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (47), 44258–44265.
- (213) Mothe-Satney, I.; Murdaca, J.; Sibille, B.; Rousseau, A. S.; Squillace, R.; Le Menn, G.; Rekima, A.; Larbret, F.; Pelé, J.; Verhasselt, V.; et al. A Role for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Beta in T Cell Development. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (September), 1–12.
- (214) Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliewer, S. A.; Gampe, R. T.; McKee, D. D.; et al. Structural Determinants of Ligand Binding Selectivity between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (24), 13919–13924.
- (215) Jang, J. Y.; Bae, H.; Lee, Y. J.; Choi, Y. II; Kim, H. J.; Park, S. B.; Suh, S. W.; Kim, S. W.; Han, B. W. Structural Basis for the Enhanced Anti-Diabetic Efficacy of Lobeglitazone on PPAR γ . *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–11.
- (216) Wu, C. C.; Baiga, T. J.; Downes, M.; La Clair, J. J.; Atkins, A. R.; Richard, S. B.; Fan, W.; Stockley-Noel, T. A.; Bowman, M. E.; Noel, J. P.; et al. Structural Basis for Specific Ligation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114* (13), E2563–E2570.
- (217) Kersten, S.; Desvergne, B.; Wahli, W. Roles of PPARs in Health and Disease. *Nature* **2000**, *405* (6785), 421–424.

- (218) Lin, Q.; Ruuska, S. E.; Shaw, N. S.; Dong, D.; Noy, N. Ligand Selectivity of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . *Biochemistry* **1999**, *38* (1), 185–190.
- (219) Krey, G.; Braissant, O.; L'Horset, F.; Kalkhoven, E.; Perroud, M.; Parker, M. G.; Wahli, W. Fatty Acids, Eicosanoids, and Hypolipidemic Agents Identified as Ligands of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors by Coactivator-Dependent Receptor Ligand Assay. *Mol. Endocrinol.* **1997**, *11* (6), 779–791.
- (220) Devchand, P. R.; Keller, H.; Peters, J. M.; Vazquez, M.; Gonzalez, F. J.; Wahli, W. The PPAR α -Leukotriene B₄ Pathway to Inflammation Control. *Nature* **1996**, *384* (7), 39–43.
- (221) Goldenberg, I.; Benderly, M.; Goldbourt, U. Update on the Use of Fibrates: Focus on Bezafibrate. *Vasc. Health Risk Manag.* **2008**, *4* (1), 131–141.
- (222) Forman, B. M.; Tontonoz, P.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M.; Evans, R. M. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor PPAR γ . *Cell* **1995**, *83*, 803–812.
- (223) Balfour, J. A. B.; Plosker, G. L. Rosiglitazone. *Drugs* **1999**, *57* (6), 921–930.
- (224) Lehmann, J. M.; Moore, L. B.; Smith-Oliver, T. A.; Wilkison, W. O.; Willson, T. M.; Kliewer, S. A. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for PPAR γ . *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (22), 12953–12956.
- (225) Young, P. W.; Buckle, D. R.; Cantello, B. C. C.; Chapman, H.; Clapham, J. C.; Coyle, P. J.; Haigh, D.; Hindley, R. M.; Holder, J. C.; Kallender, H.; et al. Identification of High-Affinity Binding Sites for the Insulin Sensitizer Rosiglitazone (BRL-49653) in Rodent and Human Adipocytes Using a Radioiodinated Ligand for Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor γ . *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, *284* (2), 751–759.
- (226) Shureiqi, I.; Jiang, W.; Zuo, X.; Wu, Y.; Stimmel, J. B.; Leesnitzer, L. M.; Morris, J. S.; Fan, H. Z.; Fischer, S. M.; Lippman, S. M. The 15-Lipoxygenase-1 Product 13-S-Hydroxyoctadecadienoic Acid down-Regulates PPAR- δ to Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (17), 9968–9973.
- (227) Holden, P. R.; Tugwood, J. D. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha: Role in Rodent Liver Cancer and Species Differences. *J. Mol. Endocrinol.* **1999**, *22* (1), 1–8.
- (228) Reddy, J. K.; Rao, M. S.; Azarnoff, D. L.; Sell, S. Mitogenic and Carcinogenic Effects of a Hypolipidemic Peroxisome Proliferator, [4-Chloro-6-(2,3-Xylidino)-2-Pyrimidinylthio]Acetic Acid (Wy-14,643), in Rat and Mouse Liver. *Cancer Res.* **1979**, *39* (1), 152–161.
- (229) Reddy, J. K.; Rao, M. S.; Moody, D. E. Hepatocellular Carcinomas in Acatalasemic Mice Treated with Nafenopin, a Hypolipidemic Peroxisome Proliferator. *Cancer Res.* **1975**, *36* (4), 1211–1217.
- (230) Hayashi, F.; Tamura, H.; Yamada, J.; Kasai, H.; Suga, T. Characteristics of the Hepatocarcinogenesis Caused by Dehydroepiandrosterone, a Peroxisome Proliferator, in Male f-344 Rats. *Carcinogenesis* **1994**, *15* (10), 2215–2219.
- (231) Wu, J.; Song, Y.; Li, H.; Chen, J. Rhabdomyolysis Associated with Fibrate Therapy: Review of 76 Published Cases and a New Case Report. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65* (12), 1169–1174.

- (232) Federman, D. G.; Hussain, F.; Walters, A. B. Fatal Rhabdomyolysis Caused by Lipid-Lowering Therapy. *South. Med. J.* **2001**, *94* (10), 1023–1026.
- (233) Kahn, B. B.; McGraw, T. E. Rosiglitazone, PPAR γ , and Type 2 Diabetes. *New Engl J Med* **2010**, *363* (27), 2667–2669.
- (234) Gupta, R. A.; Wang, D.; Katkuri, S.; Wang, H.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. Activation of Nuclear Hormone Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ Accelerates Intestinal Adenoma Growth. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 245–247.
- (235) Deuschl, G.; Maier, W. S3-Leitlinie Demenzen. *Dtsch. Gesellschaft für Neurol. Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Ther. der Neurol. Online www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 09.10.2019)* **2016**.
- (236) Enders, D.; Balzer-Geldsetzer, M.; Riedel, O.; Dodel, R.; Wittchen, H. U.; Sensken, S. C.; Wolff, B.; Reese, J. P. Prevalence, Duration and Severity of Parkinson's Disease in Germany: A Combined Meta-Analysis from Literature Data and Outpatient Samples. *Eur. Neurol.* **2017**, *78*, 128–136.
- (237) Höer, A.; Schiffhorst, G.; Zimmermann, A.; Fischaleck, J.; Gehrman, L.; Ahrens, H.; Carl, G.; Sigel, K. O.; Osowski, U.; Klein, M.; et al. Multiple Sclerosis in Germany: Data Analysis of Administrative Prevalence and Healthcare Delivery in the Statutory Health System. *BMC Health Serv. Res.* **2014**, *14* (1).
- (238) Leicht, H.; Heinrich, S.; Heider, D.; Bachmann, C.; Bickel, H.; van den Bussche, H.; Fuchs, A.; Lippa, M.; Maier, W.; Mösch, E.; et al. Net Costs of Dementia by Disease Stage. *Acta Psychiatr. Scand.* **2011**, *124* (5), 384–395.
- (239) Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Menzel, S.; Ruth, P. *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch Der Pharmakologie, Der Klinischen Pharmakologie Und Toxikologie*, 10th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2013.
- (240) Deuschl, G.; Oertel, W.; Reichmann, H. S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom. *Dtsch. Gesellschaft für Neurol. Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Ther. der Neurol. Online www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 09.10.2019)* **2016**.
- (241) Brunden, K. R.; Trojanowski, J. Q.; Lee, V. M. Y. Advances in Tau-Focused Drug Discovery for Alzheimer's Disease and Related Tauopathies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2009**, *8* (10), 783–793.
- (242) Jadidi-Niaragh, F.; Mirshafiey, A. Histamine and Histamine Receptors in Pathogenesis and Treatment of Multiple Sclerosis. *Neuropharmacology* **2010**, *59* (3), 180–189.
- (243) Czirr, E.; Wyss-coray, T. The Immunology of Neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122* (4), 1156–1163.
- (244) Mosher, K. I.; Wyss-Coray, T. Microglial Dysfunction in Brain Aging and Alzheimer's Disease. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *88* (4), 594–604.
- (245) Chen, W. W.; Zhang, X.; Huang, W. J. Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases (Review). *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13* (4), 3391–3396.
- (246) Montalban, X.; Gold, R.; Thompson, A. J.; Otero-Romero, S.; Amato, M. P.; Chandraratna, D.; Clanet, M.; Comi, G.; Derfuss, T.; Fazekas, F.; et al.ECTRIMS/EAN Guideline on the Pharmacological Treatment of People with Multiple Sclerosis. *Eur. J. Neurol.* **2018**, *25*, 215–237.

- (247) Fitz, N. F.; Nam, K. N.; Koldamova, R.; Lefterov, I. Therapeutic Targeting of Nuclear Receptors, Liver X and Retinoid X Receptors, for Alzheimer's Disease. *Br. J. Pharmacol.* **2019**, *176*, 3599–3610.
- (248) Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Cannady, S. B.; Lehman, T. M.; Landreth, G. E. Identification of Microglial Signal Transduction Pathways Mediating a Neurotoxic Response to Amyloidogenic Fragments of Beta-Amyloid and Prion Proteins. *J. Neurosci.* **1999**, *19* (3), 928–939.
- (249) Combs, C. K.; Johnson, D. E.; Karlo, J. C.; Cannady, S. B.; Landreth, G. E. Inflammatory Mechanisms in Alzheimer's Disease: Inhibition of β -Amyloid-Stimulated Proinflammatory Responses and Neurotoxicity by PPAR γ Agonists. *J. Neurosci.* **2000**, *20* (2), 558–567.
- (250) Ardura-Fabregat, A.; Boddeke, E. W. G. M.; Boza-Serrano, A.; Brioschi, S.; Castro-Gomez, S.; Ceyzériat, K.; Dansokho, C.; Dierkes, T.; Gelders, G.; Heneka, M. T.; et al. Targeting Neuroinflammation to Treat Alzheimer's Disease. *CNS Drugs* **2017**, *31* (12), 1057–1082.
- (251) Moutinho, M.; Landreth, G. E. Therapeutic Potential of Nuclear Receptor Agonists in Alzheimer's Disease. *J. Lipid Res.* **2017**, *58* (10), 1937–1949.
- (252) Heneka, M. T.; Landreth, G. E.; Hüll, M. Drug Insight: Effects Mediated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in CNS Disorders. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **2007**, *3* (9), 496–504.
- (253) Jahrling, J. B.; Hernandez, C. M.; Denner, L.; Dineley, K. T. PPAR γ Recruitment to Active ERK during Memory Consolidation Is Required for Alzheimer's Disease-Related Cognitive Enhancement. *J. Neurosci.* **2014**, *34* (11), 4054–4063.
- (254) Risner, M. E.; Saunders, A. M.; Altman, J. F. B.; Ormandy, G. C.; Craft, S.; Foley, I. M.; Zvartau-Hind, M. E.; Hosford, D. A.; Roses, A. D. Efficacy of Rosiglitazone in a Genetically Defined Population with Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease. *Pharmacogenomics J.* **2006**, *6* (4), 246–254.
- (255) Yamanaka, M.; Ishikawa, T.; Griep, A.; Axt, D.; Kummer, M. P.; Heneka, M. T. PPAR γ /RXRA-Induced and CD36-Mediated Microglial Amyloid- β Phagocytosis Results in Cognitive Improvement in Amyloid Precursor Protein/Presenilin 1 Mice. *J. Neurosci.* **2012**, *32* (48), 17321–17331.
- (256) Alaynick, W. A. Nuclear Receptors, Mitochondria and Lipid Metabolism. *Mitochondrion* **2008**, *8* (4), 329–337.
- (257) St-Pierre, J.; Drori, S.; Uldry, M.; Silvaggi, J. M.; Rhee, J.; Jäger, S.; Handschin, C.; Zheng, K.; Lin, J.; Yang, W.; et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* **2006**, *127* (2), 397–408.
- (258) Handschin, C.; Chin, S.; Li, P.; Liu, F.; Maratos-flier, E.; Lebrasseur, N. K.; Yan, Z.; Spiegelman, B. M. Skeletal Muscle Fiber-Type Switching, Exercise Intolerance, and Myopathy in PGC-1 α Muscle-Specific Knock-out Animals. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (41), 30014–30021.
- (259) Ferreira, S. T.; Clarke, J. R.; Bomfim, T. R.; De Felice, F. G. Inflammation, Defective Insulin Signaling, and Neuronal Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Dement.* **2014**, *10*, S76–S83.

- (260) Odegaard, J. I.; Chawla, A. The Immune System as a Sensor of the Metabolic State. *Immunity* **2013**, *38* (4), 644–654.
- (261) Koster, K. P.; Smith, C.; Valencia-Olvera, A. C.; Thatcher, G. R. J.; Tai, L. M.; LaDu, M. J. Rexinoids as Therapeutics for Alzheimer Disease: Role of APOE. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (6), 708–720.
- (262) Corder, E. H.; Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D. E.; Gaskell, P. C.; Small, G. W.; Roses, A. D.; Haines, J. L.; Pericak-Vance, M. A. Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* **1993**, *261* (5123), 921–923.
- (263) Cosentino, S.; Scarmeas, N.; Helzner, E.; Glymour, M. M.; Brandt, J.; Albert, M.; Blacker, D.; Stern, Y. APOE E4 Allele Predicts Faster Cognitive Decline in Mild Alzheimer Disease. *Neurology* **2008**, *70*, 1842–1849.
- (264) Khachaturian, A. S.; Corcoran, C. D.; Mayer, L. S.; Zandi, P. P.; Breitner, J. C. S. Apolipoprotein E E4 Count Affects Age at Onset of Alzheimer Disease, but Not Lifetime Susceptibility: The Cache County Study. *Arch. Gen. Psychiatry* **2004**, *61* (5), 518–524.
- (265) Mandrekar-Colucci, S.; Landreth, G. E. Nuclear Receptors as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, *15* (9), 1085–1097.
- (266) Manelli, A. M.; Bulfinch, L. C.; Sullivan, P. M.; LaDu, M. J. A β 42 Neurotoxicity in Primary Co-Cultures: Effect of ApoE Isoform and A β Conformation. *Neurobiol. Aging* **2007**, *28* (8), 1139–1147.
- (267) Zepa, L.; Frenkel, M.; Belinson, H.; Kariv-Inbal, Z.; Kaye, R.; Masliah, E.; Michaelson, D. M. ApoE4-Driven Accumulation of Intraneuronal Oligomerized A β 42 Following Activation of the Amyloid Cascade in Vivo Is Mediated by a Gain of Function. *Int. J. Alzheimers. Dis.* **2011**, *2011*.
- (268) Zhu, Y.; Nwabuisi-Heath, E.; Dumanis, S. B.; Tai, L. M.; Yu, C.; Rebeck, G. W.; Ladu, M. J. APOE Genotype Alters Glial Activation and Loss of Synaptic Markers in Mice. *Glia* **2012**, *60* (4), 559–569.
- (269) Bachmeier, C.; Paris, D.; Beaulieu-Abdelahad, D.; Mouzon, B.; Mullan, M.; Crawford, F. A Multifaceted Role for ApoE in the Clearance of Beta-Amyloid across the Blood-Brain Barrier. *Neurodegener. Dis.* **2012**, *11* (1), 13–21.
- (270) Oram, J. F.; Vaughan, A. M. ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **2006**, *99* (10), 1031–1043.
- (271) Koldamova, R.; Fitz, N. F.; Lefterov, I. ATP-Binding Cassette Transporter A1: From Metabolism to Neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *72A*, 13–21.
- (272) Tai, L. M.; Mehra, S.; Shete, V.; Estus, S.; Rebeck, G. W.; Bu, G.; Ladu, M. J. Soluble ApoE/A β Complex: Mechanism and Therapeutic Target for APOE4-Induced AD Risk. *Mol. Neurodegener.* **2014**, *9* (1).
- (273) Yu C, Youmans KL, L. M. Lipoprotein Remodelling in the Periphery: A Model for the Brain? *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1801* (8), 819–823.
- (274) Lok, K.; Zhao, H.; Shen, H.; Wang, Z.; Gao, X.; Zhao, W.; Yin, M. Characterization of the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease in Senescence Accelerated Background. *Neurosci. Lett.* **2013**, *557*, 84–89.

- (275) Cramer, P. E.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Lee, C. Y. D.; Karlo, J. C.; Zinn, A. E.; Casali, B. T.; Restivo, J. L.; Goebel, W. D.; James, M. J.; et al. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear Beta-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* **2012**, *335* (6075), 1503–1506.
- (276) Yuan, C.; Guo, X.; Zhou, Q.; Du, F.; Jiang, W.; Zhou, X.; Liu, P.; Chi, T.; Ji, X.; Gao, J.; et al. OAB-14, a Bexarotene Derivative, Improves Alzheimer's Disease-Related Pathologies and Cognitive Impairments by Increasing β -Amyloid Clearance in APP/PS1 Mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2019**, *1865* (1), 161–180.
- (277) Boehm-Cagan, A.; Michaelson, D. M. Reversal of ApoE4-Driven Brain Pathology and Behavioral Deficits by Bexarotene. *J. Neurosci.* **2014**, *34* (21), 7293–7301.
- (278) Kuntz, M.; Candela, P.; Saint-Pol, J.; Lamartinière, Y.; Boucau, M. C.; Sevin, E.; Fenart, L.; Gosselet, F. Bexarotene Promotes Cholesterol Efflux and Restricts Apical-to-Basolateral Transport of Amyloid- β Peptides in an in Vitro Model of the Human Blood-Brain Barrier. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *48* (3), 849–862.
- (279) Bachmeier, C.; Beaulieu-Abdelahad, D.; Crawford, F.; Mullan, M.; Paris, D. Stimulation of the Retinoid X Receptor Facilitates Beta-Amyloid Clearance across the Blood-Brain Barrier. *J. Mol. Neurosci.* **2013**, *49* (2), 270–276.
- (280) Lovett-Racke, A. E.; Hussain, R. Z.; Northrop, S.; Choy, J.; Rocchini, A.; Matthes, L.; Chavis, J. A.; Diab, A.; Drew, P. D.; Racke, M. K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Agonists as Therapy for Autoimmune Disease. *J. Immunol.* **2004**, *172* (9), 5790–5798.
- (281) Niino, M.; Iwabuchi, K.; Kikuchi, S.; Ato, M.; Morohashi, T.; Ogata, A.; Tashiro, K.; Onoé, K. Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in C57BL/6 Mice by an Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ . *J. Neuroimmunol.* **2001**, *116* (1), 40–48.
- (282) Feinstein, D. L.; Galea, E.; Gavrilyuk, V.; Brosnan, C. F.; Whitacre, C. C.; Dumitrescu-Ozimek, L.; Landreth, G. E.; Pershadsingh, H. A.; Weinberg, G.; Heneka, M. T. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Agonists Prevent Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Ann. Neurol.* **2002**, *51* (6), 694–702.
- (283) Xu, J.; Drew, P. D. 9-Cis-Retinoic Acid Suppresses Inflammatory Responses of Microglia and Astrocytes. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *171* (1–2), 135–144.
- (284) Schrage, K.; Koopmans, G.; Joosten, E. A. J.; Mey, J. Macrophages and Neurons Are Targets of Retinoic Acid Signaling after Spinal Cord Contusion Injury. *Eur. J. Neurosci.* **2006**, *23* (2), 285–295.
- (285) Chandraratna, R. A.; Noelle, R. J.; Nowak, E. C. Treatment with Retinoid X Receptor Agonist IRX4204 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8* (2), 1016–1026.
- (286) Kremer, D.; Akkermann, R.; Küry, P.; Dutta, R. Current Advancements in Promoting Remyelination in Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2019**, *25* (1), 7–14.
- (287) Natrajan, M. S.; Fuente, A. G. De; Crawford, A. H.; Linehan, E.; Johnson, K. R.; Wu, T.; Fitzgerald, D. C.; Ricote, M. Retinoid X Receptor Activation Reverses Age-Related Deficiencies in Myelin Debris Phagocytosis and Remyelination. *Brain* **2018**, *138*, 3581–3597.

- (288) Baer, A. S.; Syed, Y. A.; Kang, S. U.; Mitteregger, D.; Vig, R.; Ffrench-Constant, C.; Franklin, R. J. M.; Altmann, F.; Lubec, G.; Kotter, M. R. Myelin-Mediated Inhibition of Oligodendrocyte Precursor Differentiation Can Be Overcome by Pharmacological Modulation of Fyn-RhoA and Protein Kinase C Signalling. *Brain* **2009**, *132* (2), 465–481.
- (289) Kotter, M. R.; Zhao, C.; Van Rooijen, N.; Franklin, R. J. M. Macrophage-Depletion Induced Impairment of Experimental CNS Remyelination Is Associated with a Reduced Oligodendrocyte Progenitor Cell Response and Altered Growth Factor Expression. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *18* (1), 166–175.
- (290) Diab, A.; Hussain, R. Z.; Lovett-Racke, A. E.; Chavis, J. A.; Drew, P. D.; Racke, M. K. Ligands for the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma and the Retinoid X Receptor Exert Additive Anti-Inflammatory Effects on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **2004**, *148*, 116–126.
- (291) Merk, D.; Grisoni, F.; Friedrich, L.; Gelzinyte, E.; Schneider, G. Scaffold Hopping from Synthetic RXR Modulators by Virtual Screening and de Novo Design. *Medchemcomm* **2018**, *9* (8), 1289–1292.
- (292) Santilli, A. A.; Scotese, A. C.; Tomarelli, R. M. A Potent Antihypercholesterolemic Agent: [4-Chloro-6-(2,3-Xylidino)-2-Pyrimidinylthio]Acetic Acid (Wy-14643). *Experientia* **1974**, *30* (10), 1110–1111.
- (293) D’Atri, G.; Gomasasca, P.; Resnati, G.; Tronconi, G.; Scolastico, C.; Sirtorir, C. R. Novel Pyrimidine and 1,3,5-Triazine Hypolipidemic Agents. *J. Med. Chem.* **1984**, *27* (12), 1621–1629.
- (294) Rau, O.; Syha, Y.; Zettl, H.; Kock, M.; Bock, A.; Schubert-Zsilavec, M. Alpha-Alkyl Substituted Pirinixic Acid Derivatives As Potent Dual Agonists of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha and Gamma. *Arch. Pharm.* **2008**, *341* (3), 191–195.
- (295) Kubinyi, H. Similarity and Dissimilarity: A Medicinal Chemist’s View. *Perspect. Drug Discov. Des.* **1998**, 225–252.
- (296) Schmidt, J.; Rotter, M.; Weiser, T.; Wittmann, S.; Weizel, L.; Kaiser, A.; Heering, J.; Goebel, T.; Angioni, C.; Wurglics, M.; et al. A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (18), 7703–7724.
- (297) Heitel, P.; Gellrich, L.; Kalinowsky, L.; Heering, J.; Kaiser, A.; Ohrndorf, J.; Proschak, E.; Merk, D. Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (2), 203–208.
- (298) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; et al. Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (16).
- (299) Fujii, S.; Kano, A.; Songkram, C.; Masuno, H.; Taoda, Y.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Synthesis and Structure-Activity Relationship of p-Carborane-Based Non-Secosteroidal Vitamin D Analogs. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (4), 1227–1235.
- (300) Takamatsu, K.; Takano, A.; Yakushiji, N.; Morohashi, K.; Morishita, K.; Matsuura, N.;

- Makishima, M.; Tai, A.; Sasaki, K.; Kakuta, H. The First Potent Subtype-Selective Retinoid X Receptor (RXR) Agonist Possessing a 3-Isopropoxy-4-Isopropylphenylamino Moiety, NEt-3IP (RXR α / β -Dual Agonist). *ChemMedChem* **2008**, *3* (5), 780–787.
- (301) Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5235–5266.
- (302) Field, G. F.; Vermeulen, J. R.; Zally, W. J. Cycloalkylthiazole Derivatives. EP 0 355 353 A2. Filed July 07, 1989.
- (303) Field, G. F.; Vermuelen, J. R.; Zally, W. J. Cycloalkylthiazoles. United States Patent 5,001,140. Filed June 13, 1989.
- (304) Wermuth, C. G. Selective Optimization of Side Activities: Another Way for Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (6), 1303–1314.
- (305) Wermuth, C. G. Selective Optimization of Side Activities: The SOSA Approach. *Drug Discov. Today* **2006**, *11* (3–4), 160–164.
- (306) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (36), 3437–3440.
- (307) Batsanov, S. S. Van Der Waals Radii of Elements. *Inorg. Mater.* **2001**, *37* (9), 871–885.
- (308) Moriguchi, I.; Kanada, Y. Use of van Der Waals Volume in Structure-Activity Studies. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25* (5), 926–935.
- (309) Meanwell, N. A. Fluorine and Fluorinated Motifs in the Design and Application of Bioisosteres for Drug Design. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (14), 5822–5880.
- (310) Sewald, N.; Hollweck, W.; Miitze, K.; Schierlinger, C.; Seymour, L. C.; Gaa, K.; Burger, K.; Koksche, B.; Jakubke, H. D. Peptide Modification by Introduction of Alpha-Trifluoromethyl Substituted Amino Acids. *Amino Acids* **1995**, *8*, 187–194.
- (311) Pollinger, J.; Schierle, S.; Gellrich, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heitel, P.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D. A Novel Biphenyl-Based Chemotype of Retinoid X Receptor Ligands Enables Subtype and Heterodimer Preferences. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1346–1352.
- (312) Gehringer, M.; Laufer, S. A. Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (12), 5673–5724.
- (313) Kuenzli, S.; Saurat, J.-H. Effect of Topical PPAR β / δ and PPAR γ Agonists on Plaque Psoriasis. *Dermatology* **2003**, *206* (3), 252–256.
- (314) Kippenberger, S.; Bernd, A.; Kaufmann, R.; Bock, A.; Thaci, D.; Kock, M.; Gassenmeier, T. Use of Pirinixic Acid and Its Salts in Topical Preparations for Treating Chronic Inflammatory Diseases, Especially Psoriasis. WHO Patent WO 2005/107874 A2. Filed April 30, 2005.
- (315) Chiba, T.; Takeuchi, S.; Esaki, H.; Yamamura, K.; Kurihara, Y.; Moroi, Y.; Furue, M. Topical Application of PPAR α (but Not β / δ or γ) Suppresses Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2012**, *67* (7), 936–942.

- (316) Connop, B. P.; Grant, A.; MacDonald, D.; Nathwani, P. S.; Reiner, P. B.; Zhang, Z. Compounds, Compositions and Methods for Modulating Beta-Amyloid Production. United States Patent. US 2003/0191144 A1. Filed Dec 19, 2002.
- (317) Cunard, R.; DiCampli, D.; Archer, D. C.; Stevenson, J. L.; Ricote, M.; Glass, C. K.; Kelly, C. J. WY14,643, a PPAR α Ligand, Has Profound Effects on Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* **2002**, *169* (12), 6806–6812.
- (318) Schubert-Zsilavec, M.; Syha, Y.; Kock, M.; Rau, O.; Kippenberger, S.; Steinhilber, D.; Popescu, L. Derivate Des Pyrimidins Und Triazins Und Deren Verwendung.
- (319) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (8), 2529–2591.
- (320) Siebert, C. D. Arzneistoffentwicklung: Das Bioisosterie-Konzept. *Chemie Unserer Zeit* **2004**, *38* (5), 320–324.
- (321) Koh, M.; Park, J.; Koo, J. Y.; Lim, D.; Cha, M. Y.; Jo, A.; Choi, J. H.; Park, S. B. Phenotypic Screening to Identify Small-Molecule Enhancers for Glucose Uptake: Target Identification and Rational Optimization of Their Efficacy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53* (20), 5102–5106.
- (322) Choi, J. H.; Banks, A. S.; Estall, J. L.; Kajimura, S.; Boström, P.; Laznik, D.; Ruas, J. L.; Chalmers, M. J.; Kamenecka, T. M.; Blüher, M.; et al. Anti-Diabetic Drugs Inhibit Obesity-Linked Phosphorylation of PPAR γ 3 by Cdk5. *Nature* **2010**, *466* (7305), 451–456.
- (323) Jang, J. Y.; Koh, M.; Bae, H.; An, D. R.; Im, H. N.; Kim, H. S.; Yoon, J. Y.; Yoon, H. J.; Han, B. W.; Park, S. B.; et al. Structural Basis for Differential Activities of Enantiomeric PPAR γ Agonists: Binding of S35 to the Alternate Site. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2017**, *1865* (6), 674–681.
- (324) Lee, M. A.; Tan, L.; Yang, H.; Im, Y. G.; Im, Y. J. Structures of PPAR γ Complexed with Lobeglitazone and Pioglitazone Reveal Key Determinants for the Recognition of Antidiabetic Drugs. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–11.
- (325) Schneider, G. Automating Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *17* (2), 97–113.
- (326) O'Donnell, M. Ro 24-5913: A Potent, Specific, Orally Active LTD4 Antagonist. *Ann. New York Acad. Sci.* **1991**, *629*, 413-415.
- (327) O'Donnell, M.; Crowley, H. J.; Varemko, B.; O'Neill, N.; Welton, A. F. Pharmacologic Actions of Ro 24-5913, a Novel Antagonist of Leukotriene D4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259* (2), 751–758.
- (328) Schneider, N.; Lange, G.; Hindle, S.; Klein, R.; Rarey, M. A Consistent Description of HYdrogen Bond and DEhydration Energies in Protein–Ligand Complexes: Methods behind the HYDE Scoring Function. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, *27* (1), 15–29.
- (329) Ruggeri, C.; Drinkwater, N.; Sivaraman, K. K.; Bamert, R. S.; McGowan, S.; Paiardini, A. Identification and Validation of a Potent Dual Inhibitor of the P. Falciparum M1 and M17 Aminopeptidases Using Virtual Screening. *PLoS One* **2015**, *10* (9), 1–16.
- (330) Gaieb, Z.; Liu, S.; Gathiaka, S.; Chiu, M.; Yang, H.; Shao, C.; Feher, V. A.; Walters, W. P.; Kuhn, B.; Rudolph, M. G.; et al. D3R Grand Challenge 2: Blind Prediction of Protein–Ligand Poses, Affinity Rankings, and Relative Binding Free Energies. *J.*

- Comput. Aided. Mol. Des.* **2018**, 32 (1), 1–20.
- (331) dos Santos, J. C.; Bernardes, A.; Giampietro, L.; Ammazalorso, A.; De Filippis, B.; Amoroso, R.; Polikarpov, I. Different Binding and Recognition Modes of GL479, a Dual Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α/γ . *J. Struct. Biol.* **2015**, 191 (3), 332–340.
- (332) Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; Klebe, G. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261 (3), 470–489.
- (333) LeadIT Version 2.3.2; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany, 2017, www.Biosolveit.de/LeadIT.
- (334) SeeSAR Version 7.1; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany, 2019, www.Biosolveit.de/SeeSAR.
- (335) Berthold, M. R.; Cebon, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kötter, T.; Meinel, T.; Ohl, P.; Sieb, C.; Thiel, K.; Wiswedel, B. KNIME: The Konstanz Information Miner. In *Data Analysis, Machine Learning and Applications*; Preisach, C., Burkhardt, H., Schmidt-Thieme, L., Decker, R., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; pp 319–326.
- (336) KNIME, Version 3.3.3-201708231218, www.knime.com.
- (337) RDKit: Open-Source Cheminformatics, Version 3.2.4-V201711201106 <http://www.RdKit.Org>.
- (338) BioSolveIT Nodes Version 2.5.0.0001024; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany, 2019, www.Biosolveit.de/KNIME.
- (339) Bento, A. P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L. J.; Chambers, J.; Davies, M.; Krüger, F. A.; Light, Y.; Mak, L.; McGlinchey, S.; et al. The {ChEMBL} Bioactivity Database: An Update. *Nucleic Acids Res* **2014**, 42 (Database issue), D1083–90.
- (340) Morgan, H. L. The Generation of a Unique Machine Description for Chemical Structures-A Technique Developed at Chemical Abstracts Service. *J. Chem. Doc.* **1965**, 5 (2), 107–113.
- (341) Durant, J. L.; Leland, B. A.; Henry, D. R.; Nourse, J. G. Reoptimization of MDL Keys for Use in Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42 (6), 1273–1280.
- (342) Carhart, R. E.; Smith, D. H.; Venkataraghavan, R. Atom Pairs as Molecular Features in Structure-Activity Studies: Definition and Applications. *J. Chem. Inf. Model.* **1985**, 25 (2), 64–73.
- (343) Ballabio, D.; Grisoni, F.; Todeschini, R. Multivariate Comparison of Classification Performance Measures. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2018**, 174, 33–44.
- (344) Pollinger, J.; Schierle, S.; Neumann, S.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Merk, D. Computer-assisted Selective Optimization of Side-activities - from Cinalukast to a PPAR α Modulator. *ChemMedChem* **2019**, 14 (14), 1343–1348.
- (345) Cerep Frankreich, Celle L'Evescault, <https://www.Eurofins.Com>; Referenznummer des Assays: 1607.
- (346) FlexX Version 4.1; BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin, Germany, 2019, www.Biosolveit.de/FlexX.

- (347) Chawla, A.; Repa, J. J.; Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors and Lipid Physiology: Opening the X-Files. *Science* **2001**, *294* (5548), 1866–1870.
- (348) Huang, J. K.; Franklin, R. J. M. Regenerative Medicine in Multiple Sclerosis: Identifying Pharmacological Targets of Adult Neural Stem Cell Differentiation. *Neurochem. Int.* **2011**, *59* (3), 329–332.
- (349) Mariani, M. M.; Malm, T.; Lamb, R.; Jay, T. R.; Neilson, L.; Casali, B.; Medarametla, L.; Landreth, G. E. Neuronally-Directed Effects of RXR Activation in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (February), 1–12.

7. Abkürzungsverzeichnis

9-cRA	9-cis-Retinsäure <i>engl.: 9-cis-Retinoic acid</i>	GAPDH	Glyzerylaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Aβ	β -Amyloid	HDL	Lipoprotein hoher Dichte <i>engl.: high density lipoprotein</i>
ABCA1	Transporter mit ATP-bindender Kasette A1 <i>engl.: ATP-binding cassette transporter A1</i>	IFN	Interferon
AD	Alzheimer Erkrankung <i>engl.: Alzheimer's Disease</i>	IL	Interleukin
ADH2	Aldehyddehydrogenase 2	IR	invertierte Wiederholung <i>engl.: inverted repeat</i>
AF	Aktivierungsfunktion	KNIME	Konstanz Information Miner
ANGPTL	Angiopoetin-ähnliches Protein 4 <i>engl.: angiopoetin-like peptide 4</i>	LBD	Ligandenbindedomäne
ApoE	Apolipoprotein E	LDL	Lipoprotein niedriger Dichte <i>engl.: low density lipoprotein</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke	LO	Lipoxygenase
COMT	Catechol-O-Methyltransferase	LPS	Lipopolysaccharid
CTE	C-terminale Verlängerung <i>engl.: C-terminal extension</i>	LXR	Leber X Rezeptor
CysLT₁R	Cysteinylleukotrienrezeptor 1	MAO-B	Monoaminoxidase-B
DHA	Docosahexaensäure <i>engl.: Docosahexanoic acid</i>	MBP	Myelin-basisches Protein
DBD	DNS-Bindungsdomäne	MP	Morbus Parkinson
DMF	Dimethylformamid	MS	Multiple Sklerose
DNS	Desoxyribonukleinsäure	MW	Mittelwert
DR	Direkte Wiederholung <i>engl.: direct repeat</i>	NCoR1	nukleärer Corepressor 1
EAE	Experimentelle Autoimmun Enzephalomyelitis	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
FXR	Farnesoid X Rezeptor	NR	Nukleäre Rezeptoren
		OL	Oligodendrozyt
		OPC	Oligodendrozyten-Vorläuferzelle <i>engl.: oligodendrocyte progenitor cell</i>
		PGC-1α	PPAR γ -Coaktivator 1 α
		PPAR	Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor

PPRE	PPAR Response Element	SREBP-1c	regulatorisches Sterol-Bindungselement-1c <i>engl.: sterol regulatory binding-element-1c</i>
PR	palindromische Wiederholung <i>engl.: palindromic repeat</i>	sPPARγM	selektive PPAR γ Modulatoren
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion <i>engl.: quantitative real-time polymerase chain reaction</i>	SRC-1	Steroidrezeptor Coaktivator 1
RAR	Retinsäure Rezeptor <i>engl.: retinoic acid receptor</i>	Std	Stunden
RE	Erkennungssequenz <i>engl.: Response Element</i>	THF	Tetrahydrofuran
RNA	Ribonukleinsäure <i>engl.: ribonucleic acid</i>	TNFα	Tumornekrosefaktor α
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose <i>engl.: relapsing remitting multiple sclerosis</i>	TR	Thyroidhormonrezeptor
rt	Raumtemperatur	TSH	Thyrotropin <i>engl.: thyroid-stimulating hormone</i>
RXR	Retinoid X Rezeptor	u. a.	unter anderem
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung <i>engl.: structure-activity relationship</i>	VDR	Vitamin D Rezeptor
SD	Standardabweichung <i>engl.: standard deviation</i>	VL	Volllänge
S.E.M.	Standardfehler <i>engl.: standard error of the mean</i>	z. B.	zum Beispiel
SMRT	dämpfender Mediator des Retinoid- und Thyroidhormonrezeptors <i>engl.: silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor</i>	ZNS	Zentrales Nervensystem
SOSA	selektive Optimierung von Nebenaktivitäten <i>engl.: selective optimization of side-activities</i>		

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Allgemeiner Aufbau nukleärer Rezeptoren.....	- 11 -
Abbildung 2 Schematische Darstellung der DBD.....	- 12 -
Abbildung 3 Prinzip der Aktivierung nukleärer Rezeptoren durch konformellen Veränderung	- 12 -
Abbildung 4 Schematische Darstellung der verschiedene Bindungsmodi von Heterodimeren in Abhängigkeit der RE-Sequenz.	- 13 -
Abbildung 5 Zweidimensionale Darstellung des Bindemodus der 9-cis Retinsäure (2) im RXR α . -	- 18 -
Abbildung 6 Strukturen wichtiger natürlicher RXR-Liganden	- 20 -
Abbildung 7 Zweidimensionale Darstellung der Interaktion von Bexaroten (1) mit der Ligandbindestelle von RXR α	- 21 -
Abbildung 8 Synthetische RXR-Agonisten der verschiedenen Klassen.....	- 23 -
Abbildung 9 Auswirkungen und Funktionen von PPAR α auf den Energiehaushalt, das ZNS und das Immunsystem	- 25 -
Abbildung 10 Auswirkungen und Funktionen von PPAR γ auf den Energiehaushalt, das ZNS und das Immunsystem	- 26 -
Abbildung 11 Auswirkungen und Funktionen von PPAR δ auf den Energiehaushalt, das ZNS und das Immunsystem	- 27 -
Abbildung 12 Endogene und synthetische Liganden der Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren α , γ und δ	- 29 -
Abbildung 13 9-cis Retinsäure	- 37 -
Abbildung 14 3',5'-Di-tert-butyl-(1,1'-biphenyl)-4-carbonsäure (18) als RXR-Agonist.....	- 38 -
Abbildung 15 Das Fettsäuremimetikum Wy14,643 (19) als Leitstruktur	- 39 -
Abbildung 16 CysLT ₁ R-Antagonist Cinalukast (20)	- 39 -
Abbildung 17 Leitstruktur 18 mit besonderem Aktivitätsprofil.....	- 41 -
Abbildung 18 Dosis-Wirkungs-Kurven von 32	- 43 -
Abbildung 19 Zusammenfassung der Effekte am ersten Ring der Biphenylstruktur	- 44 -
Abbildung 20 Dosis-Wirkungs-Kurven von 33	- 44 -
Abbildung 21 Dosis-Wirkungs-Kurven von 41 und 42	- 46 -
Abbildung 22 Vollängen-Reporterassay zur Untersuchung agonistischer Effekte	- 48 -
Abbildung 23 Vollängen-Reporterassay zur Untersuchung von synergistischen oder antagonistischen Effekten.....	- 48 -
Abbildung 24 Kristallstruktur von 41 in der LBD von RXR α	- 49 -
Abbildung 25 Überlagerung der Kristallstruktur von RXR α mit 41 und Bexaroten (1).....	- 50 -
Abbildung 26 Aktivitätsprofil von Wy14,643 (19).....	- 51 -
Abbildung 27 Vergleich von Wy14,643 (19) mit Bexaroten (1)	- 52 -
Abbildung 28 Leitstruktur 19 und die optimierten Derivate 44 , 52 und 57	- 55 -
Abbildung 29 Vergleich der Löslichkeit in Wasser der Leitstruktur (19), dem RXR-selektiven Derivat 57 und dem Referenzagonisten Bexaroten (1)	- 56 -
Abbildung 30 In vitro pharmakologische Charakterisierung von 57	- 57 -
Abbildung 31 In vitro pharmakologische Untersuchung des potentiellen Nebenwirkungsprofils von 57	- 57 -
Abbildung 32 Ergebnisse der pharmakokinetischen in vivo Studie von 57	- 58 -
Abbildung 33 Ergebnisse der in vivo pharmakologischen Untersuchungen.....	- 58 -
Abbildung 34 Kristallstruktur von 57 in der Bindung mit RXR α	- 59 -
Abbildung 36 Derivate von Wy14,643 und ihre Selektivitätsprofile.....	- 60 -
Abbildung 35 Kristallstruktur von 52 in PPAR γ	- 60 -
Abbildung 37 Cinalukast (20) und 81	- 63 -
Abbildung 38 Korrelation der kalkulierten freien Bindungsenergie mit in vitro ermittelten EC ₅₀ -Werten	- 64 -

Abbildung 39 Ergebnisse des computergestützten SOSA-Ansatzes.....	- 65 -
Abbildung 40 Aktivitätsprofil der Leitstruktur 18 und ausgewählter Derivate.....	- 68 -
Abbildung 41 Bexaroten (1) und die neue Leitstruktur Wy14,643 (19).	- 69 -
Abbildung 42 Optimierte Derivate von 19 mit selektivem und dual-aktivem Aktivitätsprofil.....	- 70 -
Abbildung 43 CysLT1R-Antagonist Cinalukast (20)	- 70 -

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Humane nukleäre Rezeptoren.....	- 10 -
Tabelle 2 Unterschiedliches Ansprechen der nukleären Rezeptoren auf vorhandene Kombinationsmöglichkeiten der jeweiligen Agonisten	- 15 -
Tabelle 3 Untersuchung des Einflusses von Monosubstitution auf das Aktivitätsprofil der Biphenyle...	- 42 -
Tabelle 4 Untersuchung des Einflusses von Doppelsubstitution auf das Aktivitätsprofil der Biphenyle	- 43 -
Tabelle 5 Untersuchung des Einflusses der Carbonsäurekette und -position auf das Aktivitätsprofil der Biphenyle	- 44 -
Tabelle 6 Untersuchung des Einflusses von Derivatisierungen am Benzoessäurering auf das Aktivitätsprofil der Biphenyle.....	- 45 -
Tabelle 7 Kombination verschiedener selektivitäts- und/oder potenzvermittelnder Derivate der Biphenyle	- 46 -
Tabelle 8 SAR von Wy14,643: Variationen am α -C-Atom und Ersatz des zentral Chlorsubstituenten ..	- 53 -
Tabelle 9 SAR von Wy14,643: Variationen am Thioether und verbrückendem Amin.....	- 53 -
Tabelle 10 SAR von Wy14,643: Variationen am 2,3-Dimehtlyphenylsubstituenten.....	- 54 -
Tabelle 11 Aktivitätsprofil des RXR-optimierten Derivats von Wy14,643	- 55 -

10. Schemenverzeichnis

Schema 1 Synthese der Biphenylderivate.....	- 41 -
Schema 2 Synthese von 52	- 54 -
Schema 3 Synthese des kombiniert RXR-favorisierenden Derivates 57	- 55 -
Schema 4 Synthese der Cinalukast-Derivate 78, 79 und 80	- 62 -

11. Publikationsliste

Dieser Arbeit zugrundeliegende Publikationen:

- **Pollinger, J.;** Schierle, S.; Gellrich, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heitel, P.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D. A novel biphenyl-based chemotype of retinoid X receptor ligands enables subtype- and heterodimer-preference. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1346-1352. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00306>

Eigener Beitrag: Synthese aller Verbindungen, vollständige Charakterisierung der Substanzen durch Gal4-Hybrid-Reporterassays sowie Durchführung des PPAR- und LXR-Vollängenassays. Verfassen des Manuskripts.

- **Pollinger, J.;*** Schierle, S.;* Neumann, S.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Merk, D. Computer-assisted Selective Optimization of Side-activities - from Cinalukast to a PPAR α Modulator. *ChemMedChem* **2019**, *14* (14), 1343–1348. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900286>.

Eigener Beitrag: Etablierung des computergestützten Arbeitsablaufs, Design der virtuellen Cinalukast-Analoga für die Untersuchungen. computergestützte Untersuchung und Klassifizierung der Analoga in Bezug auf ihre PPAR α agonistischen Eigenschaften, sowie computergestützte Klassifizierung der Analoga in Bezug auf ihre Eigenschaften als CysLT1-Antagonisten. Durchführung der Reporterassays.

* *Hier liegt eine geteilte Erstantorenschaft zwischen J.P. und S.S. vor.*

- **Pollinger, J.;** Gellrich, L.; Schierle, S.; Kilu, W.; Schmidt, J.; Kalinowsky, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heering, J.; Proschak, E.; et al. Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (4), 2112–2126. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b0848>.

Eigener Beitrag: Synthese der neuen Verbindungen, vollständige Charakterisierung aller Substanzen durch Gal4-Hybrid-Reporterassays sowie Durchführung des PPAR-Vollängenassays, der Quantifizierung der RXR-regulierten mRNA Expression und Toxizitätsmessung. Verfassen des Manuskripts.

- **Pollinger, J.;** Merk, D. Therapeutic Applications of the Versatile Fatty Acid Mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27* (4), 517–525. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1272578>.

Eigener Beitrag: Literaturrecherche und Verfassen des Manuskripts.

Weitere Publikationen:

- Gellrich, L.; Heitel, P.; Heering, J.; Kilu, W.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Arifi, S.; **Pollinger, J.**; Pogoda, W.; Paulke, A.; Steinhilber, D.; Proschak, E.; Wurglics, M.; Schubert-Zsilavec, M.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Bischoff, I.; Fürst, R.; Merk, D.: Direct PPAR γ activation by L-thyroxin and TETRAC links thyroid hormone and PPAR signaling. **2019** *submitted*.

Eigener Beitrag: Quantifizierung der PPAR γ -regulierten mRNA Expression aus Lebergewebe aus dem Tierversuch.

- Gabler, M.; Kramer, J.; Schmidt, J.; **Pollinger, J.**; Weber, J.; Kaiser, A.; Löhr, F.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavec, M.; Merk, D. Allosteric Modulation of the Farnesoid X Receptor by a Small Molecule. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25158-5>.

Eigener Beitrag: Durchführung der Reporterassays zum Selektivitätsscreening, Quantifizierung der FXR-regulierten mRNA Expression.

Sonstige Publikationen:

Pollinger, J.; Schubert-Zsilavec, M.: Hepatitis B and C – on the way to curable diseases. *Pharmakon* **2019**, 7 (6), 447-452.

Pollinger, J.; Schubert-Zsilavec, M.: Malaria – Distribution, Therapy and Drugs in the Pipeline. *Pharmakon* **2018**, 6 (7), 212–218.

Merk, D.; **Pollinger, J.**; Schubert-Zsilavec, M.: Gallensäuren – viel mehr als nur Lösungsvermittler. *Pharmazeutische Zeitung* **2016**, 28

12. Kooperationspartner

Sofern nicht anders durch Quellenangabe oder Danksagung angegeben, wurde die vorgelegte Arbeit von mir unter der Aufsicht meiner Betreuer während meines Promotionsstudiums erstellt. Alle Beiträge von Kollegen sind explizit in dieser Dissertation gekennzeichnet.

Für die Erstellung einiger Abbildungen wurde Material von <https://smart.servier.com/> genutzt und bearbeitet. Die Nutzung dieses Materials geschah mit erteilter Genehmigung:

“This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/> or send a letter to Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.”

Für die Erstellung der Abbildungen von Kristallstrukturen wurde UCSF Chimera genutzt: “Molecular graphics and analyses performed with UCSF Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311.”

Nachfolgend aufgelistetes Material/Ergebnisse/Daten wurde im Zuge kollaborativer Forschung erhalten:

Biphenyle als neuartige Ligandstruktur zur präferenziellen Aktivierung einzelner RXR-Subtypen oder RXR-Heterodimerpartner

- Lösen der Kristallstruktur der RXR α – LBD im Komplex mit **41** durch Dr. Apirat Chaikuad, AK Prof. Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Reinheitsanalysen, Bestimmung der Löslichkeit in Wasser und Lipophilie durch Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf, AK Prof. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Wy14,643 als Leitstruktur für selektive und duale PPAR und RXR Modulation

- Lösen der Kristallstrukturen der PPAR γ -LBD im Komplex mit **52** und der RXR α – LBD im Komplex mit **57** durch Dr. Apirat Chaikuad, AK Prof. Knapp, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) – Experimente: Durchgeführt und ausgewertet durch Leonie Gellrich, AK Prof. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main. Rekombinante RXR α - und PPAR γ -LBD bereitgestellt durch Dr. Jan Heering, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Frankfurt.
- Abbildung 27: Bestimmung der Löslichkeit in Wasser und Lipophilie durch Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf, AK Prof. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main. Eigener Anteil: Erstellung der Abbildung

- Reinheitsanalysen und Bestimmung der metabolischen Stabilität durch Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf, AK Prof. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Computergestützte selektive Optimierung der Nebenaktivität von Cinalukast an PPAR α

- Schema 4: Synthese der Substanzen **78**, **79** und **80** durch Simone Schierle und Sebastian Neumann, AK Prof. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Reinheitsanalysen, Bestimmung der Löslichkeit in Wasser und Lipophilie durch Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf, AK Prof. Schubert-Zsilavec, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Die folgenden Teile der Dissertation wurden zuvor veröffentlicht:

- Abbildung 30 – 33: bearbeitet aus [130], Genehmigung durch American Chemical Society (2019) erteilt.
- Abbildung 39: Bearbeitet aus [344], Genehmigung durch Wiley & Sons (2019) erteilt.
- Schema 4: Bearbeitet aus [344], Genehmigung durch Wiley & Sons (2019) erteilt.
- Die Rechte zum Nachdruck der Publikationen wurden eingeholt: [47] Copyright (2017) Taylor & Francis. [130] Copyright (2019) American Chemical Society. [311] Copyright (2019) American Chemical Society. [344] Copyright (2019) Wiley&Sons.

13. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name Julius Carl Pollinger
Adresse Am Bienenstock 12, 60388 Frankfurt am Main
Geburtstag 12.10.1990
Geburtsort Erlenbach am Main
Staatsangehörigkeit deutsch



Werdegang

seit 12/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von Prof. Schubert-Zsilavecz am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt

12/2015 Approbation als Apotheker (Gesamtnote: 1,52)

11/2015 3. Teil der pharmazeutischen Prüfung (Note: 1,0)

05/2015 – 10/2015 Zweite Hälfte des Praktischen Jahres in der „Breisgau Apotheke am Hauptbahnhof“ in Freiburg im Breisgau.

11/2014 – 04/2015 Erste Hälfte des Praktischen Jahres bei „Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH“ in Freiburg im Breisgau im Bereich „Product and Process Development – Analytical Services“.

10/2010 – 10/2014 Studium der Pharmazie an der Goethe-Universität Frankfurt
10/2014 2. Teil der pharmazeutischen Prüfung (Note: 1,4)
09/2012 1. Teil der pharmazeutischen Prüfung (Note: 2,25)

09/2001 – 06/2010 Hermann-Staudinger-Gymnasiums Erlenbach am Main (Abitur: 1,4)

09/1997 – 07/2001 Grundschule Röllfeld

Tagungsbesuche

09/2019 EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Athen.
Poster: Computer-assisted selective optimization of side activities - from cinalukast to a PPAR α modulator

03/2019 DPhG-Doktorandentagung bei Merck, Darmstadt.
Vortrag: Tuning the nuclear receptor selectivity of Wy14,643 towards selective retinoid X receptor modulation

03/2019 EUFEPS Annual Meeting, Frankfurt am Main.
Poster: Tuning the nuclear receptor selectivity of Wy14,643 towards selective retinoid X receptor modulation

- 10/2019** Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, Hamburg.
Poster: Tuning the nuclear receptor selectivity of Wy14,643 towards selective and dual modulation of PPAR and RXR
- 12/2017** Lipid Meeting, Leipzig.
- 09/2017** Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, Saarbrücken.
Poster: Structure-activity relationship of lipid-lowering agent pirinixic acid on PPAR and RXR
- 10/2016** Annual Meeting of the German Pharmaceutical Society – DPhG, München.
Poster: Pan retinoid X receptor agonism causes side-effects of lipid-lowering agent pirinixic acid

Lehrerfahrung

- seit 12/2015** Betreuung des Praktikums „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe (unter Einbeziehung von Arzneibuchmethoden)“ und Lehrbeteiligung am zugehörigen Seminar „Allgemeine Chemie“ für Studierende im 1. Semester Pharmazie an der Goethe-Universität Frankfurt

Auszeichnungen und Zertifikate

- Zertifikat über die *“Fortbildungsveranstaltung gemäß §15 GenTSV zur Sicherheit in der Gentechnik“*
1. Platz in der Scientific Challenge “Summer 2017” von BioSolveIT
- Zertifikat für Hochschuldidaktik

14. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung im Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Bereich unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den

Julius Carl Pollinger

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

.....
.....
.....

selbstständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den

Julius Carl Pollinger

15. Danksagung

Das Verfassen dieser Dissertation wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler für mich wichtiger Personen nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich meine tiefempfundene Dankbarkeit ausdrücken.

- PD Dr. Daniel Merk für die unermüdliche Unterstützung und Betreuung, die ansteckende Begeisterung für die Forschungsthemen und das richtige Wort zur richtigen Zeit.
- Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die Gelegenheit in seinem Arbeitskreis zu promovieren und das entgegengebrachte Vertrauen.
- Leonie Gellrich für eine großartige Zeit im gemeinsamen Labor. Deine unerschütterliche gute Laune und dein Zuspruch haben vieles leichter gemacht.
- Dr. Mario Wurglics dafür, dass du mich in Schladming sicher von diesem Berg geführt und mir gleichzeitig das Skifahren beigebracht hast.
- Dr. Sun-Yee Cheung und Simone Schierle für die stetige Unterstützung in synthetischen Fragen, gute Stimmung im Labor und die Bereitschaft als Tennis-Sparring-Partner herzuhalten.
- Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf für die Analytik und Bestimmungen meiner Substanzen, besonders wenn es mal wieder schnell gehen musste.
- Dr. Pascal Heitel, Moritz Helmstädter, Sabine Willems, Simone Schierle und Julia Roth für die kritischen Korrekturen dieser Arbeit.
- Meinen tollen Kollegen im Arbeitskreis Schubert-Zsilavecz für die großartige Atmosphäre, die Möglichkeit jedes Problem zu besprechen und immer wieder von allen Problemen abgelenkt zu werden. Vielen Dank!
- Meinen Brüdern, die mich immer angespornt haben.
- Meinen Eltern, die mir immer das Gefühl gegeben haben, alles erreichen zu können.
- Julia Roth dafür, dass du dir nicht nur alle meine Geschichten anhörst, sondern mir auch sagst, wann es Zeit ist, über etwas anderes zu sprechen. Du hast mir geholfen in dieser Zeit meinen Weg nicht zu verlieren.

16. Nachdrucke der Publikationen

16.1 A Novel Biphenyl-based Chemotype of Retinoid X Receptor Ligands Enables Subtype and Heterodimer Preferences

Pollinger, J.; Schierle, S.; Gellrich, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heitel, P.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D. A Novel Biphenyl-Based Chemotype of Retinoid X Receptor Ligands Enables Subtype and Heterodimer Preferences. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1346–1352.

Reprinted with permission from Pollinger, J.; Schierle, S.; Gellrich, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heitel, P.; Chaikuad, A.; Knapp, S.; Merk, D. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1346–1352. Copyright (2019) American Chemical Society.

A Novel Biphenyl-based Chemotype of Retinoid X Receptor Ligands Enables Subtype and Heterodimer Preferences

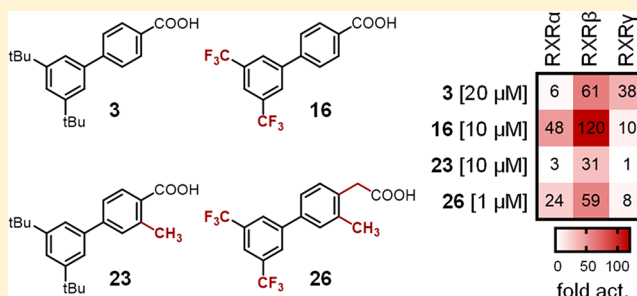
Julius Pollinger, Simone Schierle, Leonie Gellrich, Julia Ohrndorf, Astrid Kaiser, Pascal Heitel,^{1b} Apirat Chaikuad,^{1b} Stefan Knapp,^{1b} and Daniel Merk^{*1b}

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438 Frankfurt, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: The nuclear retinoid X receptors (RXRs) are key ligand sensing transcription factors that serve as universal nuclear receptor heterodimer partners and are thus involved in numerous physiological processes. Therapeutic targeting of RXRs holds high potential but available RXR activators suffer from limited safety. Selectivity for RXR subtypes or for certain RXR heterodimers are promising strategies for safer RXR modulation. Here, we report systematic structure–activity relationship studies on biphenyl carboxylates as new RXR ligand chemotype. We discovered specific structural modifications that enhance potency on RXRs, govern subtype preference, and vary modulation of different RXR heterodimers. Fusion of these structural motifs enabled specific tuning of subtype preferential profiles with markedly improved potency. Our results provide further evidence that RXR subtype selective ligands can be designed and present a novel chemotype of RXR modulators that can be tuned for subtype and heterodimer preferences.

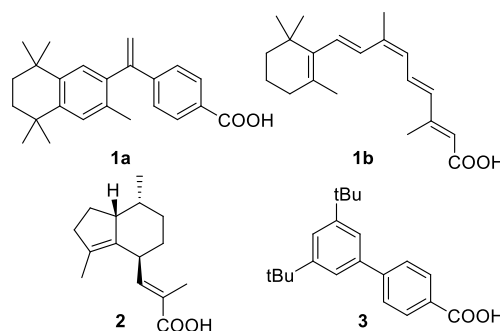
KEYWORDS: Nuclear receptor, retinoids, selectivity, neurodegeneration, cancer



The ligand-sensitive transcriptional regulator retinoid X receptor (RXR)¹ has a unique role among nuclear receptors (NRs). As universal partner receptor, RXR forms heterodimers with several NRs such as liver X receptors (LXRs), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), farnesoid X receptor (FXR), and thyroid hormone receptors (THRs), which respond to ligands of both partners in the dimer.² Thereby, RXR regulates numerous physiological processes ranging from cell differentiation over metabolic balance to inflammation.² To date, RXR has only a subordinate therapeutic relevance in cancer treatment with the pan-RXR agonist bexarotene (**1a**, Scheme 1) as sole drug approved synthetic RXR agonist. According to recent data, RXR may hold enormous potential for the treatment of neurodegenerative diseases.^{3,4} However, safety issues of available RXR agonists concerning adverse effects on lipid homeostasis⁵ and thyroid hormone signaling⁶ prevent further exploration of RXR as therapeutic target in such indications.

Ligands with selectivity for the three RXR subtypes (RXR α , RXR β , and RXR γ), which markedly differ in their expression patterns, and/or for RXR heterodimers are putative strategies to improve the safety of RXR modulators.^{7,8} However, the ligand binding sites of all three RXRs are identical in all pocket forming residues,⁷ which renders the design of selective ligands a challenging endeavor. While some heterodimer preferential RXR ligands have been described^{9–12} demonstrating that heterodimer selectivity can be achieved, little is known about designing RXR subtype selectivity, and only the natural

Scheme 1. RXR Agonists Bexarotene (**1a**), 9-*cis* Retinoic Acid (**1b**), Selective RXR β Activator Valeric Acid (**2**), and Lead Compound **3**



product valeric acid (**2**)¹³ has been reported as a subtype selective RXR ligand, to date. The failure to discover subtype selective RXR activators may in part be due to the limited number of diverse scaffolds¹⁴ that have been systematically studied as RXR ligands, which mostly mimic the L-shape of 9-*cis* configured vitamin A metabolites such as **1b** as putative endogenous RXR ligands. Here, we evaluate a new RXR ligand chemotype derived from **3**¹⁴ that does not comprise this

Received: July 8, 2019

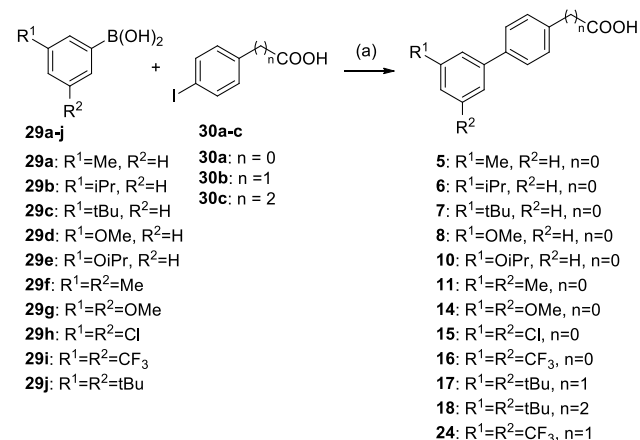
Accepted: August 16, 2019

Published: August 16, 2019

typical rexinoid geometry for its potential to overcome these issues. We have conducted systematic structure–activity relationship (SAR) studies (compounds 4–28) concerning RXR potency, as well as subtype and heterodimer selectivity. We discovered structural modifications enabling subtype and heterodimer preference and developed markedly improved descendants of 3 with specific RXR modulatory profiles.

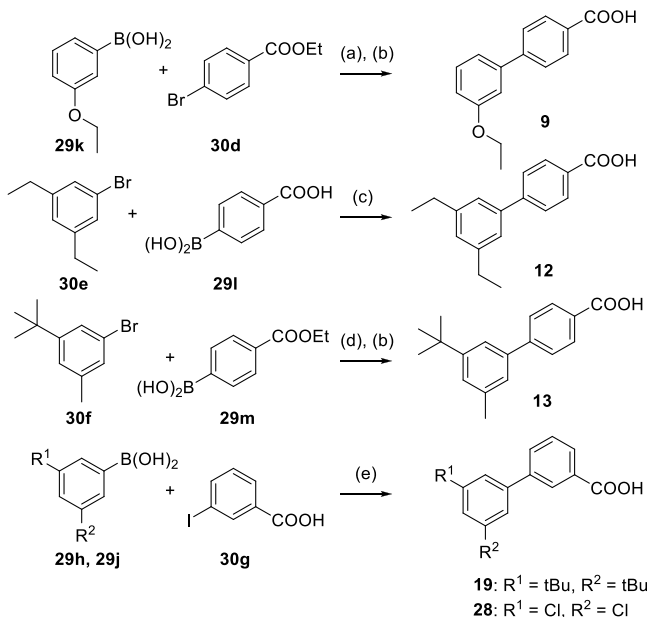
Unsubstituted biphenyl-4-carboxylate (4) was commercially available. RXR ligands 5–28 were prepared according to Schemes 2–4 by Suzuki coupling from commercially available

Scheme 2. Synthesis of 5–8, 10, 11, 14–18, and 24^a



^aReagents and conditions: (a) Pd(PPh₃)₄, dioxane, H₂O, rt, 3–42.5 h, 9–69%.

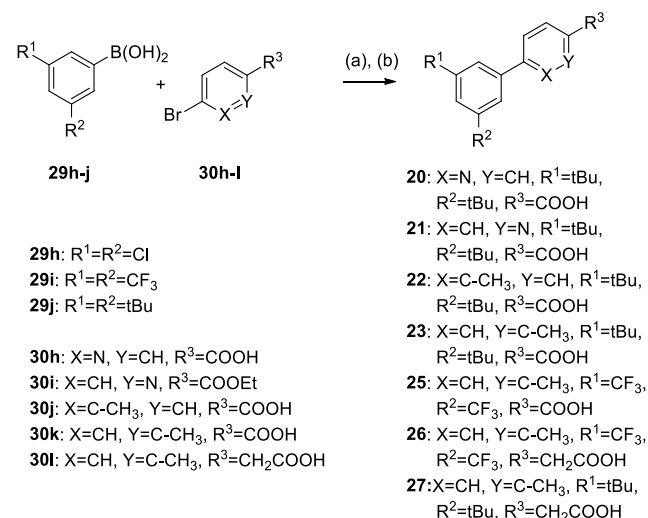
Scheme 3. Synthesis of RXR Ligands 9, 12, 13, 19 and 28^a



^aReagents and conditions: (a) Pd(PPh₃)₄, dioxane, H₂O, rt, 5.5 h, 26%; (b) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 15–18 h, 74–84%; (c) Pd(PPh₃)₄, dioxane, H₂O, rt, 3.5 h, 24%; (d) Pd(PPh₃)₄, dioxane, H₂O, rt, 24 h, 71%; (e) Pd(PPh₃)₄, dioxane, H₂O, rt, 16 h, 4–16%.

aryl halides/aryl boronic acid pairs (Table S1) and biologically characterized in specific Gal4 hybrid reporter gene assays^{15–17} for the RXR α , RXR β , and RXR γ subtypes (Table 1). RXR heterodimer modulation was studied using firefly reporter

Scheme 4. Synthesis of RXR Ligands 20–23 and 25–27^a



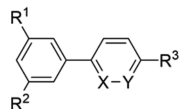
^aReagents and conditions: (a) Pd(PPh₃)₄, dioxane, H₂O, rt, 14–48 h, 3–72%; (b) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 15 h, 73%.

constructs where reporter gene expression is under the control of human response elements for the full-length heterodimers RXR:LXR and RXR:PPAR.^{10,18,19}

Lead compound 3 has recently been reported as a RXR activator with unusual linear scaffold and preference for the RXR β and RXR γ subtypes¹⁴ (Table 1, Figure S1). To systematically study the SAR of 3 and analogues as RXR ligands (Table 1), we first simplified the structure to the unsubstituted biphenyl-4-carboxylate (4), which was inactive on RXRs up to 30 μ M, and the same held true for the 3'-methylbiphenyl-4-carboxylate (5).

With the introduction of an isopropyl (6) or *tert*-butyl (7) moiety in 3'-position, activity was recovered with a shift in the subtype preference profile toward RXR α and RXR β , while activity on RXR γ was low. Therein, both 6 and 7 revealed slight relative preference for RXR β in terms of stronger activation efficacy on this subtype. Consistently, the small 3'-methoxy derivative 8 was inactive up to 30 μ M concentration, while RXR agonism was recovered with increasing alkoxy substituent size in 3'-ethoxy analogue 9 and 3'-isopropoxy derivative 10, which both were RXR α /RXR β activators. In contrast to its alkyl counterpart 6, 10 had no pronounced RXR β subtype-preference over RXR α . Notably, none of the monosubstituted biphenylcarboxylates 5–10 achieved an activation efficacy on RXR γ that was comparable to the strong activity of 3 on this subtype, and while some tendencies for RXR β preference were observed, no structural variation had enhanced potency on RXRs.

When 3',5'-double substitutions as in 3 were reinstated, small alkyl residues, i.e., 3',5'-dimethyl (11) and 3',5'-diethyl (12), achieved considerable potency on RXRs. Both compounds displayed moderate preference for the RXR β subtype concerning activation efficacy, which was more pronounced for 11, while 12 had higher overall potency in terms of lower EC₅₀ values. With asymmetric 3'-*tert*-butyl-5'-methyl substitution (13), subtype preference and activation efficacy dropped markedly to a partial RXR agonistic profile. 3',5'-Dimethoxyderivative 14 was inactive on RXR β and RXR γ at 30 μ M but retained RXR α activation despite weak efficacy. Double chlorine substitution (15) generated strong activity on

Table 1. Biological Activity of 3 and Derivatives 4–28 on RXRs^a


ID	R ¹	R ²	R ³	X	Y	RXR α	RXR β	RXR γ
						EC ₅₀ [μ M] (fold act.)		
3	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-COOH	CH	CH	11.8±0.7 (5.7±0.4)	11.7±0.1 (71±1)	14.1±0.1 (58±1)
4	H	H	-COOH	CH	CH	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M
5	Me	H	-COOH	CH	CH	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M
6	<i>i</i> Pr	H	-COOH	CH	CH	14.3±0.6 (28±1)	16.2±0.2 (65±1)	11.6±0.1 (2.7±0.1)
7	<i>t</i> Bu	H	-COOH	CH	CH	18±2 (19±2)	12.8±0.7 (35±2)	inactive at 20 μ M
8	-OMe	H	-COOH	CH	CH	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M
9	-OEt	H	-COOH	CH	CH	22.5±0.2 (11±1)	30±7 (11±2)	inactive at 30 μ M
10	-OiPr	H	-COOH	CH	CH	10.6±0.6 (18±1)	13.4±0.7 (19±1)	inactive at 20 μ M
11	Me	Me	-COOH	CH	CH	9.6±0.6 (26±1)	18.6±0.2 (97±1)	inactive at 30 μ M
12	Et	Et	-COOH	CH	CH	3.4±0.1 (11±1)	6.7±0.1 (33±1)	inactive at 20 μ M
13	<i>t</i> Bu	Me	-COOH	CH	CH	8.0±0.4 (10±1)	12±2 (8.4±0.9)	inactive at 20 μ M
14	-OMe	-OMe	-COOH	CH	CH	25.4±0.3 (4.8±0.1)	inactive at 30 μ M	inactive at 30 μ M
15	Cl	Cl	-COOH	CH	CH	9.3±0.4 (38±2)	13±1 (68±5)	> 30 μ M
16	CF ₃	CF ₃	-COOH	CH	CH	3.1±0.1 (50±2)	3.7±0.2 (122±4)	12.5±0.4 (25±1)
17	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-CH ₂ COOH	CH	CH	0.47±0.01 (41±1)	0.8±0.2 (126±12)	3.3±0.1 (26±1)
18	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-CH ₂ CH ₂ COOH	CH	CH	1.5±0.2 (21±1)	2.1±0.2 (94±6)	5±2 (17±4)
19	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	H	CH	C-COOH	3.7±0.1 (31±1)	3.1±0.1 (84±1)	inactive at 10 μ M
20	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-COOH	N	CH	inactive at 10 μ M	inactive at 10 μ M	inactive at 10 μ M
21	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-COOH	CH	N	inactive at 10 μ M	inactive at 10 μ M	inactive at 10 μ M
22	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-COOH	C-CH ₃	CH	inactive at 10 μ M	inactive at 10 μ M	inactive at 10 μ M
23	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-COOH	CH	C-CH ₃	inactive at 10 μ M	6.6±0.8 (38±7)	inactive at 10 μ M
24	CF ₃	CF ₃	-CH ₂ COOH	CH	CH	0.08±0.01 (37±1)	0.15±0.01 (93±1)	0.22±0.01 (28±1)
25	CF ₃	CF ₃	-COOH	CH	C-CH ₃	9.1±0.1 (43±1)	8.9±0.4 (42±2)	inactive at 30 μ M
26	CF ₃	CF ₃	-CH ₂ COOH	CH	C-CH ₃	0.21±0.01 (24.7±0.2)	0.29±0.01 (62.1±0.3)	1.00±0.04 (14.1±0.3)
27	<i>t</i> Bu	<i>t</i> Bu	-CH ₂ COOH	CH	C-CH ₃	3.5±0.2 (3.5±0.1)	7±1 (28±5)	inactive at 10 μ M
28	Cl	Cl	H	CH	C-COOH	15.5±0.2 (26±1)	13.1±0.5 (38±1)	inactive at 30 μ M

^aEC₅₀ and fold activation data are the mean \pm SD, $n \geq 3$. Fold activation refers to max. fold activation vs. 0.1% DMSO. inactive: no significant activation at the indicated concentration.

RXR α and RXR β but markedly diminished activity on RXR γ . Thereby, 3',5'-dichlorobiphenyl-4-carboxylate (**15**) inverted the subtype preferential profile of **3**. Double trifluoromethyl substitution (**16**) was favored by all RXRs and also conserved slight preference for RXR β concerning activation efficacy.

These observations demonstrate that 3',5'-substituents affect RXR subtype preference wherein bulky lipophilic residues were most essential for RXR γ activation, while the RXR α and RXR β subtypes better tolerated smaller moieties. RXR β preference was most pronounced for the 3'-isopropyl analogue **6**, while for dimethoxy derivative **14**, activity was only observed on RXR α , and 3',5'-dichlorosubstitution (**15**) produced a RXR α /RXR β preferential profile, while the extraordinarily bulky 3',5'-di-*tert*-butyl substitution of **3** seemed sufficient to abrogate activity on RXR α but was favored by RXR γ .

We then focused on the SAR of the benzoic acid part. Chain elongation by one carbon (**17**) was accompanied by a remarkable gain in potency. Compared to **3**, **17** was more active by about a factor of 20. The further elongated propionic acid homologue **18** did not follow this trend and was less active than **17** suggesting that the arylacetic acid motif of **17** comprised an optimal length. Both, **17** and **18**, conserved the relative RXR β preference that was already observed for several analogues of the series but failed to enhance it. When the carboxylic acid was shifted from the 4-position (**3**) to the 3-position (**19**), RXR γ agonism dropped markedly, while potency on RXR α was enhanced resulting in RXR α /RXR β activation, which renders the 1,3-substitution geometry of **19** as another switch toward RXR α /RXR β preference.

Subsequently, we put our attention on the free positions of the aryl carboxylic acid motif in **3**. Introduction of a nitrogen atom (**20**, **21**) to eventually enhance polarity and solubility was not tolerated in either position and a methyl substituent in *meta*-position (**22**) to the acidic side chain abrogated activity on all RXRs, as well. Methyl substitution in *ortho*-position (**23**), however, had a remarkable impact on subtype selectivity, as **23** exclusively activated RXR β . Thus, *ortho*-methylation relative to the carboxylic acid residue as another switch to subtype preference turned out to block RXR γ modulation.

In an attempt to apply the obtained SAR knowledge for structural optimization, we fused both potency supporting modifications of **16** and **17** in trifluoromethyl-substituted arylacetic acid **24**, which was indeed endowed with markedly enhanced potency on all RXRs. Compound **24** retained the weak relative preference for RXR β but was also active on the RXR α and RXR γ subtypes.

We then aimed at designing a preferential RXR α /RXR β modulator with enhanced potency by fusing the activity promoting 3',5'-bis(trifluoromethyl) substitution (**16**) with the RXR γ disfavored *ortho*-methylarylcarboxylate moiety (**23**). The resulting compound **25** was indeed inactive on RXR γ , while activity on RXR α and RXR β was conserved, which further confirmed the value of the *ortho*-methyl substitution to disrupt RXR γ affinity. To improve the potency of this balanced RXR α /RXR β preferential ligand **25**, we then additionally included the activity favored arylacetic acid motif resulting in **26**. This triple combination of potency and selectivity promoting structural elements produced high potency on RXR α and RXR β and retained preference for these subtypes over RXR γ . Aiming to further enhance RXR β selectivity, we incorporated the RXR γ potency reducing *ortho*-methylarylcarboxylate motif (**23**), the RXR α disfavored di-*tert*-butylphenyl moiety of **3**, and the potency promoting acetic acid side chain

(**17**) in **27**, which indeed displayed pronounced RXR β preference. However, **27** exhibited considerable toxicity at concentrations above 10 μ M preventing further characterization.

In addition, we combined the RXR α /RXR β preferential structural elements of **15** (3',5'-dichlorosubstitution) and **19** (biphenyl-3-carboxylate). The fused compound **28** achieved no improvement in potency or efficacy on RXR α and RXR β but fully retained preference over RXR γ confirming that the biphenyl-3-carboxylate geometry and the double chlorine substitution are suitable motifs to abrogate RXR γ agonism.

Our SAR studies on this new potent RXR ligand chemotype (summarized in Scheme 5) demonstrate that the modulatory activity of biphenylcarboxylates on RXRs can be tuned to differential subtype preference by minor structural changes that particularly result in remarkable differences in activation efficacy (Figure 1, Figure S1). Therein, the carboxylic acid

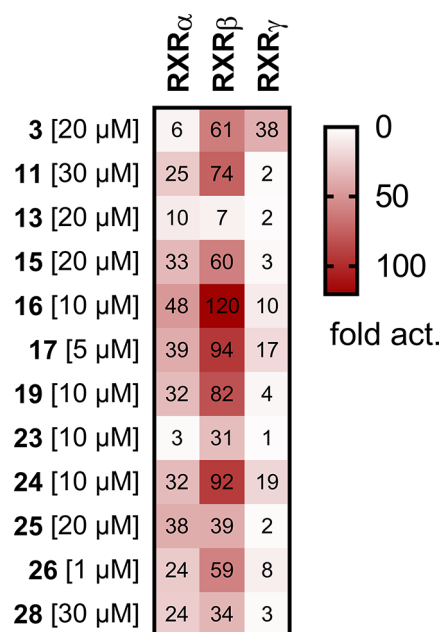


Figure 1. Subtype preference profiles of selected RXR ligands. Heat map shows mean fold activation at a concentration \geq EC₉₀ as indicated, $n \geq 3$. The corresponding dose–response curves are displayed in Figure S1.

and its *ortho*-position as well as the terminal lipophilic substitution pattern turned out to be key motifs of the compound class to govern differential subtype preference profiles. As exemplified in **24**–**28**, these individual selectivity-driving structural changes are compatible for combination in fused molecules to tune subtype preference and promote potency.

Particularly, compounds **13**, **17**, **23**, **24**, **26**, and **28** were discovered as potent novel RXR ligands with attractive subtype preference profiles and, therefore, underwent selectivity profiling over NRs related to RXRs in a broad panel of hybrid reporter gene assays (Figure 2). All optimized biphenylacetic acid derivatives **17**, **24**, **26**, and **28** displayed favorable RXR selectivity, which further highlights the acetic acid chain as a favorable motif in this RXR ligand series. The asymmetric partial RXR agonist 3'-*tert*-butyl-5'-methylbiphenyl-4-carboxylate **13** as well as the biphenyl-3-methyl derivatives **23** and **26** in addition to RXRs activated the fatty acid sensing RARs and

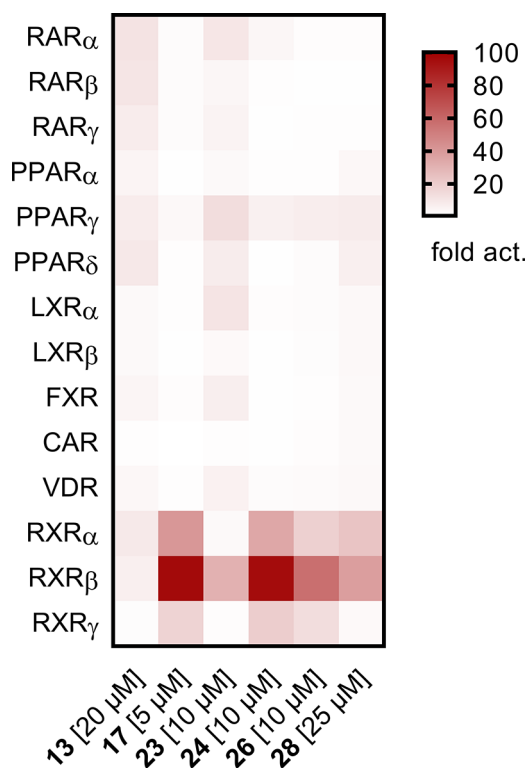


Figure 2. Selectivity profiles of 13, 17, 23, 24, 26, and 28 on nuclear receptors (tested in Gal4 hybrid reporter gene assays). Heat map shows mean fold activation vs DMSO (0.1%), $n \geq 2$. RXR activation data is shown for comparison.

PPARs with weak efficacy and turned out less selective. The activity of 17, 24, and 26 on RXRs in the Gal4 hybrid reporter gene assays was blocked by the well characterized RXR antagonist HX531,²⁰ which conclusively confirmed their RXR mediated activity (Figure S2). Exemplary further in vitro characterization of the most active RXR activator 24 demonstrated acceptable solubility for a fatty acid mimetic²¹ retinoid (24, 1.15 mg/L; 1a, 0.3 mg/L¹⁰) and favorably high stability against microsomal degradation (Figure S3).

RXRs act as universal heterodimer partners for numerous ligand-activated transcription factors, which partly mediate the side effects of RXR agonists such as RXR:LXR induced hyperlipidemia.^{5,9} Therefore, RXR ligands comprising selectivity for certain RXR heterodimers may hold strong therapeutic potential and provide improved safety, as well. To evaluate whether the biphenylcarboxylate RXR ligand scaffold is also suitable to design RXR heterodimer preferential agents, we studied 13, 17, 24–26, and 28 at concentrations above their EC₉₀s on RXRs for their activity on the human heterodimers RXR:LXR and RXR:PPAR γ (Figure 3, Figure S4). The reference RXR agonist bexarotene (1a) strongly activated both heterodimers in this setting and demonstrated marked synergy with LXR and PPAR γ agonists observed by super-additive effects.

Partial RXR agonist 13, which is characterized by low activation efficacy on RXR α and RXR β , failed to activate either heterodimer but blocked activation of both by specific agonists of the partner receptors. Especially RXR:PPAR γ activation by rosiglitazone was strongly reduced in the presence of 13. This profile agrees with the compound's partial agonism, which entails partial antagonism. The markedly more efficacious pan-

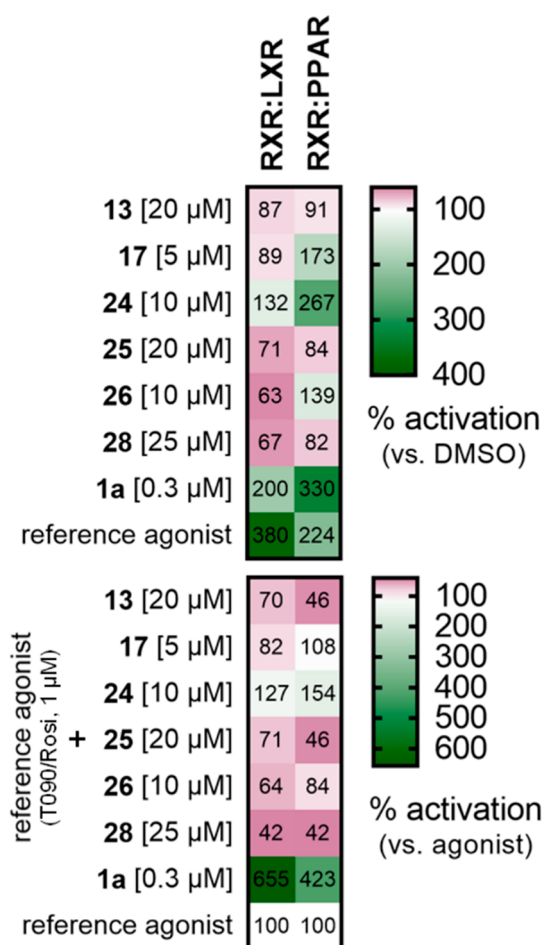
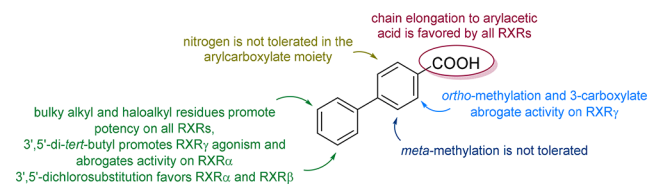


Figure 3. RXR ligands 13, 17, 24–26, and 28 display different activities on the RXR heterodimers RXR:LXR and RXR:PPAR γ . Upper panel shows mean relative activation vs DMSO (0.1%), lower panel shows mean relative synergistic activation in the presence of reference agonist T0901317 (1 μM, LXR) or rosiglitazone (1 μM, PPAR γ). Heat maps show the mean of three independent experiments conducted in duplicates. See Figure S4 for data distribution.

Scheme 5. Summarized SAR of Biphenylcarboxylates on RXRs



RXR activator 17, in contrast, strongly activated RXR:PPAR γ , while it did not affect rosiglitazone-mediated RXR:PPAR γ activation. On RXR:LXR, 17 was indifferent alone and in the presence of LXR agonist T0901317. The optimized pan-RXR agonist 24 also in the heterodimer setting turned out to be the most active RXR agonist and strongly activated the RXR:PPAR γ heterodimer with higher efficacy than the PPAR γ agonist rosiglitazone and behaved additive with the PPAR γ activator. In addition, 24 slightly activated RXR:LXR and enhanced the activity of T0901317, but its efficacy on RXR:PPAR γ was markedly higher. Compounds 25 and 28 neither activated RXR:LXR nor RXR:PPAR γ but repressed activation of both heterodimers by their respective agonists,

particularly in the case of RXR:PPAR γ . The *ortho*-methyl-biphenyl-4-acetic acid derivative **26** activated RXR:PPAR γ without showing synergy with rosiglitazone but blocked RXR:LXR activity.

These observations on RXR heterodimer modulation also indicate preliminary SAR lessons for heterodimer preference. Compounds **24** and **26**, which differ only in the presence of an *ortho*-methyl substitution in **26**, displayed marked difference in RXR activation. While **24** activated both heterodimers and showed synergy with the agonists, **26** displayed a repressor profile on RXR:LXR and only weakly activated RXR:PPAR γ without synergy. The *ortho*-methyl residue, thus, had a remarkable effect on heterodimer preference, too. Similar observations for a single methyl moiety have been reported for other RXR:LXR sparing RXR ligands.⁹ Shortening the acidic chain from phenylacetic acid in **26** to aryl carboxylate **25** further reduced activating activity on RXR:PPAR γ . Moreover, bulky lipophilic residues (**17**, **24**, and **26**) appear favored for RXR:PPAR γ activation over smaller substituents (**13** and **28**). Structural modifications on the biphenylcarboxylate scaffold, thus, not only govern RXR subtype preference but can also be employed to tune RXR heterodimer specific activity.

To provide a structural basis for future optimization of biphenyl-based RXR modulators, we solved the X-ray structure of the RXR α LBD in complex with **24** (PDB-ID: 6SJM; Figure 4, Table S2). Compound **24** binds in the classical orthosteric site, which is also addressed by classical rexinoids such as **1a** but with distinctive binding properties. The carboxylate moiety of **24** engages the typical anchoring ionic contact with Arg316 at the end of the RXR ligand binding site, and the biphenyl scaffold is entirely surrounded by lipophilic residues with the upper aromatic ring forming an edge-to-face contact to Phe313. The binding site of **24** is defined by helices 2, 6, 7, and 11, but in contrast to known RXR activators, **24** does not extend toward helix 12. This unique binding mode demonstrates that the typical L-shape of most RXR ligands is not essential for RXR activation. This confined binding site occupation provides room for structure-based optimization but may also explain the distinctive biological activity of this new RXR ligand chemotype.

With the opportunity to structurally control RXR subtype and heterodimer preference, the biphenylcarboxylate chemotype of RXR ligands holds potential to serve as scaffold for the development of innovative RXR ligands to overcome safety and selectivity issues of classical rexinoids. While some heterodimer specific RXR agonists have been developed previously^{9–12} as essential steps to further explore the therapeutic potential of these essential nuclear receptors, systematic studies on RXR subtype selectivity are rare. Here we demonstrate that minor structural modifications can have remarkable effect on RXR subtype preference. After the recent discovery of valerenic acid¹³ as selective RXR β agonist, we thereby provide further evidence that RXRs can be modulated in a subtype selective fashion with small molecules.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

General. All final compounds for biological evaluation had a purity of >95% according to HPLC–UV analysis at wavelengths of 245 and 280 nm.

2-(3',5'-bis(Trifluoromethyl)-(1,1'-biphenyl)-4-yl)acetic Acid (24**).** 2-(4-Iodophenyl)acetic acid (**30b**, 0.39 g, 1.5 mmol, 1.0 equiv), 3,5-bis(trifluoromethyl)benzeneboronic acid (**29i**, 0.46 g, 1.8 mmol, 1.2 equiv), and sodium carbonate (0.57 g, 5.4 mmol, 3.6 equiv) were dissolved in dioxane (10 mL) and water (2.5 mL). The mixture was

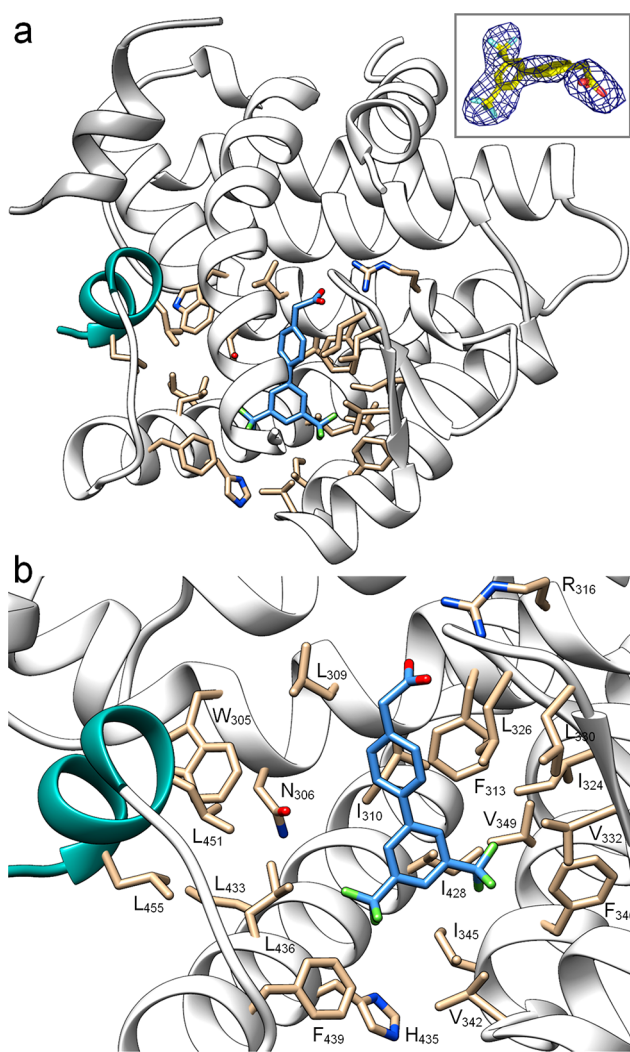


Figure 4. X-ray structure of the RXR α LBD in complex with **24** (blue). Helix 12 (activation function) is depicted in green. PDB-ID: 6SJM. (a) Full RXR LBD; inset shows omitted $|F_o| - |F_c|$ electron density map contoured at 3σ for the bound ligand. (b) Binding site view. Figures were prepared using UCSF Chimera.²²

stirred at room temperature for 10 min, while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh $_3$) $_4$ (0.086 g, 0.075 mmol, 0.050 equiv) was added, and the mixture was stirred under reflux for 3 h. The resulting mixture was cleared over Celite 535, 20 mL of EtOAc and 10 mL of HOAc were added, and phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 mL) and dried over MgSO $_4$, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (83:15:2) as mobile phase and recrystallization from EtOAc to obtain **24** as colorless solid (45 mg, 8.6%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 83:15:2) = 0.26. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 8.29 (s, 2H), 8.02 (s, 1H), 7.83–7.80 (m, 2H), 7.51 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 3.74 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 172.51, 144.19, 137.16, 137.04, 132.66, 131.27, 128.23, 125.62, 123.46, 121.56, 40.83. HRMS (MALDI): m/z calculated 348.05795 for C $_{16}$ H $_{10}$ O $_2$ F $_6$; found 348.05931 ($[M]^+$).

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsmchemlett.9b00306.

Supplementary Figures and Tables, synthetic methods, in vitro pharmacological methods, protein expression and crystallization, and analytical compound characterization data(PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de. Phone: +49 69 798 29327.

ORCID

Pascal Heitel: 0000-0001-5187-6342

Apirat Chaikuad: 0000-0003-1120-2209

Stefan Knapp: 0000-0001-5995-6494

Daniel Merk: 0000-0002-5359-8128

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS

CAR, constitutive androstane receptor; FXR, farnesoid X receptor; LXR, liver X receptor; NR, nuclear receptor; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RXR, retinoid X receptor; SAR, structure–activity relationship; THR, thyroid hormone receptor; VDR, vitamin D receptor

REFERENCES

- (1) Germain, P.; Chambon, P.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Lazar, M. A.; Leid, M.; De Lera, A. R.; Lotan, R.; Mangelsdorf, D. J.; Gronemeyer, H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (4), 760–772.
- (2) Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157* (1), 255–266.
- (3) Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Nait Oumesmar, B.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Baron-Van Evercooren, A.; et al. Retinoid X Receptor Gamma Signaling Accelerates CNS Remyelination. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (1), 45–53.
- (4) Cramer, P. E.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Lee, C. Y. D.; Karlo, J. C.; Zinn, A. E.; Casali, B. T.; Restivo, J. L.; Goebel, W. D.; James, M. J.; et al. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* **2012**, *335* (6075), 1503–1506.
- (5) de Vries-van der Weij, J.; de Haan, W.; Hu, L.; Kuif, M.; Oei, H. L. D. W.; van der Hoorn, J. W. A.; Havekes, L. M.; Princen, H. M. G.; Romijn, J. A.; Smit, J. W. A.; et al. Bexarotene Induces Dyslipidemia by Increased Very Low-Density Lipoprotein Production and Cholesteryl Ester Transfer Protein-Mediated Reduction of High-Density Lipoprotein. *Endocrinology* **2009**, *150* (5), 2368–2375.
- (6) Sherman, S. I.; Gopal, J.; Haugen, B. R.; Chiu, A. C.; Whaley, K.; Nowlakha, P.; Duvic, M. Central Hypothyroidism Associated with Retinoid X Receptor–Selective Ligands. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340* (14), 1075–1079.
- (7) de Lera, A. R.; Bourguet, W.; Altucci, L.; Gronemeyer, H. Design of Selective Nuclear Receptor Modulators: RAR and RXR as a Case Study. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6* (10), 811–820.
- (8) Merk, D. Chances and Challenges of Retinoid X Receptor Gamma Targeting for Regenerative Multiple Sclerosis Treatment. *Future Med. Chem.* **2015**, *7* (18), 2411–2413.
- (9) Atigadda, V. R.; Xia, G.; Desphande, A.; Boerma, L. J.; Lobo-Ruppert, S.; Grubbs, C. J.; Smith, C. D.; Brouillette, W. J.; Muccio, D. D. Methyl Substitution of a Retinoid Agonist Improves Potency and Reveals Site of Lipid Toxicity. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (12), 5370–5380.
- (10) Pollinger, J.; Gellrich, L.; Schierle, S.; Kilu, W.; Schmidt, J.; Kalinowsky, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heering, J.; Proschak, E.; et al. Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards

Selective Retinoid X Receptor Modulation. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (4), 2112–2126.

- (11) Leibowitz, M. D.; Ardecky, R. J.; Boehm, M. F.; Broderick, C. L.; Carfagna, M. A.; Crombie, D. L.; D'Arrigo, J.; Etgen, G. J.; Faul, M. M.; Grese, T. A.; et al. Biological Characterization of a Heterodimer-Selective Retinoid X Receptor Modulator: Potential Benefits for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Endocrinology* **2006**, *147* (2), 1044–1053.

- (12) Lagu, B.; Lebedev, R.; Pio, B.; Yang, M.; Pelton, P. D. Dihydro-[1H]-Quinolin-2-Ones as Retinoid X Receptor (RXR) Agonists for Potential Treatment of Dyslipidemia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (12), 3491–3496.

- (13) Merk, D.; Grisoni, F.; Friedrich, L.; Gelzinyte, E.; Schneider, G. Computer-Assisted Discovery of Retinoid X Receptor Modulating Natural Products and Isofunctional Mimetics. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (12), 5442–5447.

- (14) Merk, D.; Grisoni, F.; Friedrich, L.; Gelzinyte, E.; Schneider, G. Scaffold Hopping from Synthetic RXR Modulators by Virtual Screening and de Novo Design. *MedChemComm* **2018**, *9* (8), 1289–1292.

- (15) Heering, J.; Merk, D. Hybrid Reporter Gene Assays: Versatile In Vitro Tools to Characterize Nuclear Receptor Modulators. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1966*, 175–192.

- (16) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J. S.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; et al. Non-Acidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (16), 7199–7205.

- (17) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (5), 1193–1198.

- (18) Heitel, P.; Gellrich, L.; Kalinowsky, L.; Heering, J.; Kaiser, A.; Ohrndorf, J.; Proschak, E.; Merk, D. Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (2), 203–208.

- (19) Heitel, P.; Gellrich, L.; Heering, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavec, M.; Merk, D. Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Modulator (SPPAR γ M) in Vitro. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 13554.

- (20) Ebisawa, M.; Umemiya, H.; Ohta, K.; Fukasawa, H.; Kawachi, E.; Christoffel, G.; Gronemeyer, H.; Tsuji, M.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.; et al. Retinoid X Receptor-Antagonistic Diazepinylbenzoic Acids. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47* (12), 1778–1786.

- (21) Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (13), 5235–5266.

- (22) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera-A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605–1612.

A novel biphenyl-based chemotype of retinoid X receptor ligands enables subtype- and heterodimer-preference

Julius Pollinger et al.

- Supplementary Information –

Table of Contents

Supplementary Figures & Tables	S2
Chemistry	S11
General	S11
Synthesis and analytical characterization	S11
Methods for in vitro characterization	S22
Protein purification, crystallization and structure determination	S24
Supplementary references	S25

Supplementary Figures

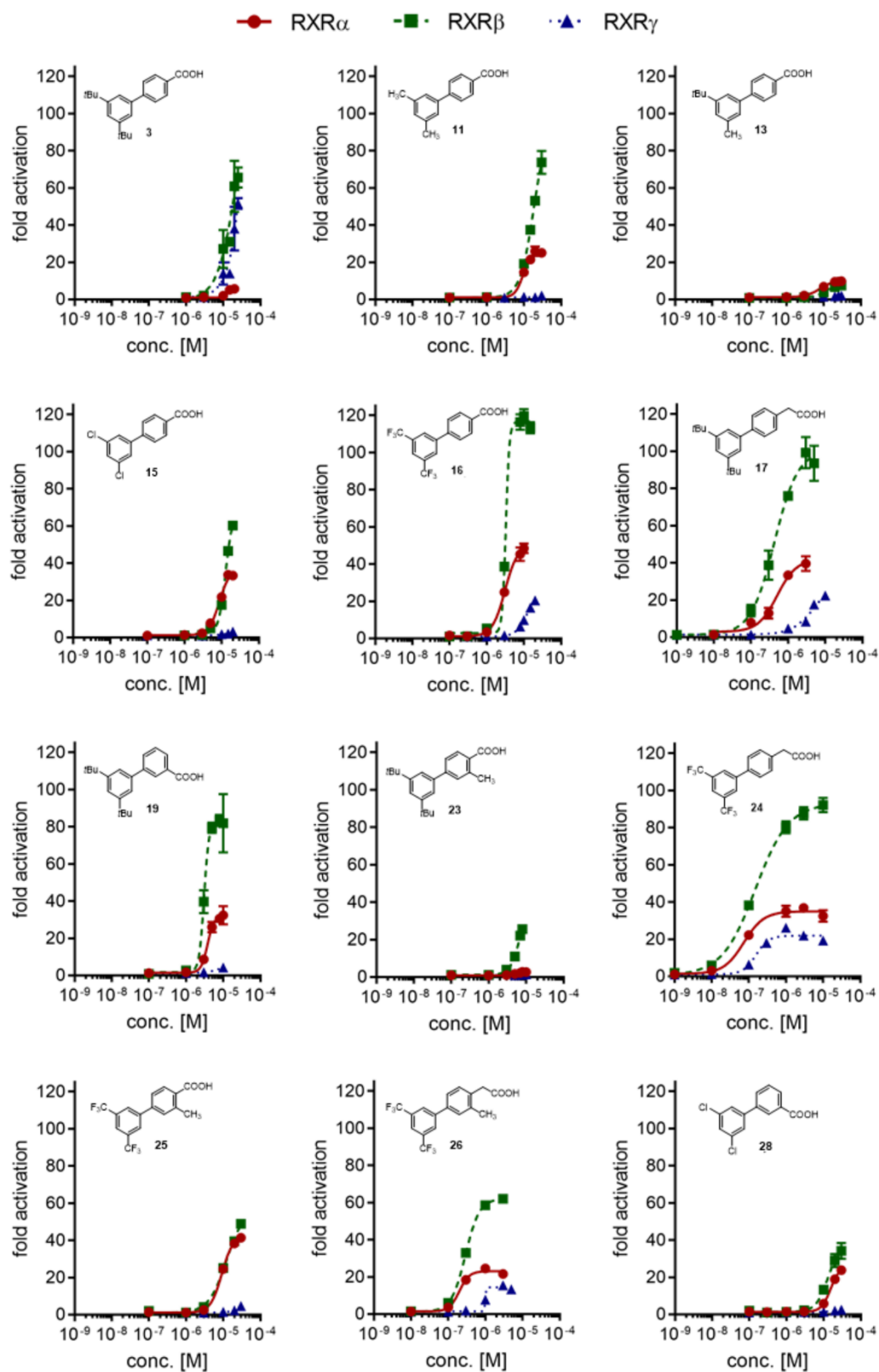


Figure S1. Activity profiles (dose-response) of important biphenylcarboxylate based RXR ligands on RXR α (red), RXR β (green) and RXR γ (blue). Data are the mean \pm S.E.M.; $n \geq 3$.

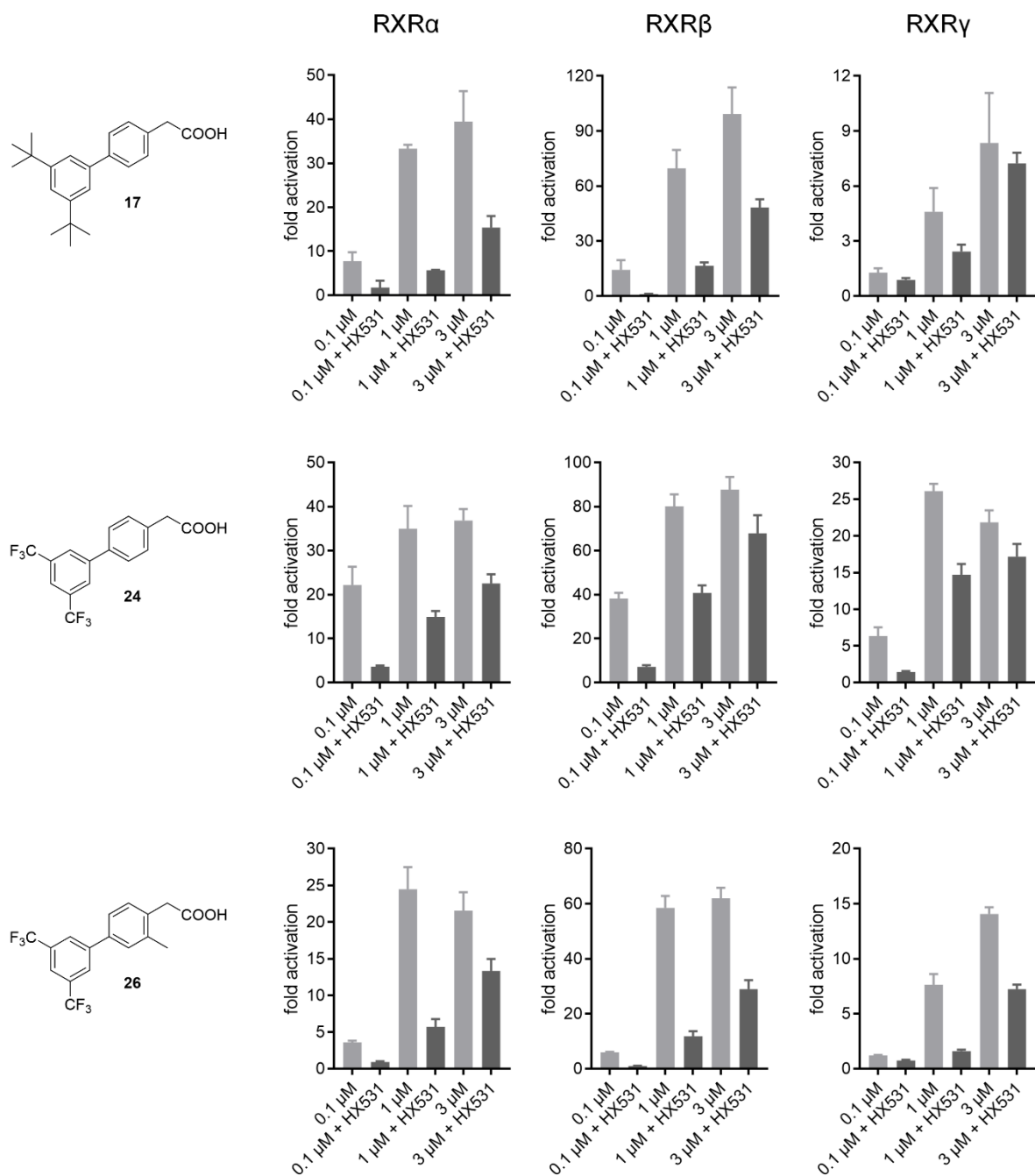


Figure S2. Activity profiles (dose-response) of the most potent biphenylcarboxylate based RXR ligands on RXR α , RXR β and RXR γ alone and in competition with 1 μ M of RXR antagonist HX531. Data are the mean \pm S.E.M.; n=3.

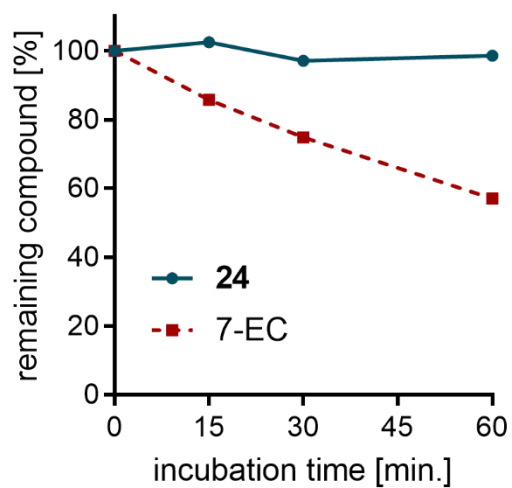


Figure S3. Stability of **24** against microsomal degradation by Wistar rat liver microsomes. 7-Ethoxycoumarin (7-EC) as control. Data are the mean \pm S.E.M., n=3.

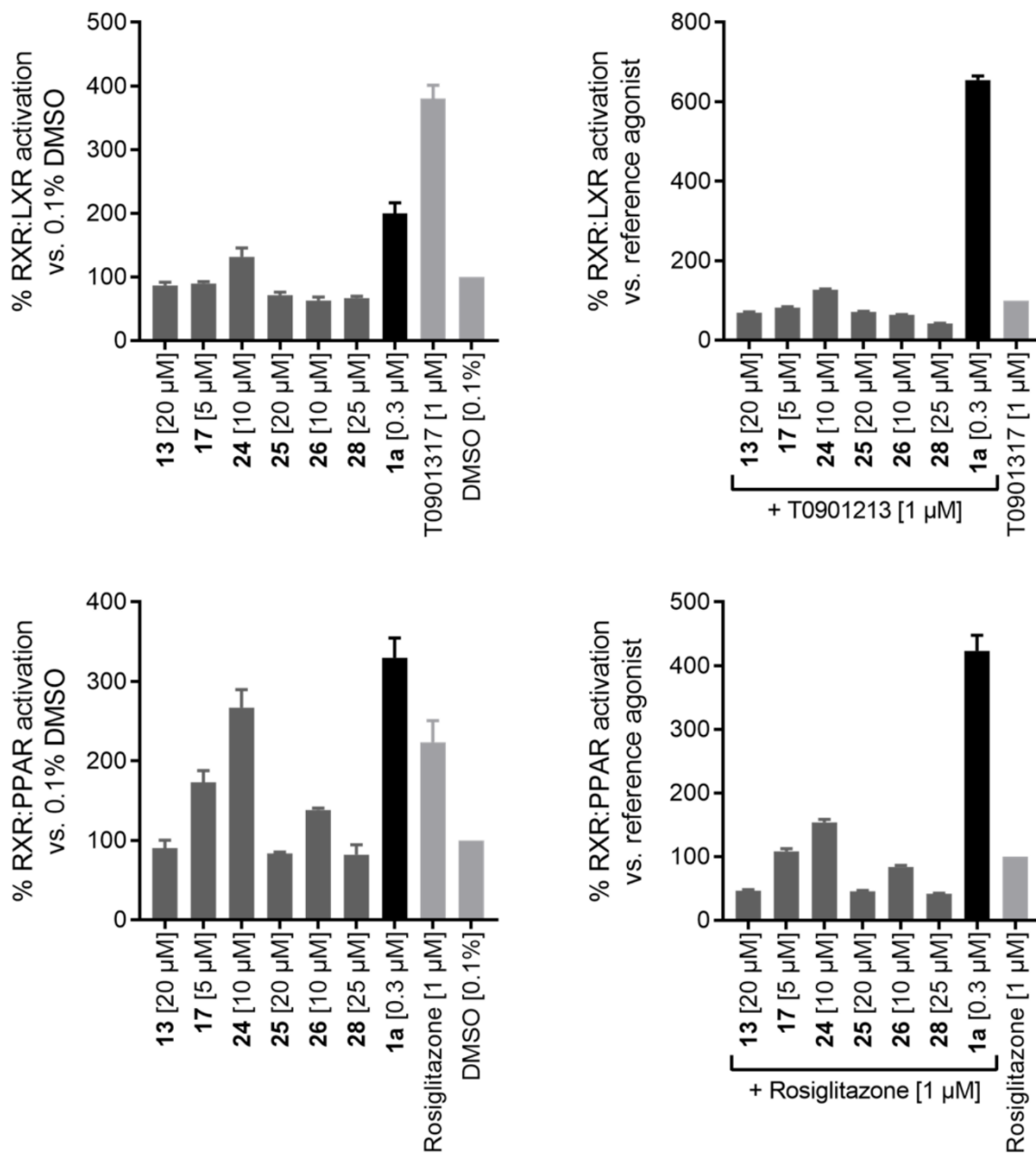
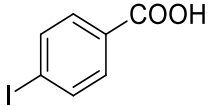
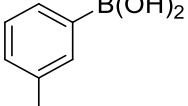
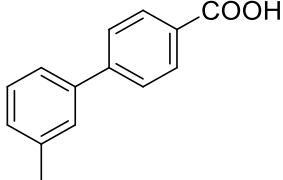
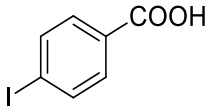
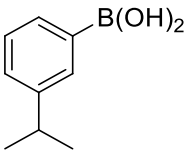
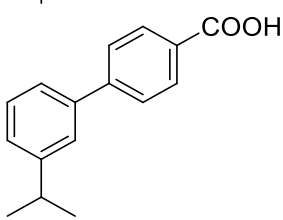
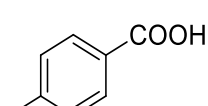
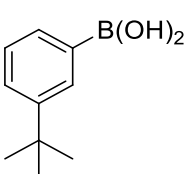
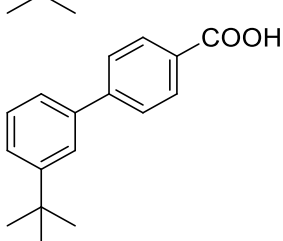
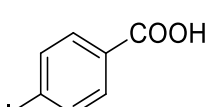
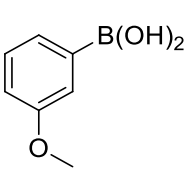
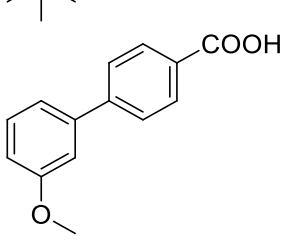
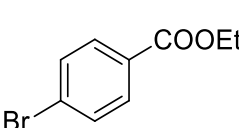
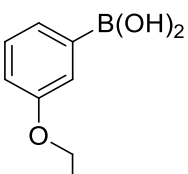
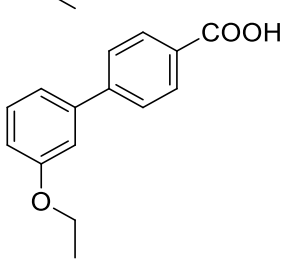
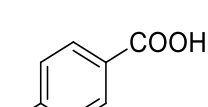
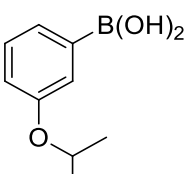
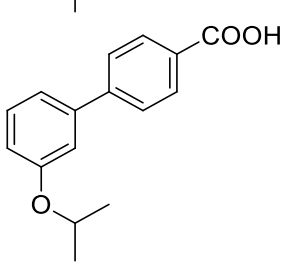
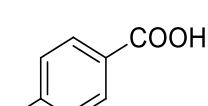
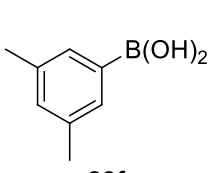
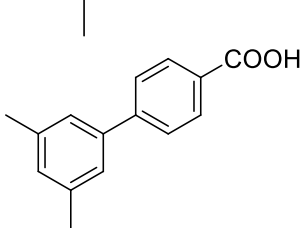
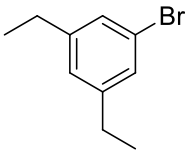
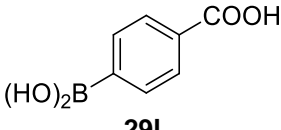
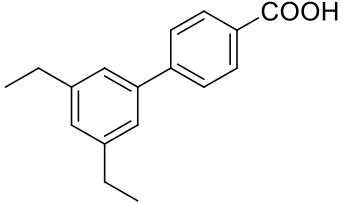
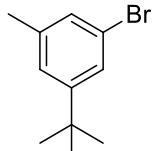
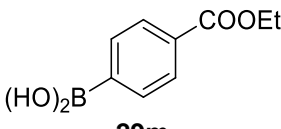
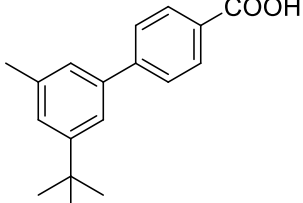
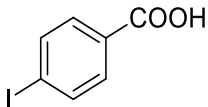
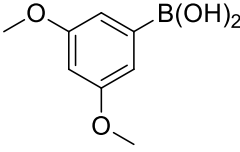
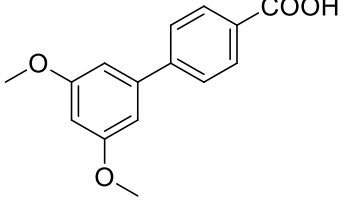
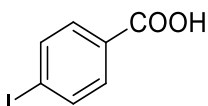
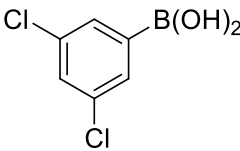
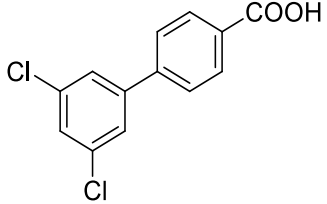
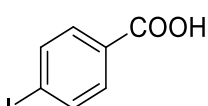
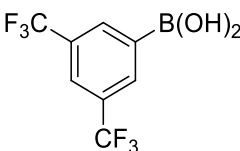
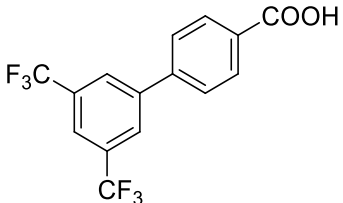
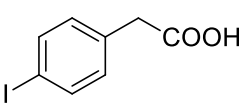
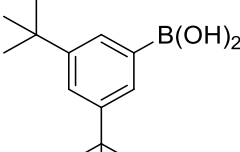
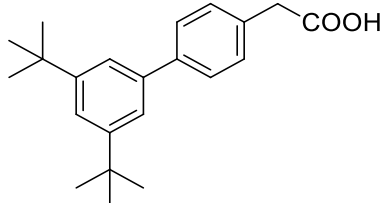
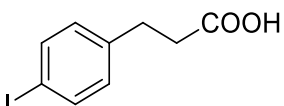
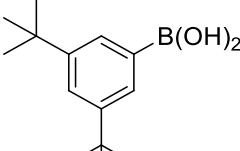
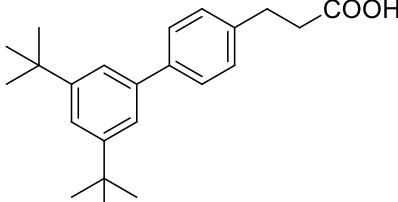
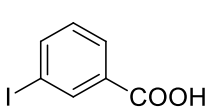
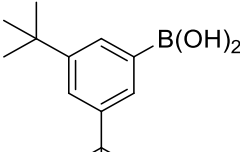
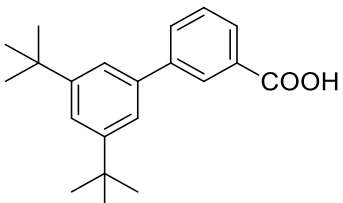
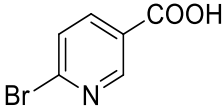
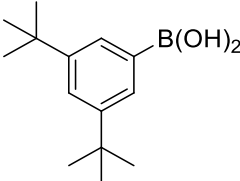
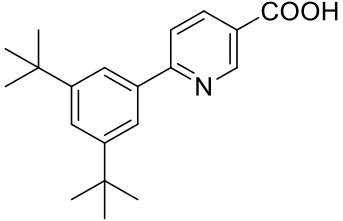
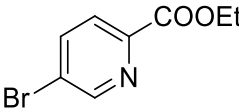
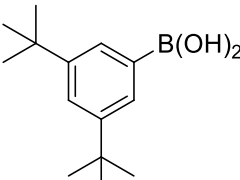
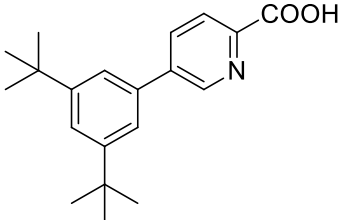
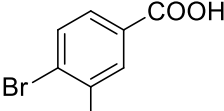
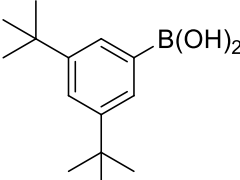
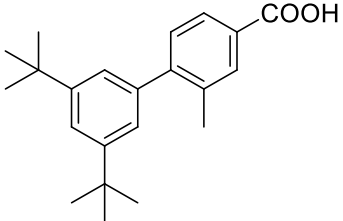
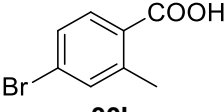
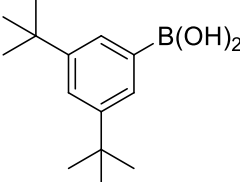
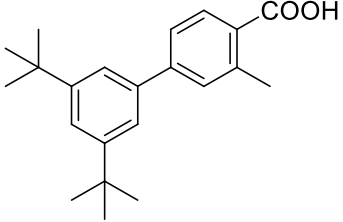
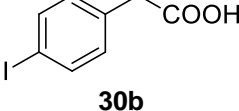
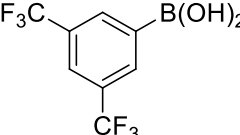
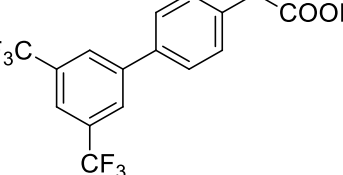
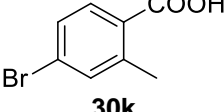
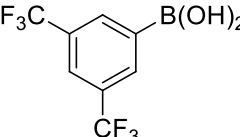
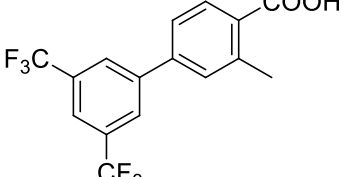
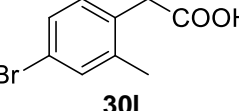
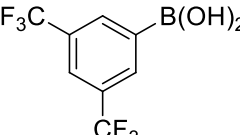
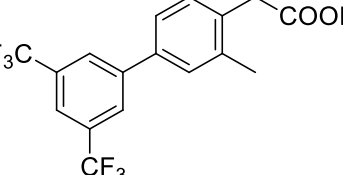
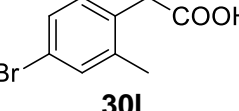
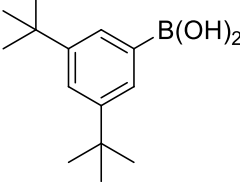
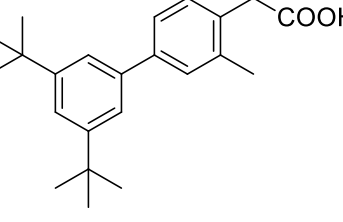


Figure S4. Activity of biphenylcarboxylate RXR agonists (**13**, **17**, **24-26** and **28**; dark grey) and RXR agonist bexarotene (**1a**; black) in two different full-length reporter gene assays compared to reference agonists rosiglitazone (PPAR) or T0901317 (LXR) or compared to 0.1% DMSO (light grey) as negative control. RXR agonists were studied alone and in combination with rosiglitazone or T0901317, respectively. Data are the mean \pm S.E.M., $n \geq 3$.

Table S1. Compounds **5-27** and their corresponding starting materials/building blocks for Suzuki coupling. Synthesis of **9**, **13** and **21** additionally involved alkaline ester hydrolysis.

ID	Arylhalide building block	Arylboronic acid building block	Structure
5	 30a	 29a	
6	 30a	 29b	
7	 30a	 29c	
8	 30a	 29d	
9	 30d	 29k	
10	 30a	 29e	
11	 30a	 29f	

ID	Arylhalide building block	Arylboronic acid building block	Structure
12	 30e	 29l	
13	 30f	 29m	
14	 30a	 29g	
15	 30a	 29h	
16	 30a	 29i	
17	 30b	 29j	
18	 30c	 29j	
19	 30g	 29j	

ID	Arylhalide building block	Arylboronic acid building block	Structure
20	 30h	 29j	
21	 30i	 29j	
22	 30j	 29j	
23	 30k	 29j	
24	 30b	 29i	
25	 30k	 28i	
26	 30l	 29i	
27	 30l	 29j	

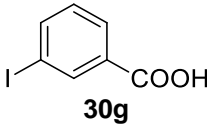
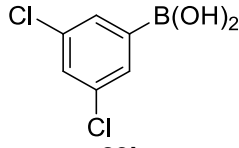
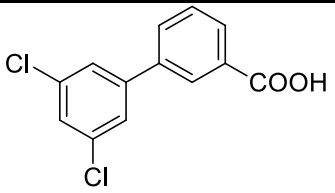
ID	Arylhalide building block	Arylboronic acid building block	Structure
28	 <p style="text-align: center;">30g</p>	 <p style="text-align: center;">29h</p>	

Table S2. Data collection and refinement statistics for DYRK1A-FC162 structure.

Complex	RXRα-24
PDB accession code	6SJM
Data Collection	
Resolution ^a (Å)	45.25-2.52 (2.66-2.52)
Spacegroup	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2
Cell dimensions	<i>a</i> = <i>b</i> = 64.0, <i>c</i> = 109.6 Å α , β , γ = 90.0°
No. unique reflections ^a	8,101 (1,164)
Completeness ^a (%)	99.2 (100.0)
<i>I</i> / σ ^a	12.7 (2.1)
R _{merge} ^a (%)	0.071 (0.992)
CC (1/2)	0.998 (0.777)
Redundancy ^a	7.3 (7.7)
Refinement	
No. atoms in refinement (RXR/pep/L/O) ^b	1,674/ 106/ 24/ 4
B factor (RXR/pep/L/O) ^b (Å ²)	80/ 89/ 84/ 63
R _{fact} (%)	20.5
R _{free} (%)	24.7
rms deviation bond ^c (Å)	0.010
rms deviation angle ^c (°)	1.2
Molprobit Ramachandran	
Favour (%)	96.4
Allowed (%)	0

^a Values in brackets show the statistics for the highest resolution shells.

^b RXR/pep/L/O indicate RXR α protein, coactivator peptide, ligand molecules presented in the active sites, and other (water and solvent molecules), respectively.

^c rms indicates root-mean-square.

Chemistry

General

All chemicals and solvents were of reagent grade and used without further purification unless otherwise specified. All reactions were conducted in oven-dried glassware under argon atmosphere and in absolute solvents. NMR spectra were recorded on a Bruker AV 300, Bruker AV 400 or a Bruker AV 500 spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to TMS as reference; approximate coupling constants (J) are shown in Hertz (Hz). Mass spectra were obtained on a VG Platform II (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using electrospray ionization (ESI). High resolution mass spectra were recorded on a MALDI LTQ ORBITRAP XL instrument (Thermo Fisher Scientific). Compound purity was analyzed on a Waters 600 Controller HPLC using a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and Waters 717 plus Autosampler or Hitachi Chromaster with a 5160 pump system, using a DAD 5430 and 5260 Autosampler both equipped with a MultoHigh100 RP18-5 μ 250x4 mm column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) using a gradient (H₂O+0.1% formic acid/MeOH 80:20 isocratic for 5 min to MeOH after additional 45 min and MeOH for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm (method A) or using a gradient (H₂O+0.1% formic acid/MeOH 60:40 isocratic for 5 min to MeOH after additional 25 min and MeOH for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm (method B).

All final compounds for biological evaluation had a purity of >95% according to HPLC-UV analysis at wavelengths 245 and 280 nm.

Synthesis and analytical characterization

3'-Methyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (5)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.30 g, 1.2 mmol, 1.0 eq), 3-methylbenzeneboronic acid (**29a**, 0.20 g, 1.4 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.40 g, 3.6 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.069 g, 0.060 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 14 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (86:12:2) as mobile phase to obtain **5** as colorless solid (60 mg, 24%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 86:12:2) = 0.34. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.00 (s, 1H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.52 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.38 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.23 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.18, 144.43, 139.00, 138.30, 129.93, 129.58, 128.99, 128.94, 127.61, 126.79, 124.09, 21.09. HRMS (MALDI): m/z calculated 212.08318 for C₁₄H₁₂O₂ found 212.08295 ([M*]).

3'-*iso*-Propyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (6)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.30 g, 1.2 mmol, 1.0 eq), 3-isopropylbenzeneboronic acid (**29b**, 0.24 g, 1.4 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.40 g, 3.6 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.069 g, 0.060 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (89:9:2) as mobile phase to obtain **6** as colorless solid (0.20 g, 69%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 89:9:2) = 0.35. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.96 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.97 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.22, 149.32, 144.68, 139.12, 129.96, 129.52, 129.11, 126.91, 126.29, 125.11, 124.57, 33.57, 23.91. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 241.12216 for C₁₆H₁₇O₂ found 241.12231 ([M+H]⁺).

3'-*tert*-Butyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (7)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.30 g, 1.2 mmol, 1.0 eq), 3-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29c**, 0.26 g, 1.4 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.40 g, 3.6 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.069 g, 0.060 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (95:3:2) as mobile phase to obtain **7** as colorless solid (55 mg, 18%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 95:3:2) = 0.2. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.93 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.69 (t, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.53 - 7.50 (m, 1H), 7.47 - 7.40 (m, 2H), 1.34 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 167.20, 151.50, 144.92, 138.89, 129.94, 129.49, 128.84, 126.98, 125.22, 124.29, 123.85, 34.60, 31.15. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 254.13013 for C₁₇H₁₈O₂ found 254.13017 ([M*]).

3'-Methoxy-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (8)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.30 g, 1.2 mmol, 1.0 eq), 3-methoxybenzeneboronic acid (**29d**, 0.22 g, 1.4 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.40 g, 3.6 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.069 g, 0.060 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87:11:2) as mobile phase to obtain **8** as

white solid (25 mg, 9%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87:11:2) = 0.2. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 12.96 (s, 1H), 8.01 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.29 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.26 – 7.24 (m, 1H), 7.01 - 6.97 (m, 1H), 3.83 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 167.16, 159.82, 144.21, 140.55, 130.18, 129.91, 129.77, 126.96, 119.29, 114.00, 112.37, 55.22. HRMS (MALDI): m/z calculated 229.08592 for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3$ found 229.008671 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

3'-Ethoxy-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (9)

Ethyl 3'-ethoxy-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylate (**31**, 80 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (5.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (0.061 g, 1.5 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5.0 mL) was added to precipitate **9**, which was filtrated and isolated as a white solid (60 mg, 84%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6): δ = 8.09 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.76 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.28 - 7.25 (m, 1H), 7.24 – 7.22 (m, 1H), 6.97 - 6.94 (m, 1H), 4.12 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.38 (t, J = 7.0 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, acetone- d_6): δ = 168.29, 160.44, 145.77, 142.09, 131.05, 130.95, 130.87, 127.70, 120.09, 115.01, 113.91, 64.07, 15.06. HRMS (MALDI): m/z calculated 243.10157 for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{O}_3$ found 243.10157 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

3'-(Propan-2-yloxy)-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (10)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.37 g, 1.5 mmol, 1.0 eq), 3-isopropoxybenzeneboronic acid (**29e**, 0.30 g, 1.8 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.48 g, 4.5 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.087 g, 0.075 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 6 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO_4 , and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87.5:10.5:2) as mobile phase to obtain **10** as pale yellow solid (0.19 g, 49%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87.5:10.5:2) = 0.28. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 8.02 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.79 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.52 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.02 – 2.92 (m, 1H), 1.25 (d, J = 6.9 Hz, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 167.21, 149.31, 144.66, 139.12, 129.95, 129.53, 129.09, 126.90, 126.28, 125.11, 124.57, 33.56, 23.90. HRMS (MALDI): m/z calculated 257.11722 for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3$ found 257.11729 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

3',5'-Dimethyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (11)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.37 g, 1.5 mmol, 1.0 eq), 3,5-dimethylbenzeneboronic acid (**29f**, 0.27 g, 1.8 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.48 g, 4.5 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.087 g, 0.075 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were

separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (89:9:2) as mobile phase to obtain **11** as white solid (80 mg, 24%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 89:9:2) = 0.34. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.33 (s, 2H), 7.05 (s, 1H), 2.36 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 167.65, 146.49, 140.60, 139.25, 131.00, 130.55, 130.06, 127.73, 125.81, 21.37. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 227.10666 for C₁₅H₁₅O₂ found 227.10655 ([M+H]⁺).

3',5'-Diethyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (12)

1-Bromo-3,5-diethylbenzene (**30e**, 0.27 g, 1.3 mmol, 1.0 eq), 4-boronobenzoic acid (**29l**, 0.25 g, 1.5 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.40 g, 3.8 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.069 g, 0.060 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 3.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (89:9:2) as mobile phase to obtain **12** as yellow solid (80 mg, 24%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 89:9:2) = 0.3. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.38 (s, 2H), 7.12 (s, 1H), 2.69 (q, *J* = 7.6 Hz, 4H), 1.26 (t, *J* = 7.6 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 167.69, 146.71, 145.85, 140.74, 131.01, 129.97, 128.27, 127.80, 124.98, 29.47, 16.18. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 255.13796 for C₁₇H₁₉O₂ found 255.13810 ([M+H]⁺).

3'-tert-Butyl-5'-methyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (13)

Ethyl 3'-*tert*-butyl-5'-methyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylate (**32**, 0.15 g, 0.49 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (5.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (0.11 g, 2.5 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 15 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5.0 mL) was added to precipitate **13**, which was filtrated and isolated as a white solid (0.10 g, 74%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.96 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 2.36 (s, 3H), 1.32 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 168.70, 151.23, 141.96, 139.76, 137.61, 129.71, 125.91, 125.22, 124.79, 120.88, 34.44, 31.24, 21.37. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 269.15361 for C₁₈H₂₁O₂ found 269.15345 ([M+H]⁺).

3',5'-Dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (14)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.37 g, 1.5 mmol, 1.0 eq), 3,5-dimethoxybenzeneboronic acid (**29g**, 0.33 g, 1.8 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.48 g, 4.5 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.087 g, 0.075 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 6 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were

separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87:11:2) as mobile phase to obtain **14** as brown solid (90 mg, 23%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87:11:2) = 0.1. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.10 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 6.55 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.87 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 167.43, 162.37, 146.23, 142.79, 130.96, 130.43, 127.95, 106.09, 100.88, 55.76. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 259.09649 for C₁₅H₁₅O₄ found 259.09675 ([M+H]⁺).

3',5'-Dichloro-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (15)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.37 g, 1.5 mmol, 1.0 eq), 3,5-dichlorobenzeneboronic acid (**29h**, 0.34 g, 1.8 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.48 g, 4.5 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.087 g, 0.075 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (84:14:2) as mobile phase to obtain **15** as colorless solid (0.16 g, 40%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 84:14:2) = 0.33. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.81 (s, 2H), 7.65 (s, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.99, 142.56, 141.18, 134.82, 130.94, 129.97, 127.65, 127.30, 125.76. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 266.99741 for C₁₃H₈Cl₂O₂ found 266.99759 ([M+H]⁺).

3',5'-Bis(trifluoromethyl)-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (16)

4-Iodobenzoic acid (**30a**, 0.37 g, 1.5 mmol, 1.0 eq), 3,5-bis(trifluoromethyl)benzeneboronic acid (**29i**, 0.46 g, 1.8 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.48 g, 4.5 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.087 g, 0.075 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was refluxed for 42.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (90:8:2) as mobile phase to obtain **16** as colorless solid (0.21 g, 42%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 90:8:2) = 0.29. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.84 (s, 1H), 8.39 (s, 2H), 8.14 (s, 1H), 8.07 - 8.04 (m, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 166.94, 141.64, 140.97, 131.05, 130.03, 127.81, 127.72, 124.40, 122.23, 121.71. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 335.05013 for C₁₅H₉F₆O₂ found 335.05022 ([M+H]⁺).

2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-(1,1'-biphenyl)-4-yl)acetic acid (**17**)

2-(4-Iodophenyl)acetic acid (**30b**, 0.26 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.32 g, 3.0 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 17.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (84:14:2) as mobile phase to obtain **17** as colorless solid (75 mg, 23%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 84:14:2) = 0.3. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.39 (s, 3H), 7.34 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 1.33 (s, 18H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 163.09, 141.12, 130.16, 129.93, 124.31, 120.20, 117.23, 111.34, 111.30, 30.69, 24.98, 21.64. (MALDI): *m/z* calculated 347.19815 for C₂₂H₂₈O₂Na found 347.19830 ([M+Na]⁺).

3-(3',5'-Di-*tert*-butyl-(1,1'-biphenyl)-4-yl)propanoic acid (**18**)

3-(4-Iodophenyl)propanoic acid (**30c**, 0.28 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.32 g, 3.0 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 17.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (84:14:2) as mobile phase to obtain **18** as colorless solid (0.12 g, 36%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 84:14:2) = 0.28. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.57 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.49 - 7.45 (m, 3H), 7.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 1.38 (s, 18H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 174.09, 151.82, 141.21, 140.94, 140.79, 129.59, 127.99, 122.05, 121.90, 35.91, 35.49, 31.82, 31.14. (MALDI): *m/z* calculated 338.22403 for C₂₃H₃₀O₂ found 338.22410 ([M]⁺).

3',5'-Di-*tert*-butyl-(1,1'-biphenyl)-3-carboxylic acid (**19**)

3-Iodobenzoic acid (**30g**, 0.25 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.32 g, 3.0 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 16 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by HPLC chromatography to obtain **19** as colorless solid (60 mg, 20%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 83:15:2) = 0.32. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.28 (t,

$J = 1.6$ Hz, 1H), 8.04 - 8.01 (m, 1H), 7.92 - 7.89 (m, 1H), 7.59 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.55 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 1.39 (s, 18H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): $\delta = 167.67, 152.20, 143.43, 140.46, 132.56, 132.03, 129.86, 129.00, 128.97, 122.68, 122.26, 35.56, 31.77$. HRMS (MALDI): m/z calculated 310.19273 for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_2$ found 310.19221 ($[\text{M}]^+$).

6-(3,5-Di-*tert*-butylphenyl)pyridine-3-carboxylic acid (20)

6-Bromopyridine-3-carboxylic acid (**30h**, 0.20 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.32 g, 3.0 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.05 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 27 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO_4 , and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87:11:2) as mobile phase to obtain **20** as colorless solid (0.12 g, 40%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87:11:2) = 0.1. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 9.15$ (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 8.31 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 7.54 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 1.35 (s, 18H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): $\delta = 166.37, 160.38, 150.97, 150.39, 137.99, 137.21, 124.86, 123.81, 121.35, 120.33, 34.77, 31.29$. HRMS (MALDI): m/z calculated 312.19581 for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{NO}_2$ found 312.19635 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

5-(3,5-Di-*tert*-butylphenyl)pyridine-2-carboxylic acid (21)

Ethyl 5-(3,5-di-*tert*-butylphenyl)pyridine-2-carboxylate (**33**, 60 mg, 0.20 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (5.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (0.041 g, 1.0 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **21**, which was filtrated and isolated as a pale yellow solid (40 mg, 73%). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.99$ (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J = 8.1, 2.3$ Hz, 1H), 8.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 7.50 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 1.35 (s, 18H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 166.16, 151.39, 147.82, 146.88, 139.51, 135.71, 135.49, 124.79, 122.56, 121.60, 34.78, 31.25$. HRMS (MALDI): m/z calculated 312.19581 for $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_2\text{N}$ found 312.19626 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

3',5'-Di-*tert*-butyl-2-methyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (22)

4-Bromo-3-methylbenzoic acid (**30j**, 0.22 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.32 g, 3.0 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 27 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO_4 , and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed

by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87:11:2) as mobile phase to obtain **22** as colorless solid (0.11 g, 34%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87:11:2) = 0.2. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.87 (s, 1H), 7.83 - 7.79 (m, 1H), 7.41 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 7.34 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 1.8 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.32 (s, 18H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6): δ = 167.32, 150.21, 146.50, 139.49, 135.24, 131.32, 129.96, 129.36, 126.93, 123.07, 120.84, 34.63, 31.28, 20.29. HRMS (MALDI): m/z calculated 324.20838 for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_2$ found 324.20805 ($[\text{M}]^+$).

3',5'-Di-*tert*-butyl-3-methyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (23)

4-Bromo-2-methylbenzoic acid (**30k**, 0.22 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.32 g, 3.0 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 24 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO_4 , and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87:11:2) as mobile phase to obtain **23** as colorless solid (0.20 g, 61%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87:11:2) = 0.26. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 8.05 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.60 - 7.57 (m, 1H), 7.55 (s, 3H), 2.67 (s, 3H), 1.39 (s, 18H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 168.68, 152.12, 146.49, 141.59, 140.26, 132.28, 131.20, 129.13, 125.35, 122.93, 122.37, 35.58, 31.77, 22.07. HRMS (MALDI): m/z calculated 324.20838 for $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_2$ found 324.20701 ($[\text{M}]^+$).

3-Methyl-3',5'-bis(trifluoromethyl)-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylic acid (25)

4-Bromo-2-methylbenzoic acid (**30k**, 0.22 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), (3,5-bis(trifluoromethyl)benzeneboronic acid (**29i**, 0.31 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.38 g, 3.6 mmol, 3.6 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 14 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO_4 , and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (83:15:2) as mobile phase to obtain **25** as colorless solid (0.25 g, 72%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 83:15:2) = 0.38. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 8.37 (s, 2H), 8.10 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.86 - 7.83 (m, 1H), 7.80 - 7.77 (m, 1H), 2.70 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 168.41, 143.36, 142.05, 141.77, 132.78, 132.51, 131.51, 131.15, 128.61, 125.63, 122.32, 21.83. HRMS (MALDI): m/z calculated 348.05795 for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{F}_6$ found 348.05809 ($[\text{M}]^+$).

2-(3-Methyl-3',5'-bis(trifluoromethyl)-(1,1'-biphenyl)-4-yl)acetic acid (26)

2-(4-Bromo-2-methylphenyl)acetic acid (**30i**, 0.23 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-bis(trifluoromethyl)benzeneboronic acid (**29i**, 0.31 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.38 g, 3.6 mmol, 3.6 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 48 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by HPLC chromatography to obtain **26** as pale yellow solid (10 mg, 3%). ¹H NMR (500 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 8.15 (s, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 2.41 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD-*d*₄): δ = 175.09, 144.90, 139.52, 138.11, 135.98, 133.20, 132.42, 129.94, 128.26, 125.88, 123.84, 121.59, 39.53, 19.70. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 362.07360 for C₁₇H₁₂O₂F₆ found 362.07449 ([M]⁺).

2-(3',5'-di-tert-butyl-3-methyl-(1,1'-biphenyl)-4-yl)acetic acid (27)

2-(4-Bromo-2-methylphenyl)acetic acid (**30i**, 0.23 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.38 g, 3.6 mmol, 3.6 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 16 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (85:13:2) as mobile phase and in a second column chromatography with cyclohexane/EtOAc/HOAc (83:15:2) as mobile phase to obtain **27** as colorless solid (0.11 g, 32%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 85:13:2) = 0.22. R_f (cyclohexane/EtOAc/HOAc = 83:15:2) = 0.25. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.47 – 7.40 (m, 5H), 7.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 2.44 (s, 3H), 1.41 (s, 18H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 178.24, 151.15, 142.19, 140.47, 137.30, 130.85, 130.78, 129.71, 125.48, 121.85, 121.49, 38.79, 35.10, 31.67, 19.90. HRMS (MALDI): *m/z* 338.22403 calculated for C₂₃H₃₀O₂ found 338.22402.

3',5'-Dichloro-(1,1'-biphenyl)-3-carboxylic acid (28)

3-Iodobenzoic acid (**30g**, 0.25 g, 1.0 mmol, 1.0 eq), 3,5-dichlorobenzeneboronic acid (**29h**, 0.23 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.38 g, 3.6 mmol, 3.6 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 16 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535, 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added, and the phases were separated. The organic layer was washed with 2 N HCl (10 ml) and dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by HPLC chromatography to obtain **28** as pale yellow solid (10 mg, 4%). ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.29 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.10 (dt, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1H), 7.98 (ddd, *J* = 7.8, 1.7,

1.2 Hz, 1H), 7.73 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 7.66 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.52 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): $\delta = 167.28, 144.43, 139.35, 136.18, 132.51, 132.42, 130.52, 130.31, 129.00, 128.23, 126.64$. HRMS (MALDI): m/z calculated 266.99741 for $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}_2\text{Cl}_2$ found 266.99793 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Ethyl 3'-ethoxy-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylate (31)

Ethyl 4-bromobenzoate (**30d**, 0.20 ml, 1.2 mmol, 1.0 eq), 3-ethoxybenzeneboronic acid (**29k**, 0.24 g, 1.4 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.40 g, 3.6 mmol, 3.0 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.069 g, 0.060 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 5.5 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535 and 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added. The organic solvents were washed with 2 N HCl (10 ml). Organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (9:1) as mobile phase to obtain **31** as colorless oil (85 mg, 26%). R_f (hexane/EtOAc = 9:1) = 0.44. ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): $\delta = 8.11 - 8.06$ (m, 2H), 7.80 – 7.76 (m, 2H), 7.42 – 7.36 (m, 1H), 7.28 – 7.22 (m, 2H), 6.97 (ddd, $J = 8.2, 2.5, 1.0$ Hz, 1H), 4.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.13 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.42 – 1.36 (m, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): $\delta = 166.55, 160.58, 146.15, 142.04, 130.91, 130.69, 130.38, 127.87, 120.15, 115.12, 114.08, 64.12, 61.46, 15.14, 14.62$. MS (ESI+): m/z calculated 293.11 for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_3\text{Na}$ found 293.03 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Ethyl 3'-tert-butyl-5'-methyl-(1,1'-biphenyl)-4-carboxylate (32)

4-Ethoxycarbonylbenzeneboronic acid (**29m**, 0.20 g, 1.1 mmol, 1.2 eq), 3-bromo-5-(*tert*-butyl)toluene (**30f**, 0.20 g, 0.90 mmol, 1.0 eq) and sodium carbonate (0.34 g, 3.2 mmol, 3.6 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 24 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535 and 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added. The organic solvents were washed with 2 N HCl (10 ml). Organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (9:1) as mobile phase to obtain **32** as colorless oil (0.19 g, 71%). R_f (hexane/EtOAc = 9:1) = 0.63. ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6): $\delta = 8.10 - 8.06$ (m, 2H), 7.79 - 7.75 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 4.37 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.41 (s, 3H), 1.43 – 1.35 (m, 12H). ^{13}C NMR (101 MHz, acetone- d_6): $\delta = 166.61, 152.63, 146.99, 140.43, 138.99, 130.66, 130.06, 127.91, 126.92, 126.01, 122.23, 61.40, 35.30, 31.70, 21.70, 14.64$. MS (ESI+): m/z calculated 319.16 for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Na}$ found 319.11 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Ethyl 5-(3,5-di-*tert*-butylphenyl)pyridine-2-carboxylate (33)

Ethyl 5-bromopicolinate (**30i**, 0.23 g, 1.5 mmol, 1.0 eq), 3,5-di-*tert*-butylbenzeneboronic acid (**29j**, 0.28 g, 1.2 mmol, 1.2 eq) and sodium carbonate (0.38 g, 3.6 mmol, 3.6 eq) were dissolved in dioxane (10 ml) and water (2.5 ml). The mixture was stirred at room temperature

for 10 min while the solvents were degassed with argon. Then, Pd(PPh₃)₄ (0.058 g, 0.050 mmol, 0.050 eq) was added and the mixture was stirred under reflux for 20 hours. The resulting mixture was cleared over celite 535 and 20 ml EtOAc and 10 ml HOAc were added. The organic solvents were washed with 2 N HCl (10 ml). Organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (87:11:2) as mobile phase to obtain **33** as colorless solid (60 mg, 18%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 87:11:2) = 0.20. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 9.00 - 8.98 (m, 1H), 8.23 (dd, *J* = 8.1, 2.3 Hz, 1H), 8.16 - 8.13 (m, 1H), 7.63 - 7.60 (m, 3H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.41 - 1.39 (m, 21H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 165.75, 152.61, 149.08, 147.85, 141.13, 137.17, 135.93, 125.62, 123.75, 122.59, 61.83, 35.65, 31.71, 14.59. MS (ESI+): *m/z* calculated 340.22 for C₂₂H₃₀NO₂ found 340.19 ([M+H]⁺).

Methods for in vitro characterization

Hybrid reporter gene assays

Plasmids: The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-NR-LBD¹⁻³ coding for the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the canonical isoform of the respective nuclear receptor have been reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth. *Assay procedure:* HEK293T cells were cultured in DMEM high glucose with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) were added, at 37 °C and 5% CO₂. 24 h before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (3*10⁴ cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega) and the corresponding Gal4-fusion nuclear receptor plasmid. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. After overnight (14-16 h) incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with a Spark 10M luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. All hybrid assays were validated with reference agonists (PPAR α : GW7647; PPAR γ : rosiglitazone; PPAR δ : L165,041; RXR $\alpha/\beta/\gamma$: bexarotene; RAR $\alpha/\beta/\gamma$: tretinoin; LXR α/β : T09021317; FXR: GW4064; CAR: CITCO; VDR: calcitriol). which yielded EC₅₀ values in agreement with literature. EC₅₀/fold activation for bexarotene (**1a**) in this system are: RXR α : 3.0±0.5 nM/125±3-fold; RXR β : 9±2 nM/283±9-fold; RXR γ : 4±2 nM/76±6-fold.

Full-length reporter gene assays for RXR heterodimer activation^{4,5}

HEK293T cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C and 5% CO₂. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (3·10⁴ cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with the reporter RXR-PPAR γ responsive construct PPRE1-pGL3 or the RXR-LXR responsive construct ABCA1-pGL3 as well as pRL-SV40 (Promega). 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (14-16 h) incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with a Spark 10M (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase

data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control.

Determination of aqueous solubility

Aqueous solubility of compound **24** was determined using Whatman Uniprep filters (Whatman plc, Maidstone, UK). 3 mg of each compound and 2 mL H₂O dest. were inserted into the Uniprep vessel and the mixture was shaken at 37 °C for 24 h. The mixture was then pressed through the Uniprep filter and the concentration of dissolved compound in filtrate was quantified by HPLC (Waters 600 Controller and Waters 2487 Dual Absorbance Detector equipped with a MultoHigh100 Phenyl 5 µ 240+4 mm column, CS-Chromatographie Service GmbH) using external calibration.

Metabolism assay

The solubilized test compound **24** (5 µL, final concentration 10 µM in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4)) was pre-incubated at 37 °C in 432 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) together with a 50 µL NADPH regenerating system (30 mM glucose-6-phosphate, 4 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 mM NADP, 30 mM MgCl₂). After 5 min, the reaction was started by the addition of 13 µL of microsome mix from the liver of Sprague–Dawley rats (Invitrogen; 20 mg protein/mL in 0.1 M phosphate buffer) in a shaking water bath at 37 °C. The reaction was stopped by addition of 500 µL of ice-cold methanol at 0, 15, 30 and 60 min. The samples were centrifuged at 5000 g for 5 min at 4 °C. The supernatants were analyzed and test compound was quantified by HPLC: mobile phase: MeOH 83%/H₂O 17%/formic acid 0.1%; flow-rate: 1 mL/min; stationary phase: MultoHigh Phenyl phase, 5 µm, 250×4, precolumn, phenyl, 5 µm, 20×4; detection wavelength: 330 and 254 nm; injection volume: 50 µL. Control samples were performed to check the stability of **24** in the reaction mixture: first control was without NADPH, which is needed for the enzymatic activity of the microsomes, second control was with inactivated microsomes (incubated for 20 min at 90 °C), third control was without test compound (to determine the baseline). The amount of the test compound **24** was quantified by an external calibration curve, where data are expressed as mean±SEM of single determinations obtained in three independent experiments.

Protein purification, crystallization and structure determination

Recombinant ligand-binding domain of RXR α was expressed as an N-terminal His₆ fusion in *E. coli*, and was initially purified using Ni²⁺ affinity chromatography. The histidine tag was then removed by treatment with TEV protease, and the cleaved protein was further purified by size exclusion chromatography. The pure protein in 20 mM Tris and 100 mM NaCl was concentrated to 11 mg/ml, and was mixed with **24** and a coactivator peptide (KHKILHRLLQDSSY) at 5 and 1.2 mM, respectively. The complex was crystallized using sitting drop vapor diffusion method at 20 °C and the solution containing 21% PEG 4000, 0.2 M ammonium acetate and 0.1 M tris, pH 7.5. Crystals were cryo-protected using the mother liquor supplemented with 25% glycerol. Diffraction data were collected at SLS beamline X06SA and were processed and scaled with XDS⁶ and aimless⁷, respectively. Initial structure was obtained by molecular replacement using Phaser⁸ and the published coordinates of RXR α (PDB ID: 5LYQ⁹). Manual model rebuilding and structure refinement was performed in COOT¹⁰ and REFMAC¹¹, respectively. Data collection and refinement statistics are summarized in Table S2.

Supplementary references

- (1) Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-Tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**, *72* (10), 881–887. <https://doi.org/10.1055/s-2006-946680>.
- (2) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (5), 1193–1198. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.066>.
- (3) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J. S.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; et al. Non-Acidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (16), 7199–7205. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00903>.
- (4) Heitel, P.; Gellrich, L.; Heering, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Modulator (SPPAR γ M) in Vitro. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 13554. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31833-4>.
- (5) Heitel, P.; Gellrich, L.; Kalinowsky, L.; Heering, J.; Kaiser, A.; Ohrndorf, J.; Proschak, E.; Merk, D. Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10* (2), 203–208. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.8b00551>.
- (6) Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66* (Pt 2), 125–132. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>.
- (7) Evans, P. R.; Murshudov, G. N. How Good Are My Data and What Is the Resolution? *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2013**, *69* (Pt 7), 1204–1214. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>.
- (8) McCoy, A. J. Acknowledging Errors: Advanced Molecular Replacement with Phaser. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1607*, 421–453. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_18.
- (9) Scheepstra, M.; Andrei, S. A.; Unver, M. Y.; Hirsch, A. K. H.; Leysen, S.; Ottmann, C.; Brunsveld, L.; Milroy, L.-G. Designed Spiroketal Protein Modulation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56* (20), 5480–5484. <https://doi.org/10.1002/anie.201612504>.
- (10) Emsley, P. Tools for Ligand Validation in Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D, Struct. Biol.* **2017**, *73* (Pt 3), 203–210. <https://doi.org/10.1107/S2059798317003382>.
- (11) Skubák, P.; Murshudov, G. N.; Pannu, N. S. Direct Incorporation of Experimental Phase Information in Model Refinement. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2004**, *60* (Pt 12 Pt 1), 2196–2201. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019079>.

16.2 Therapeutic Applications of the Versatile Fatty Acid Mimetic WY14643

Pollinger, J.; Merk, D. Therapeutic Applications of the Versatile Fatty Acid Mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, 27 (4), 517–525

Reprinted with permission: This is the authors accepted manuscript of an article published as the version of record in *Expert Opinion on Therapeutic Patents* © 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group,
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13543776.2017.1272578?journalCode=ietp20>

Publisher: Taylor & Francis

Journal: *Expert Opinion on Therapeutic Patents*

DOI: 10.1080/13543776.2017.1272578

Therapeutic applications of the versatile fatty acid mimetic WY14643

Julius Pollinger

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9,
60438 Frankfurt

PhD student

Daniel Merk*, PhD

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9,
60438 Frankfurt

0049/69/798-29328

merk@pharmchem.uni-frankfurt.de

Junior group leader (Habilitation)

*Author for correspondence

Keywords

fatty acid mimetic

drug discovery

nuclear receptor modulator

metabolic diseases

neurodegeneration

Abstract

Introduction: WY14643 - also known as pirinixic acid - is a versatile fatty acid mimetic that was originally developed as lipid lowering agent without knowledge of its molecular target. Various later studies discovered somewhat promiscuous activity of the compound on several receptors and enzymes. Pirinixic acid though never having reached clinical use was subjected to many *in vivo* studies and exerted beneficial effects in a variety of disease models.

Areas covered: Inventions claiming the use of WY14643 for numerous indications ranging from the originally intended application in metabolic dysbalances over cancer and inflammation to some rare syndromes have been evaluated.

Expert opinion: It is rather unlikely that pirinixic acid will gain relevance in treatment of metabolic diseases for which it was originally developed because more efficient and selective alternatives are available. Instead, several other claimed activities of the compound e.g. in inflammation, neurodegeneration and cancer seem very promising. However, some of the underlying studies are biased and for some effects of pirinixic acid, the molecular target and mode of action remain to be identified.

1 Introduction

Pirinixic acid (WY14643, PA, **1**, figure 1) was first published in 1974 by Santilli et al. [1] as a new lipid-lowering agent. The compound was discovered in a screening of multiple 2-pyrimidinylthioacetic acid derivatives in a mouse model without knowledge of the underlying mechanism or molecular target. In these animal experiments, PA exhibited superior hypocholesterolemic activity (up to 180-fold) compared to clofibrate [1]. Since its discovery, but especially after its peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activating characteristics had been demonstrated [2], PA was extensively used as a tool compound to study PPAR-mediated effects but has never reached clinical use which is probably due to several side-effects [3]. As side-effects PA at a dosage of 5 mg/kg caused reversible hepatomegaly up to 160% compared to untreated rodents [4]. Additionally, PA showed myotoxic effects in a cell-culture model of myotoxicity after long-term incubation with 1 or 10 μ M [5]. Moreover, renal toxicity has been reported starting at doses of 10 ppm in the feed of rats and mice over 3 months [6].

PA was subjected to numerous *in vitro* studies and animal models that revealed multiple effects for the compound. Several of these activities such as improved metabolic parameters are consequences or connected with the primary lipid lowering characteristic [7]. However, a considerable proportion of PA's *in vivo* effects cannot be explained by PPAR activation alone and other molecular mechanisms must be involved. Due to these pleiotropic activities, other putative indications than metabolic disorders came into focus for PA. Positive effects have been reported from animal models e.g. in the prevention and treatment of non-small cell lung cancer [8] and depression [9]. For its diverse effects and continuous appearance in various studies for very distinct diseases ranging from metabolic dysfunction to neurodegeneration (figure 2), PA and patents claiming the compound seem worth a closer evaluation.

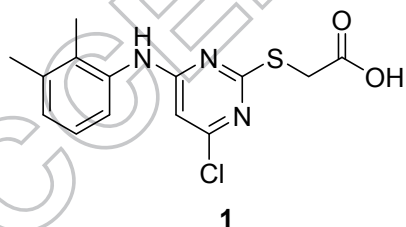


Figure 1: Chemical structure of pirinixic acid (WY14643)

2 Properties and bioactivity profile

PA displays the typical architecture of a fatty acid mimetic with an acidic head group that is connected to a lipophilic and mostly aromatic backbone via a flexible linker. PA has a merely fragment-like size and incorporates considerable polarity in the pyrimidine core that help equipping it with favourable properties for solubility and oral bioavailability without violating

the rule of five (MW = 324 Da; H-bond donors = 2; H-bond acceptors = 6; tPSA = 75; clogP = 4.4; number of rotatable bonds = 5). Eventually as a result of its small size and typical architecture, pirinixic acid is a quite promiscuous fatty acid mimetic that interacts with several molecular targets (table 2) and activity has been reported on nuclear receptors as well as various enzymes. According to its lipid lowering activity, PA activates PPAR α and PPAR γ which was repeatedly observed in Gal4 hybrid reporter gene assays. The test systems differed in cell-types, reporter and control plasmids but reported quite uniform EC₅₀ values with differences only due to protocol variations. Some of the used cell-types might be more sensible to toxicity or differences in stability and incubation time could have affected the results. Two of the studies also included PPAR δ which was not activated by PA in a concentration up to 100 μ M[7,11].

Table 1: Reported PPAR activation by PA in different cell-types and assay settings. n.d. = not determined

Cell-type	PPAR α	PPAR γ	PPAR δ	References
HepG2	21.9 \pm 10.5 μ M	28.6 \pm 3.1 μ M	n.d.	[12]
3T3-L1	61.9 \pm 23.4 μ M	Estimated >100 μ M (6-fold activation at 100 μ M)	n.d.	[12]
Cos7	36.3 \pm 2.9 μ M	53,7 \pm 0.8 μ M	Estimated >100 μ M (relative activation at 100 μ M 17 \pm 3%)	[10]
HEK293	12.6 \pm 1.1 μ M	29.3 \pm 4.3 μ M	No activity found	[11]

Furthermore, pirinixic acid and derivatives have evolved as modulators for the γ -secretase [13,14], an enzyme attracting considerable attention due to its possible involvement in Alzheimer's disease where it mediates the C-terminal cleavage as the last step in the conversion of the amyloid precursor protein [15]. PA also inhibits aldose reductase (AR) in a non-competitive manner with a K_i of about 1.8 μ M. AR is involved in the conversion of glucose to sorbitol, a reaction which is of particular interest under hyperglycemic conditions. The increased accumulation of sorbitol, and its cell-damaging effect, could be a cause for long-term complications of diabetes, in particular for heart failure [16]. The isopropyl esters of PA and of fibrates have been reported to antagonize liver X receptor (LXR) activation with K_i(LXR α , PA) = 8 μ M and K_i(LXR β , PA) = 5.6 μ M [17]. Free PA revealed no antagonistic effect up to 100 μ M. In mouse livers but not in plasma, low concentrations of isopropyl fenofibrate that might account for LXR antagonism *in vivo* were detected [17]. No *in vivo* data is available on isopropyl PA but in light of the rapid conversion of aliphatic esters *in vivo* and the moderate affinity for LXRs, the LXR antagonistic effect of isopropyl PA seems of subordinate relevance. Furthermore, for the fatty acid mimetic PA also interaction with enzymes such as cyclooxygenase (COX), 5-lipoxygenase (5-LO) or the microsomal PGE₂

synthase-1 (mPGES-1) seems reasonable. For 5-LO and mPGES-1, which are involved in arachidonic acid metabolism and inflammation, various derivatives of PA have been synthesized but PA itself showed no significant activity [3,18].

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 2: Bioactivity profile of pirinixic acid. Pharmacological activity has been reported on various nuclear receptors and enzymes.

Receptor	Activity	References
PPARα	EC ₅₀ = 12.6 – 61.9 μ M	[10,11,12]
PPARγ	EC ₅₀ = 28.6 – >100 μ M	[10,11,12]
γ-Secretase	Modulatory effects	[13,14]
Aldose reductase	K _i = 1.8 μ M	[16]
LXRα (PA isopropyl ester)	K _i = 8 μ M (antagonistic)	[17]
LXRβ (PA isopropyl ester)	K _i = 5.6 μ M (antagonistic)	[17]

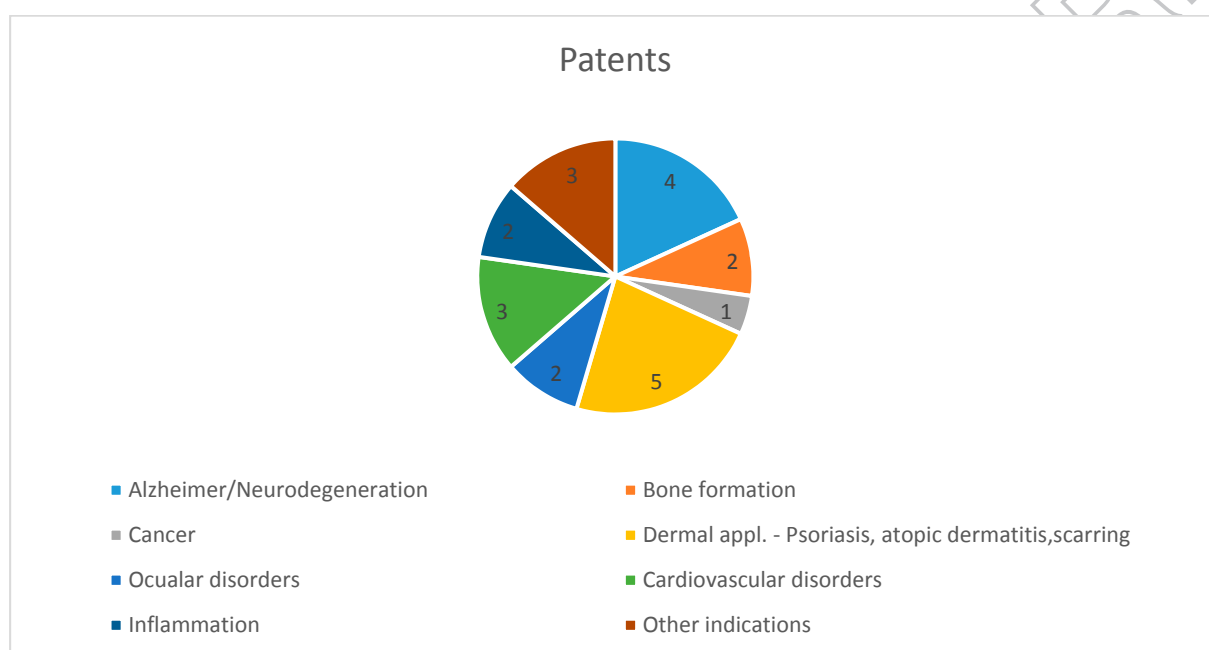


Figure 2: Indications of therapeutic patents claiming or mentioning pirinixic acid.

3 Therapeutic patents

3.1 Alzheimer/Neurodegeneration

It is widely agreed that Alzheimer's disease (AD) is associated with high-levels of accumulating amyloid β ($A\beta$) in the central nervous system while the underlying pathophysiological mechanisms are less understood. Several studies suggest that AD pathogenesis might involve the Sortilin-related receptor SORL1 (also referred to as sorting protein-related receptor; sorLA) since some AD-patients express reduced amounts of this low density lipoprotein receptor (LDLR) related protein in the central nervous system. SORL1 is involved in the diversion of the amyloid precursor protein (APP) towards the retromer recycling pathway leading to a reduced formation of toxic $A\beta$. PA in a concentration of 100 μ M increased the expression of SORL1 mRNA *in vitro* in the breast cancer epithelial cell line MCF7 and the prostate cancer epithelial cell line PC3 and based on these findings its use was claimed for the prevention and treatment of Alzheimer's Disease by researchers at the University of Columbia, Toronto and Boston [19].

Pirinixic acid was also evaluated in an *in vitro* assay with an immortalized mouse hippocampal cell line (HT-22) to discover any neuroprotective effects against glutamate exposure as model for a toxic insult. The experiment failed to reveal protective effects at the reported concentration range between 1 and 40 μM which were probably too low for considerable PPAR γ activation. Moreover, at high concentrations above 40 μM PA even worsened the toxic effect of the glutamate exposure. On the other hand, protective effects were observed with two other PPAR γ activators, (e.g. troglitazone) so the use of PPAR γ agonists as protection for neuronal cells against a toxic insult was claimed with PA or derivatives as examples. But the inventors themselves postulated, that the neuroprotective action of the two successful compounds may not be mediated via PPAR due to the missing effects of other tested PPAR γ activators [20].

Another invention is related to the PA induced reduction of secreted A β -42, a variant of amyloid that is thought to have a great impact on developing plaques. The effect was observed in SM-4 cells, a human embryonal kidney HEK293 EBNA cell line stably transfected with the Swedish mutant β -amyloid Precursor Protein, and could not be explained by PA's PPAR α agonistic effect alone because the PPAR α agonist clofibrate failed to reduce A β -42 in the same system. In addition to lower A β -42 levels, the intracellular concentrations of APP and C99 were elevated. PA also significantly increased the secretion of the soluble variation of beta-amyloid APP_{sa} in the SM-4 cell line and the reduction of A β -42 secretion was confirmed with human neuroblastoma cells after transient infection with the Swedish mutant APP, a model of the development of AD. Additionally, in murine primary cortical neurons infected with APP 695, A β -42 was reduced in a dose-dependent manner [21].

Another neurodegenerative disease is the Wolfram Syndrome, a rare yet severe disease with no therapy available. It is an autosomal recessive disorder with more than 100 possible mutations in the WFS1 gene encoding an endoplasmatic reticulum resident transmembrane protein. The exact function of this protein remains unclear, but its mutations affect intracellular ion homeostasis, cell-cycle progression and granular acidification. Consequently, reduced activity or expression of WFS1 protein leads to neuronal death. The inventors suggest, based on another publication where they discovered a reduction of p21 in WFS1 deficient cell-lines [22], that an increase in activity or amount of p21 – protein, which suppresses apoptosis, would help to stop or slacken the progress of degeneration. Pirinixic acid is claimed as inducer of p21 which may be due to PPAR γ activation. However, *in vitro* experiments revealed no significant changes in p21-levels after PA treatment [23]. Part of this patent is a list of p21 modulators where PA was mentioned, but not selected for further testing in this patent [24].

3.2 Bone formation

Pirinixic acid was tested in rodents for its effects on bone mineral density(BMD). In a dosage of 50 mg/kg applied over 4 months via intragastric gavage PA raised the BMD significantly by about 7%. As comparison, the PPAR α activator fenofibrate raised BMD by about 5,7% while the PPAR γ agonist pioglitazone caused a decrease in BMD and the dual PPAR α / γ agonist tetradecylthioacetic acid(TTA) [25] revealed an increase by about 5%. Consequently, the inventors postulated that the α agonistic effects induced the increase in BMD and that this effect is stronger than the decreasing effects of PPAR γ agonism. In an *in vitro* model using the pre-osteoblasts cell-line RAW264.7, PA enhanced the secretion of osteoprotegerin (OPG), a strong inhibitor of bone-resorption. On the other hand, also an increased secretion of IL-6,

which is known as a stimulator of bone resorption was observed. Pioglitazone caused the opposite effects of PA on OPG and IL-6, so in combination with the *in vivo*

data the inventors assumed that the inhibition of bone resorption through OPG outbalanced the stimulation causing improved BMD in the rodent model [26]. The potential use in the treatment of bone diseases is further supported by another invention. The authors claimed several PPAR α or δ activators, for treatment or prophylaxis of bone diseases with the intention to discover bone anabolic compounds with superior effects to prostaglandin E₂ which has multiple side-effects. Their *in vitro* studies using different fibrates for PPAR α and δ activation, but not the activation of PPAR γ , revealed bone anabolic effects. Due to a lack of a single reliable test assay for anabolic activity, fibroblastic-colony forming units from whole bone marrow cells (BMC) and high-density non-adherent stromal precursor (NASP) cell cultures from male Wistar rats served as surrogate. Cells were exposed to the test compounds and for four days (NASP) or 18 days (BMC) respectively and then analysed compared to untreated cells. In the invention, PA is mentioned in an exemplary list of suitable compounds [27].

3.3 Cancer

5-lipoxygenase has been shown to inhibit the stimulation of cell proliferation caused by insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor and ligand overexpression are conserved features of breast and lung cancers [28]. Additionally, there are reports on altered expression and activity of PPAR γ in certain cancer types (e.g. colon carcinoma) [29]. Based on these considerations, a possible cancer treatment by addressing both targets at once has been claimed. WY14643 in combination with an inhibitor of the 5-lipoxygenase was tested *in vitro* for the treatment or prevention of epithelial cell-derived cancers especially breast and lung cancer. The preferred concentration was 1-5 μ M of either drug. WY14643 showed a dose dependent growth reduction on two breast cancer cell-lines up to 60-80%. The effect on lung cancer was tested with four different cell-lines but WY14643 showed only minimal effect on cell growth and no apoptosis was induced in this setting [30]. In contrast to this, a later study reported anti-tumorigenic activity for PA in a mouse model (using 0,02% PA in drinking water) for lung cancer and in a cell-based assay. However, the effect was only present at high concentrations and might be due to unspecific cytotoxicity [8]. PA might, therefore, have potential in cancer treatment but better models and further data are required.

3.4 Dermal Application

In a very small clinical trial, PA was topically administered to three humans with psoriasis, one patient with a psoriasis not responding to other treatment and one patient with severe atopic dermatitis. PA was administered twice daily over 4 weeks as a 5%-cream in a left/right-comparison to a placebo formulation. All patients experienced a benefit from the treatment and the observations indicated, that a longer therapy could be more effective. The inventors assumed that the effect is not mediated via PPAR α activation, because the PPAR α agonist clofibrate was not effective in the treatment of psoriasis [31]. Due to the very small number of participants in this study statistical evaluation is missing. The reported left/right-arm-comparison may help to identify a trend but for a trusted statement, considerably more participants are required. [32].

In another invention related to dermatologic use of PA, LXR – antagonistic effects of PA and other compounds were claimed as useful in prevention, reduction or inhibition of scarring. In an *in vivo* model where the LXR antagonist fenofibrate was injected to mice prior to wounding (100 μ L of three different concentrations: 1 ng/100 μ L, 10 ng/100 μ L and 1000 ng/100 μ L) and after wounding for 70 days (50 μ L at each end of the scar). Afterwards the mice were sacrificed and the tissue was investigated macroscopically and microscopically. The macroscopically and microscopically detectable reduction of the scarring process was only significant at the concentration of 10 ng/100 μ L so that the inventors postulated a “bell-shaped” profile of the dose-activity curve.

PA is only mentioned as example compound in the patent but was not used in the studies and no results are provided for the compound [33].

PA was also investigated as an agent to reduce intercellular adhesion molecules (ICAM), such as ICAM-1, synthesis as response to endothelial stress. For this purpose, PA was studied in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human dermal microvascular endothelial cells (HMVEC-d). After five days treatment with dexamethasone and simultaneously co-treated with 10 μ M PA, these endothelial cells were further stressed with 1 μ M phorbol myristate acetate (PMA). The cells were then harvested after 8, 24 and 48 hours and the ICAM-1 concentration was determined. PA showed no positive effect and was therefore mentioned in this invention but not claimed [34].

Topical use of PA was claimed for the treatment of autoimmune skin reaction, skin irritation after radiation exposure either prophylactic or after the irritation and for skin reaction in case of a transplantation. In an *in vitro* model with human keratinocytes (HaCaT) treated with 200 μ M PA the amount of mRNA of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 was determined 6 hours after stressing the cells with 150 mJ/cm² radiation for 165 seconds. Furthermore, the amount of secreted IL-6 and IL-8 was quantified 24 hours after radiation. PA showed a significant reduction in both measurements. The authors conclude, that IL-6 and IL-8 production could be influenced by PPAR α/δ activation. Furthermore, they postulate an involvement of these cytokines as a shared factor in the claimed indications. The pleiotropic effects of IL-6 on proliferation and differentiation of immune cells in combination with pleiotropic effects of IL-8 as part of the chemotaxis of T-cells, are proposed as the rationale of the observed effects. The HaCaT cells revealed no relevant toxic effects up to concentrations of 400 μ M. To further support their theory, which was founded their observations on IL-6 or IL-8 production, the inventors tested a dermal application of an unguent containing 2% PA in two persons. The formulation was applied to one arm of each participant while the other arm remained untreated. After 4 hours, both arms were radiated with an ascending amount of energy. 18 hours after radiation, the treated arms developed erythema above a radiation energy of 63 mJ/cm² while the untreated arms showed erythema from an energy of 36 mJ/cm. These findings may indicate a physiological relevance of the observed decrease in IL-6/IL-8 production but due to the very low number of participants, no statistical evaluation is possible [35].

Finally, PA was claimed for the topical use to restore perturbed epidermal barrier function. The compound was studied for an effect on transepidermal water-loss (TEWL) using skin explants from Sprague-Dawley rats. The explants were placed dermis-side down onto a collagen membrane and inserted into a medium in a setting where water loss could only occur through the epidermal surface. PA in a concentration of 100 μ M significantly reduced TEWL. As part of the invention, significant reduction of TEWL was reported for activators of

PPAR α , FXR and LXR α . To further investigate the PPAR α effects, clofibrate was used as selective PPAR α activator, which caused an increased activity of β -glucocerebrosidase and steroid sulfatase, two enzymes associated with a competent dermal barrier. Additionally, increased amounts of the proteins involucrin and transglutaminase were detected, which are markers of epidermal differentiation. Additionally, PPAR α activation was shown to inhibit growth of keratinocytes. The improvement in TEWL might, therefore, be the result of an alteration in the dermis from growth to a more differentiated and competent dermal barrier, which leads to a reduced permeability [36].

3.5 Ocular disorders

Pirinixic acid (PA) has been studied as a potential therapeutic option for glaucoma. A proportion of glaucoma patients displays increased levels of serum amyloid A (SAA) protein levels and glaucomatous trabecular meshwork expresses significantly enhanced levels of SAA. Reducing SAA might, therefore, be a new strategy in the therapy of glaucoma and PA is an inhibitor of SAA expression [37]. A later invention postulates that the gene p21^{Waf1,Cip,Sdf1} is stimulating the expression of SAA. Since it is regulated via PPAR α on genetic level, the use of PA was claimed for ophthalmic and other disorders which might be associated with this gene [38,39].

Another therapeutic indication of PA might exist in emmetropia disturbing disorders (EDD). Analysis of the proteome of chicken retina and sclera revealed that Apolipoprotein A1 (ApoA1) is up-regulated in conditions where axial eye growth is slower than normal. ApoA1 could, therefore, act as a stop signal for axial eye growth, and inhibition of ApoA1 expression could be useful for disorders associated with hyperopia. Vice versa, activation of ApoA1 expression might be beneficial in disorders associated with myopia. Since PPAR α activation is known to up-regulate ApoA1, PA is claimed as an example of known PPAR α activators for the use in such diseases. In a chicken animal model with lens-induced myopia the animals were treated for four days either with fenofibrate, the PPAR α agonist GW7647 or a placebo injection into the eyes. Fenofibrate dose-dependently reduced the myopia and reached statistical significance at the highest dose of 500 μ g per injection. GW7647 also showed a reduction of the myopia but failed to reach statistical significance [40].

3.6 Cardiovascular disorders

PA was also evaluated in a rodent model for sepsis-induced heart failure. Cardiac dysfunction can be a consequence of severe sepsis and is characterized by reduced contractility, diastolic dysfunction and reduced ejection fraction. Although the mechanisms leading to the heart failure are not well understood, it is known, that it is accompanied with a reduction in the metabolic rate. The inventors showed, that sepsis is associated with reduced fatty acid oxidation (FAO) as a result of reduced activity of PPAR α among others. Activation of PPAR α might, therefore, restore FAO and could help to prevent sepsis induced heart failure. In the animal model, four rodent groups daily received lipopolysaccharide (LPS) for sepsis induction, PA (30 mg/kg), LPS and PA or vehicle. Animals receiving PA displayed improved fractional shortening of the heart, a parameter often used as marker of heart failure [41]. However, this improvement was only statistically significant when healthy control mice receiving vehicle and healthy mice under PA treatment were compared. Amongst mice with LPS-induced sepsis, this effect failed to reach statistical significance. Still, the inventors postulated and claimed that PA might be able to increase or maintain cardiac function [42].

Another invention postulates that modulation of nuclear receptors such as estrogen receptors, retinoic acid receptors, glucocorticoid receptors, thyroid hormone receptors, PPARs, androgen and vitamin D receptors could be useful in the treatment of vascular and related disorders. This theory was only supported by published data wherein e.g. PPAR γ activation inhibited vascular smooth muscle cell activation [43]. Hence, the use of PPAR-activators such as PA was claimed for the use as a bioactive ingredient in e.g. stents to prevent a restenosis or other vascular diseases. Altogether, the focus of this invention lies on the use of an implantable device as carrier for a lot of different active ingredients amongst which was PA that can alter gene expression via multiple possible nuclear receptors [44].

PA was claimed as a representative PPAR α activator to treat multiple cardiovascular diseases associated with PPAR including atherosclerosis, chronic renal failure or restenosis. The compound was shown capable of inhibiting neo-intimal proliferation in an organ culture model of restenosis using porcine coronary arteries. In this experiment, arteries were cultured *ex vivo* for 14 days with 250 μ M PA, then vessel segments were sectioned and a morphometry measurement was carried out to quantify the restenosis. In a concentration of 250 μ M PA inhibited DNA synthesis in human saphenous vein and human internal mammary artery smooth muscle cells (SMC) in response to stimulation with platelet-derived growth factor (PDGF). Furthermore, the compound inhibited growth of human proximal tubule cells. Notably, these effects failed to occur without the mitogenic stimulus. These findings indicate that PPAR α activation could inhibit cell proliferation and might, therefore, be useful in the treatment of restenosis. However, the concentrations of PA used in the reported experiments are extraordinarily high and unspecific effects are likely [45].

3.7 Inflammation

In the search for new methods to treat mitigate cartilaginous inflammation PA came into focus for its anti-inflammatory characteristics. Current treatment of cartilaginous inflammation with COX inhibitors is limited by adverse effects such as gastrointestinal sequela. Use of PA as PPAR α agonist in a concentration of 10 μ M 2 hours before induction of a shear induced stress-reaction in the human chondrocytic cell line T/C28a2 caused significant down-regulation of COX-2 and glutathione-S-transferase mRNA as well as induction of caspase-9 precursor 48 hours after cell-stressing. Untreated control cells, in contrast, showed considerable apoptosis that might be associated to low expression levels of glutathione-S-transferase and high caspase-9 precursor expression. Combining these findings, the inventors postulate PPAR α activation as a possible new strategy for anti-inflammatory treatment[46].

Together with some other PPAR α and PPAR δ modulating compounds, PA was evaluated in an animal model, using female Lewis rats, for adjuvant-induced arthritis. Arthritis was induced using an injected emulsion of *Mycobacterium butyricum* into the primary paw. The contralateral paw wasn't treated and used as a control. Altogether the study comprised nine groups with different active agents and one control group. One group received PA at a dose of 30 mg/kg p.o. once daily. Before the injection and at several time points afterwards lateral radiographs were recorded. The study was meant to last 21 days during which the changes observed in the radiographs were ranked for severity. Due to a lack of efficacy concerning prevention of swelling, the rats treated with PA were euthanized on day 14. Still, PA is mentioned as example in the invention [47].

3.8 Other indications

In addition to above discussed main indications and clusters of diseases where PA has repeatedly been claimed there are also some patents for other disorders.

One invention relates to the potential of (mostly) PPAR δ and, to a lesser extent, PPAR γ activation in improving the treatment or prevention of respiratory infections or conditions. A mouse model of Pneumonia in animals with macrophage specific PPAR δ knock-out displayed a decreased survival rate. Similar data was also obtained for PPAR γ and, therefore, several PPAR activators including pirinixic acid have been claimed in this indication [48].

PPAR α agonism has also been postulated as a new target in the treatment of neuropsychotic disorders. Various mouse models of depression, anhedonia and despair behaviours such as the forced swim test revealed effects of the PPAR α agonist fenofibrate comparable with the antidepressant fluoxetine during acute and chronic treatment. Importantly, some of these effects occurred at dosages below concentrations used in metabolic treatment. The invention claims PA as one of many PPAR activators [49].

Furthermore, PPAR α activation was claimed for the treatment of non-inflammatory pain. Several mouse models indicated, that intraplantar administration of PA (50-200 μ g/mouse) dose-dependently caused acute analgesia independent from anti-inflammatory effects. This effect was abolished in PPAR α deficient mice and, therefore, a non-genomic effect of PPAR α activation on nociception was assumed. Prior to ligand binding, PPAR α is part of a multi-protein complex, also containing heat-shock protein HSP90. HSP90 is associated with other acute effects of nuclear receptor ligands, so the inventors postulated, that the analgesic effect was mediated by the release of HSP90 after ligand binding. This was confirmed, using an inhibitor of HSP90, which abolished the analgesic effects of PPAR α activators [50].

Table 3: *In vitro* and *in vivo* effects reported for pirinixic acid in therapeutic patents

Indication	Experiment	Concentration	Observed effects	References
Alzheimer Neurodegeneration	<i>in vitro</i> Cell-line: MCF-7 PC3	100 μ M	mRNA of SORL1 increased APP expression slightly reduced	[19]
Alzheimer Neurodegeneration	<i>in vitro</i> Cell-line: HT-22	1 – 40 μ M	No protection against toxic-insults	[20]
Alzheimer Neurodegeneration	<i>in vitro</i> Cell-line: SM-4; human neuroblastoma cells; murine primary cortical neurons	10 – 500 μ M	Reduced secretion of A β -42; no significant decrease in total A β	[21]
Alzheimer Neurodegeneration	<i>Literature</i>	-----	----	[24]
Bone formation	<i>In vivo</i>	50 mg/kg	BMD improved	[26]
Bone formation	<i>in vitro</i>	----	BMC showed	[27]

	<i>(BMC/NASP cells)</i>		anabolic activity	
Cancer	<i>In vitro</i> <i>Breast cancer cell-line</i> <i>Lung cancer cell-line</i>	1-5 μ M	Dose-dependant growth reduction	[30]
Dermal application	<i>Clinical study/ human in vivo model</i> <i>5 patients</i>	5%-weight	four patients with psoriasis and one with atopic dermatitis showed a positive response compared to placebo	[32]
Dermal application	<i>In vivo rat model</i>	1 ng/100 μ L, 10 ng/100 μ L, 1000 ng/100 μ L (0,031 μ M, 0,31 μ M, 30,88 μ M)	After 70 days of treatment using the 0,3 μ M concentration the scarring was reduced	[33]
Dermal application	<i>In vitro</i> Cell-line: HUVEC HMVEC-d	10 μ M	No reduction in the stress-induced production of I-CAM	[34]
Dermal application	<i>In vitro</i> Cell-line: HaCaT <i>Clinical study/ human in vivo</i> <i>2 participants</i>	200 μ M	mRNA-levels of IL-6 and IL-8 reduced, also the level of secreted IL-6 and IL-8 was reduced; the two participants could take a higher dosage of energy before erythema occurred	[35]
Dermal application	<i>in vitro / model using skin explants</i>	100 μ M	TEWL reduced	[36]
Ocular disorders	<i>Literature</i>	----	----	[37,38,39]
Ocular disorder	<i>Literature</i>	----	----	[40]
Cardiovasuclar	<i>in vivo</i>	30 mg/kg	Reduced	[42]

disorders	<i>rodent model</i>		fractional shortening	
Cardiovascular disorders	<i>Literature In vitro cell-assay</i>	---	Reduced vascular smooth muscle cell activation	[43,44]
Cardiovascular disorders	<i>In vitro cell-assy</i>	250 μ M	DNA synthesis of heptoma cells after stimulation is inhibited	[45]
Inflammation	<i>in vitro Cell-line T/C28a2</i>	10 μ M	Phase-2 inflammatory genes reduced	[46]
Inflammation	<i>in vivo</i>	30 mg/kg	No prevention in swelling	[47]
Respiratory infection	<i>in vivo mouse model</i>	---	PPAR γ activation might be important for macrophage activation	[48]
Depression	<i>in vivo multiple mouse models</i>	---	Positive effects of PPAR α activation on affective disorders	[49]
Non-inflammatory pain	<i>in vivo multiple mouse models</i>	50-200 μ g	Acute analgesic effects	[50]

4. Expert opinion

Pirinixic acid constitutes a classical fatty acid mimetic defined by its typical molecular architecture of an acidic head group and a lipophilic predominantly aromatic backbone. At the time when the molecule was developed as lipid lowering agent, the underlying molecular target was unknown and, therefore, the compound was optimized for *in vivo* activity instead of *in vitro* potency on a defined target. This strategy offers the advantage of excluding inefficiency *in vivo* despite high potency on target but is at risk of identifying promiscuous compounds. Accordingly, several molecular targets have been identified that are modulated by pirinixic acid and the molecule has rather weak potency on these targets. Such polypharmacological behaviour might be seen as unwanted unspecificity of a compound that is prone to generate side-effects. However, promiscuous activities might also contribute to a desired 'phenotypic' effect that is generated by a drug and recent trends in drug discovery are tending to profit from polypharmacological behaviour instead of avoiding it [51]. Therefore, whether an effect is considered unwanted strongly depends on the therapeutic intention for a compound and for many of the reported studies on PA, promiscuity seems an important advantageous characteristic.

Although pirinixic acid was developed as lipid lowering agent and its PPAR agonistic activity was identified as cause for this effect soon after, later experiments discovered several other

interesting and beneficial activities of pirinixic acid. Some of these also seem due to activation of the nuclear PPARs that exhibit a wide variety of genomic effects. PPARs regulate metabolic pathways including glucose and lipid homeostasis but also mediate anti-inflammatory effects. However, a large proportion of activities reported and claimed for pirinixic acid cannot be explained by PPAR modulation, at least not alone. Accordingly, several studies and patents report the use of pioglitazone or a fibrate – more potent and more selective PPAR modulators – as control experiments and did not observe the effects of pirinixic acid with the control compounds. Therefore, the underlying target of several effects reported for pirinixic acid remains unknown and the high promiscuity of the compound seems very valuable for its activity in many cases.

However, a number of inventions that mention PA fail to provide any evidence for the actual efficacy of the compound. Often, PA is mentioned in a long list of candidate agents that are ‘known’ for a certain activity such as PPAR agonism. Therefore, it is questionable if PA actually possesses the claimed effects. Another major issue of some patents and related studies is the extraordinary high concentration of PA that was applied. The concentrations up to 250 μ M are very likely to cause unspecific toxicity and render the claimed use rather questionable, particularly where cancer treatment is in the focus.

Pirinixic acid has never reached therapeutic use for metabolic diseases and since several more potent and more selective PPAR modulators are available on the drug market for this purpose, it is not likely that pirinixic acid will come back into focus for such indication. In contrast, other effects of the fatty acid mimetic are very promising. In particular, studies concerning the use of pirinixic acid in inflammatory disorders such as psoriasis or sepsis have reported convincing data that suggests therapeutic efficacy and benefits. Eventually, the highly complex nature of inflammatory diseases profits from the promiscuous activities of pirinixic acid which might exert several synergistically additive effects instead of a strong modulation of only one pathway. Similar considerations might explain the promising *in vivo* results for pirinixic acid in prevention and therapy Alzheimer’s Disease.

In light of the wide variety of indications for which pirinixic acid has been claimed in patents, its promiscuous effects possibly seem to be its greatest strength. On the other hand, this promiscuity that cannot entirely be related to specific targets yet, might also impede the further development of the compound. Therefore, it is imperative to identify the molecular targets of pirinixic acid that are responsible for its promiscuous beneficial effects especially in inflammatory diseases. Then, the fatty acid mimetic can once more serve as valuable lead compound for drug discovery. PA has proven very promising activities in numerous disorders and holds considerable therapeutic potential. To exploit this potential, however, better knowledge on the molecular targets that mediate the promiscuous effects of PA will be essential.

Funding

No funding to declare.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the

manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

5. References

Papers of special note have been highlighted as:

* of interest

** of considerable interest

[1] Santilli AA, Scotese AC, Tomarelli RM. A potent antihypercholesterolemic agent: [4-Chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14643). *Experientia*. 1974;30(10):1110-1111.

****First report of PA and its preparation.**

[2] Göttlicher M, Widmark E, Qiao L, et al. Fatty acids activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89(10):4653-4657.

[3] Merk D, Zettl M, Steinhilber D, et al. Pirinixic acids: flexible fatty acid mimetics with various biological activities. *Future Med Chem*. 2015;7(12):1597-1616.

***Overview of PA and PA derivatives with activity on different targets.**

[4] Tomarelli RM, Bauman LM, Savini S. Effect of WY-14,643 on cholesterol metabolism in normal and hypercholesterolemic rats. *Atherosclerosis*. 1978;30:301-311.

[5] Johnson TE, Zhang X, Shi S, et al. Statins and PPAR α agonists induce myotoxicity in differentiated rat skeletal muscle cultures but do not exhibit synergy with co-treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;208(3):210-221.

[6] Ozaki K, Mahler JF, Haseman JK, et al. Unique renal tubule changes induced in rats and mice by the peroxisome proliferators 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and WY-14643. *Toxicol Pathol*. 2001;29(4):440-450.

[7] Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- α agonist, Wy 14643, improves metabolic indices, steatosis and ballooning in diabetic mice with non-alcoholic steatohepatitis. *J of gastroenterol hepatol*. 2012;27(2):341-350.

[8] Skrypnik N, Chen X, Hu W, et al. PPAR α activation can help prevent and treat non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2014;74(2):621-631.

[9] Jiang B, Huang C, Zhu Q, et al. WY14643 produces anti-depressant-like effects in mice via the BDNF signaling pathway. *Psychopharmacology*. 2015;232(9):1629-1642.

[10] Rau O, Syha Y, Zettl H, et al. A-alkyl substituted pirinixic acid derivatives as potent dual agonists of the peroxisome proliferator activated receptor alpha and gamma. *Arch Pharm Chem Life Sci*. 2008;341:191-195.

***Detailed description of structure-activity of PA on PPAR α and γ .**

- [11] Sauerberg P, Pettersson I, Jeppesen L, et al. Novel tricyclic- α -alkyloxyphenylpropionic acids: dual PPAR α / γ agonists with hypolipidemic and antidiabetic activity. *J Med Chem.* 2002;45(4):789-804.
- [12] Raspé E, Madsen L, Lefebvre AM, et al. Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid levels by tetradecylthioacetic acid (TTA) via PPAR α activation. *J Lipid Res.* 1999;40:2099-2110.
- [13] Hall A, Patel T. γ -Secretase modulators: current status and future directions. *Prog Med Chem.* 2014;53:101-145.
- [14] Pettersson M, Stepan A, Kauffman G, et al. Novel γ -secretase modulators for the treatment of Alzheimer's disease: a review focusing on patents from 2010 to 2012. *Expert Opin Ther Pat.* 2013;23(10):1349-1366.
- [15] Jurisch-Yaksi N, Sannerud R, Annaert W. A fast growing spectrum of biological functions of γ -secretase in development and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1828(12):2815-2827.
- [16] Klemin S, Calvo RY, Bond S, et al. WY14,643 inhibits human aldose reductase activity. *J Enzym Inhib Med Chem.* 2006;21(5):569-573.
- [17] Thomas J, Bramlett KS, Montrose C, et al. A chemical switch regulates fibrate specificity for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) versus liver X receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2403-2410.
- [18] Koeberle A, Zettl H, Greiner C, et al. Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 and 5-Lipoxygenase. *J Med Chem.* 2008;51(24):8068-8076
- [19] Mayeux R, inventor; Columbia University, assignee. Treatment and prevention of Alzheimer's disease. World intellectual property organization patent WO20082008/086452 A2. 2008 Jan 9.
- [20] Simpkins JW, inventor; Universtiy of North Texas Health Science Center at Fort Worth, assignee. Neuroprotective effects of PPAR γ agonists against cellular oxidative insults. United States patent US2004/0224995 A1. 2003 May 9.
- [21] Connop BP, inventor; Active Pass Pharmaceuticals, Inc., assignee. Compounds, compositions and methods for modulating beta-amyloid production. United States patent US 2003/0191144 A1.2002 Dec 19.

****Promising results for a new approach in the treatment of AD.**

- [22] Gharanei S, Zatyka M, Astuti D, et al. Vacuolar-type H⁺-ATPase V1A subunit is a molecular partner of wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Gen.* 2013;22(2):203-217.
- [23] Han S, Sidell N, Fisher PB, et al. Up-regulation of p21 gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor γ in human lung carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1911-1919.

[24] Nagy Z, inventor; The university of Birmingham, assignee. Treatment of wolfram syndrome-related neurodegeneration. World intellectual property organization patent WO 2014/049366 A1. 2014 Apr 3.

[25] Løvås K, Røst TH, Skorve J, et al. Tetradecylthioacetic acid attenuates dyslipidaemia in male patients with type 2 diabetes mellitus, possibly by dual PPAR- α/δ activation and increased mitochondrial fatty acid oxidation. Diabetes Obes Metab. 2009;11(4):304-314.

[26] Berge R, inventor; Thia medica as, assignee. Use of lipid clearing agents. World intellectual property organization patent WO 2007/011232 A2. 2007 Jan 25.

[27] Scutt A, inventor; University of Sheffield, assignee. Modulation of bone formation. World intellectual property organization patent WO 01/60355 A1. 2001 Aug 23.

[28] Avis IM, Jett M, Boyle T, et al. Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase-mediated growth factor signaling. J Clin Invest. 1996;97(3):806-813.

[29] Sarraf P, Mueller E, Smith WM, et al. Loss-of-function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. Mol Cell. 1999;3:799-804.

[30] Mulshine JL, inventor; The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services, assignee. Use of lipoxygenase inhibitors and PPAR ligands as anti-cancer therapeutic and intervention agents. United States patent US6,756,399 B2. 2004 Jun 29.

[31] Kuenzli S, Saurat JH. Effect of topical PPAR β/δ and PPAR γ agonists on plaque psoriasis. Dermatology. 2003;206(3):252-256.

[32] Kippenberger S, inventor; Phenion GmbH&Co. KG, assignee. Use of pirinixinic acid and the salts thereof for treating chronic inflammatory diseases. World intellectual property organization patent WO 2005/107874 A2. 2005 Nov 17.

***Topical use of PA in chronic inflammation skin diseases as promising application.**

[33] Ferguson M, inventor; Renovo limited, assignee. LXR-antagonists for the prevention, reduction or inhibition of scarring. World intellectual property organization patent WO 2008/078099 A1. 2008 Jul 3.

[34] Barrett KE, inventor; Unilever PLC, assignee. Methods for reducing the effects of stress on skin condition. World intellectual property organization patent WO 2005/058314 A2. 2005 Jun 30.

[35] Kippenberger S, inventor; Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, assignee. Activators of peroxisome proliferator activated receptors $\alpha\beta$ in treatment of skin diseases with immunol. Basis and graft rejection. Offenlegungsschrift patent DE 100 53 003 A1. 2001 Jun 28.

[36] Elias PM, inventor; The regents of the University of California, assignee. Treatment of skin conditions by use of PPAR α activators. United States patent US 6,060,515. 1999 Jun 16.

[37] Clark AF, inventor; Alcon, Inc., assignee. Use of serum amyloid a gene in diagnosis and treatment of glaucoma and identification of anti-glaucoma agents. World intellectual property organization patent WO2005/060542 A2. 2005 Jul 7.

[38] Drace CD, inventor; Alcon, Inc., assignee. Use of agents that down-regulate expression of tanis and/or p21^{waf1/cip1/sd1} genes, and use of agents that inhibit, degrade, sequester or prevent the neurotoxicity of gene product proteins of tanis and p21^{waf1/cip1/sd1} genes. United States patent application publication US 2005/0137123 A1. 2005 Jun 23.

[39] Sharif NA, inventor; Alcon, Inc., assignee. Use of agents that prevent generation of amyloid and amyloid-like lipoproteins, and/or use of agents that promote sequestration and/or degradation of, and/or prevent neurotoxicity of such proteins in the treatment of hearing loss and improving body balance. United States patent application publication US 2005/0137122 A1. 2005 Jun 23.

[40] Bertrand E, inventor; Novartis Pharma GmbH, assignee. Disease associated genes. World intellectual property organization patent WO 2005/051413 A2. 2005 Jun 9.

[41] De Simone G, Devereux RB, Roman MJ, et al. Assessment of left ventricular function by the midwall fractional shortening/end-systolic stress relation in human hypertension. J Am Coll Cardiol. 1994;23(6):1444-1451.

[42] Goldberg IJ, inventors; the trustees of columbia university in the city of New York, assignee. Methods for treating and preventing cardiac dysfunction in septic shock. World intellectual property organization patent WO 2012/115987 A2. 2012 Aug 30.

[43] Hattori Y, Akimoto K, Kasai K. The effects of thiazolidinediones on vascular smooth muscle cell activation by angiotensin II. Biochem Biophys Res Commun. 2000;273(3):1144-1149.

[44] Consigny P, inventor; Abbott cardiovascular systems Inc., assignee. Implantable devices containing nuclear receptor ligands for the treatment of vascular and related disorders. World intellectual property organization patent WO 2008/011093 A2. 2008 Jan 24.

[45] Zahradka P, inventor; Ade & company, assignee. Use of PPAR alpha agonists for the treatment of vascular and renal diseases. World intellectual property organization patent WO 03/075911 A1. 2003 Sep 18.

[46] Konstantopoulos K, inventor; Johns Hopkins University, assignee. Phase 2 inducers and related signaling pathways protect cartilage against inflammation, apoptosis and stress. World intellectual property organization patent WO 2007/130353 A2. 2007 Nov 15.

[47] Forrest MJ, inventor; Merck & Co., Inc., assignee. A method for treating inflammatory diseases by administering a PPAR-delta agonist. World intellectual property organization patent WO 02/100351 A2. 2002 Dec 19.

[48] Lee C-H, inventor; President and fellows of Harvard College, assignee. Prevention and treatment of respiratory infection with peroxisome proliferator activator receptor delta agonist. World intellectual property organization patent WO 2013/134626 A1. 2013 Sep 12.

[49] Krezel W, inventor; Institut national de la santé et de la recherche médicale, assignee. Methods for induction, predictive diagnosis, and treatment of affective behaviors by modulation of PPAR and RXR receptors. World intellectual property organization patent WO 2011/141822 A2. 2011 Nov 17.

[50] Piomelli D, inventor; The regents of the University of California, assignee. Compounds and methods for treating non-inflammatory pain using PPARalpha agonists. World intellectual property organization patent WO 2005/115370 A2. 2005 Dec 8.

[51] Hu Y, Bajorath J. Compound promiscuity: what can we learn from current data? Drug Discov Today. 2013;18(13-14):644-650.

ACCEPTED MANUSCRIPT

16.3 Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation

Pollinger, J.; Gellrich, L.; Schierle, S.; Kilu, W.; Schmidt, J.; Kalinowsky, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heering, J.; Proschak, E.; Merk, D. Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (4), 2112–2126.

Reprinted with permission from Pollinger, J.; Gellrich, L.; Schierle, S.; Kilu, W.; Schmidt, J.; Kalinowsky, L.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Heering, J.; Proschak, E.; Merk, D. **2019**, *62* (4), 2112–2126. Copyright (2019) American Chemical Society.

Tuning Nuclear Receptor Selectivity of Wy14,643 towards Selective Retinoid X Receptor Modulation

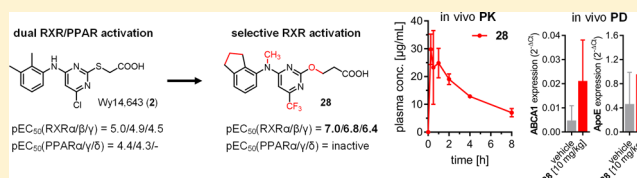
Julius Pollinger,[†] Leonie Gellrich,[†] Simone Schierle,[†] Whitney Kilu,[†] Jurema Schmidt,[†] Lena Kalinowsky,[†] Julia Ohrndorf,[†] Astrid Kaiser,[†] Jan Heering,[‡] Ewgenij Proschak,[†] and Daniel Merk^{*,†}

[†]Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438 Frankfurt, Germany

[‡]Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt, Germany

S Supporting Information

ABSTRACT: The fatty acid sensing nuclear receptor families retinoid X receptors (RXRs) and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) hold therapeutic potential in neurodegeneration. Valuable pleiotropic activities of Wy14,643 in models of such conditions exceed its known PPAR agonistic profile. Here, we characterize the compound as an RXR agonist explaining the pleiotropic effects and report its systematic structure–activity relationship analysis with the discovery of specific molecular determinants driving activity on PPARs and RXRs. We have designed close analogues of the drug comprising selective and dual agonism on RXRs and PPARs that may serve as superior pharmacological tools to study the role and interplay of the nuclear receptors in various pathologies. A systematically optimized high potency RXR agonist revealed activity in vivo and active concentrations in brain. With its lack of RXR/liver X receptor-mediated side effects and superior profile compared to classical rexinoids, it establishes a new class of innovative RXR modulators to overcome key challenges in RXR targeting drug discovery.



INTRODUCTION

As ligand-activated transcription factors, nuclear receptors translate ligand signals into changes in gene expression and are attractive drug targets for a wide variety of pathophysiological conditions. Among them, peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)¹ and retinoid X receptors (RXRs)² act as endogenous sensors for fatty acids and lipid mediators. PPARs are particularly involved in the maintenance of metabolic balance and are addressed by drugs for metabolic pathologies such as type 2 diabetes and dyslipidemia.³ Although PPAR α and PPAR γ had particular therapeutic relevance, the use of PPAR modulating drugs today is limited due to adverse effects. In contrast to the former important role of PPARs, therapeutic targeting of RXRs has only been realized in a narrow indication of few cancers which is in part also due to poor safety of the only market approved synthetic rexinoid bexarotene (**1**).^{4,5} Amongst several other adverse effects, **1** causes elevation of triglyceride levels putatively via a liver X receptor (LXR) mediated pathway.^{6–9}

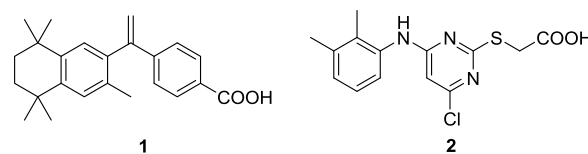
Despite these drawbacks in therapeutic activation of PPARs and RXRs, recent reports suggest enormous potential of both nuclear receptor families in neurodegenerative and inflammatory diseases.^{10–12} Several studies have ascribed RXRs an important role in central nervous system (CNS) remyelination and render RXR activation a promising regenerative treatment strategy for multiple sclerosis (MS).^{10,13–15} The association of PPAR γ with MS is equally well documented and linked to the

receptor's involvement in WNT/ β -catenin signaling as well as its anti-inflammatory effects on Th17 cells and macrophages.^{16,17} The PPAR γ agonist, pioglitazone, has even been studied for MS in small clinical trials that revealed reduced lesion formation and less gray matter atrophy.^{12,18,19} Finally, in vivo observations suggest that PPAR α activation can also reduce neuroinflammation and counter neurodegeneration.²⁰

In addition to MS, RXRs and PPAR γ have also been characterized as promising molecular targets for the treatment of Alzheimer's disease (AD) mainly due to their involvement in transcriptional regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression.^{11,21}

The fatty acid mimetic²² Wy14,643 (**2**, Scheme 1)²³ has been developed as a lipid-lowering agent in the 1970s without the knowledge of the underlying target and later characterized

Scheme 1. Synthetic RXR agonist Bexarotene (**1**) and Wy14,643 (**2**)



Received: November 26, 2018

Published: January 31, 2019

as the PPAR agonist.^{24,25} Over four decades, **2** was applied in numerous pharmacological studies whereby a variety of promising therapeutic activities were observed that cannot be explained by PPAR modulation alone,²⁴ however, but suggest involvement of further molecular targets. Animal models²⁶ and a small clinical trial^{27,28} for atopic dermatitis, for example, observed therapeutic efficacy for **2** but not for the selective PPAR α agonist clofibrate. Moreover, **2** blocked immune responses after immunization with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide 35–55 in vivo and induced apoptosis of immune cells.²⁹ These effects were not abrogated by PPAR α knockout suggesting the involvement of other targets. Even a use of **2** in AD has been claimed based on the observation that the compound decreased production of A β 42. The selective PPAR α agonist clofibrate had the opposite effect suggesting involvement of other targets.³⁰

Obvious structural similarity of **2** with the synthetic rexinoid **1**, the corroborating evidence for the involvement of multiple molecular targets in the activities of **2** and the compound's very promising activities in models for MS²⁹ and AD³⁰ prompted us to study the molecular mechanisms of action of **2** and eventually optimize the compound for higher potency on its individual targets. Here, we characterize **2** as RXR agonist with even higher potency than its reported activity on PPARs. Thereby, we provide mechanistic explanation for the pharmacological profile of **2** and highlight it as a valuable scaffold for further nuclear receptor modulator design. By focused structure–activity relationship (SAR) studies of **2**, we have deciphered the molecular determinants driving its potency on RXRs and PPARs. We have discovered analogues of **2** that selectively activate PPARs or exhibit dual PPAR/RXR agonism with significantly higher potency than **2**. Furthermore, by combining all our SAR knowledge, we have designed a close analogue of **2** that selectively activates RXRs with nanomolar potency. As a result, we report a set of three closely related agents with specific differences in their pharmacodynamic activity on RXRs and PPARs. They can serve as superior tools to study the promising pharmacological activities of **2** and decipher the involvement and interplay of RXR and PPAR-mediated effects in MS, AD, and other diseases. In addition, the designed RXR-selective analogue is characterized by superior selectivity, toxicity, and physicochemical properties profile compared to the classical rexinoid **1** and establishes a new generation of innovative RXR modulators to overcome characteristic challenges in RXR targeting drug discovery.

RESULTS AND DISCUSSION

Intrigued by the pleiotropic activities of **2**²⁴ in animal models and its molecular architecture of a classical fatty acid mimetic,²² we profiled it on therapeutically relevant nuclear receptors in vitro where we observed marked activation of RXRs (Figure 1). Full dose–response characterization revealed micromolar activity of **2** on the three RXR subtypes that even exceeded the compound's potency on PPARs (Table 1). Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments confirmed that **2** bound to the recombinant ligand binding domains (LBD) of PPAR γ ($K_d = 1.34 \mu\text{M}$) and RXR α ($K_d = 1.28 \mu\text{M}$) with similar affinity (Table 2).

Molecular docking of **2** in the ligand binding sites of RXR α (Figure 2a, PDB-ID: 4K6I³¹) and RXR β (Figure 2b, PDB-ID: 1H9U³²) indicated a favorable binding mode that aligned well with the co-crystallized rexinoids. **2** formed the canonical ionic interaction with Arg316 (RXR α) and Arg387 (RXR β),

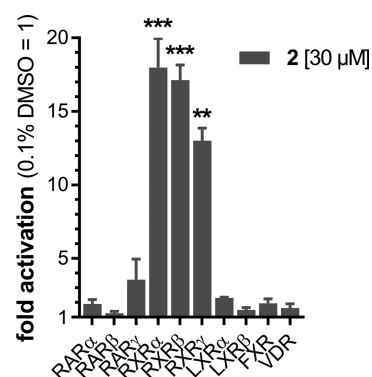


Figure 1. In vitro profiling of **2** in specific Gal4 reporter gene assays for therapeutically relevant nuclear receptors revealed marked activation of RXRs by **2**. Results are the mean \pm scanning electron microscopy (SEM), $n \geq 3$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

respectively, and its pyrimidine-4-chlorine substituent addressed a lipophilic sub-pocket close to the methylene residue of **1**. The lipophilic dimethylaniline group of **2** was placed at the highly lipophilic end of the pocket, where the tetrahydronaphthyl moieties of the co-crystallized rexinoids were bound but did not fully occupy this region.

Compared to the reference RXR agonist **1**, **2** is superior in terms of solubility (**2**: 48.6 mg/L vs **1**: 0.3 mg/L), lipophilicity (**2**: $\log P = 1.63$ vs **1**: $\log P = 4.74$), and cytotoxicity. With this activity profile, **2** appeared as a promising lead compound to develop novel RXR modulators that overcome poor toxicity and lipophilicity characteristics of classical rexinoids. We have studied the SAR of **2** with derivatives **3–28** (Table 1) on RXRs and PPARs to identify selectivity determinants and optimize RXR agonistic potency by directed structural changes.

Compounds **9**, **11–18**, **20**, and **23–28** were prepared according to Schemes 2–8 relying on the published synthetic procedures²³ of **2** with suitable modifications. The synthesis of **3–8**, **10**, **19**, **21**, and **22** was reported previously.^{25,33} Pyrimidin-2-ylsulfanylacetates **29–31** were available from mercaptoprimidines **32–34** and ethyl bromoacetate (**35**). 4-Trifluoromethyl derivative **31** was then treated with phosphorus(V) oxychloride (POCl_3) to form the corresponding chloropyrimidine **36** and subsequently reacted with 2,3-dimethylaniline (**37**) under microwave (μw) irradiation to obtain **38**. **39** with free 4-position on the pyrimidine and **40** with 4-methyl substituent were prepared in analogy from pyrimidin-2-ylsulfanylacetates **29** and **30** in one-pot procedures with the addition of 2,3-dimethylaniline (**37**) during the POCl_3 -mediated chlorination. Mild alkaline hydrolysis of esters **38–40** then produced test compounds **9**, **11**, and **12** (Scheme 2).

Synthesis of **16–18**, **20**, **23**, **25**, and **26** followed a similar approach (Scheme 3). 4,6-Dihydroxypyrimidin-2-ylsulfanylacetate (**41**) was available from mercaptoprimidine **42** and ethyl bromoacetate (**35**) and converted into chloropyrimidine **43** with POCl_3 . **43** was then reacted with various anilines (**37**, **44–48**) to form precursors **49–54**. 7-Chloroindane-4-amine (**48**) required as a building block for **23** was obtained by chlorination of 4-aminoindane (**55**) with *N*-chlorosuccinimide (NCS) in DMF (Scheme 4). Alkaline hydrolysis of **50–54** yielded **16–18**, **20**, and **23**. *N*-Methyl (**25**) and *N*-isopropyl (**26**) derivatives were prepared by reacting ester **49** with dimethyl sulfate (DMS) or diisopropyl sulfate (DIPS) and subsequent alkaline ester hydrolysis in one-pot procedures.

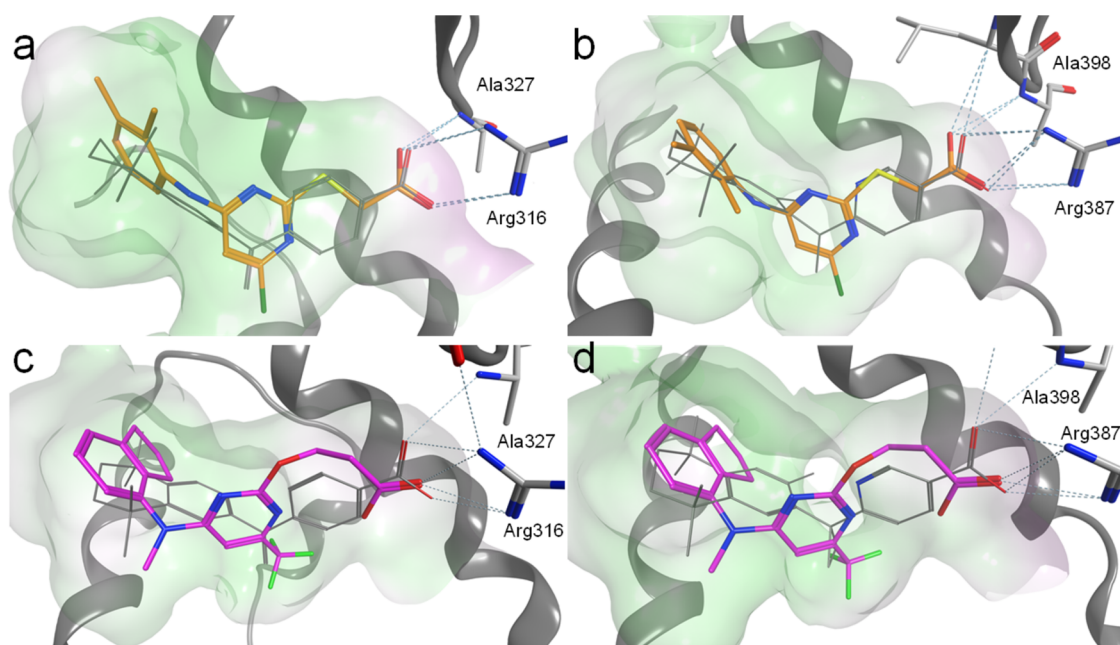
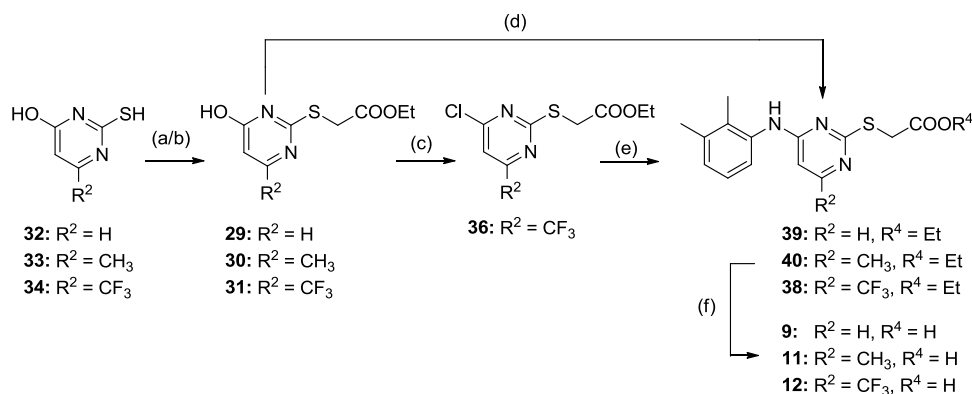


Figure 2. Molecular docking of **2** (orange) and **28** (magenta) in the ligand binding domains of RXR α ((a, c) PDB-ID: 4K61³¹) and RXR β ((b, d) PDB-ID: 1H9U³²). Pocket surfaces are colored according to their lipophilicity (green = lipophilic, red = hydrophilic). (a, b) **2** forms similar binding modes to RXRs as the crystallized rexinoids (gray) involving the canonical neutralizing contact with Arg316/Arg387. The 2-mercaptoacetic acid residue is placed in a narrow tunnel that may accommodate small substituents but no larger side chains. The chlorine atom of **2** protrudes into a small sub-pocket which is also addressed by the methylene respectively cyclopropyl moiety of the co-crystallized ligands. The 2,3-dimethylphenylamino residue of **2** is bound in the highly lipophilic terminal region of the RXR ligand binding site but fails to entirely fill the pocket suggesting optimization potential with larger lipophilic moieties. (c, d) The optimized RXR agonist **28** also forms canonical interactions with Arg316/Arg387 and its trifluoromethyl group conveniently fills the lipophilic sub-pocket, which is occupied by the methylene/cyclopropyl moiety, respectively, of the crystallized ligands. The proposed binding mode also revealed an important contribution of the *N*-methyl moiety of **28** which addresses an unexplored lipophilic sub-pocket close to helix 11. Due to its slightly longer acidic side chain compared to **2**, the pyrimidine core and the lipophilic indane moiety of **28** are moderately shifted towards the lipophilic terminal region of the RXR ligand binding site.

Scheme 2. Synthesis of **9**, **11**, and **12**^a



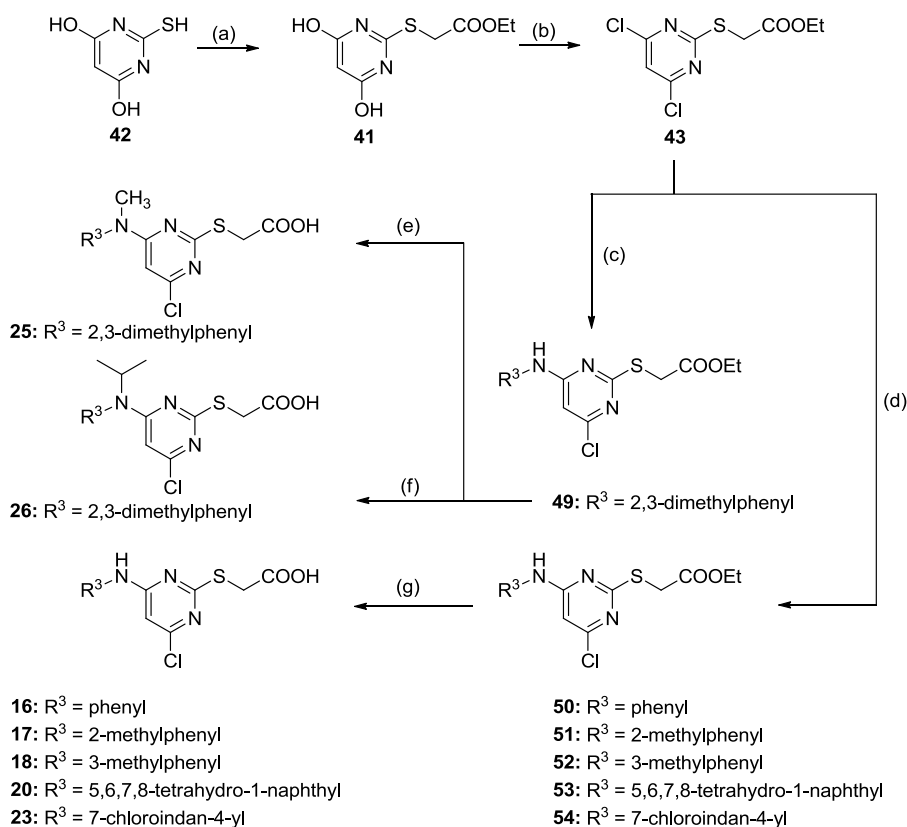
^aReagents and conditions: (a) ethyl bromoacetate (**35**), dimethylformamide (DMF), 90 °C, 3 h, 29–48%; (b) ethyl bromoacetate (**35**), DMF, triethylamine (TEA), 0 °C, 5 min, 54%; (c) POCl₃, diethylaniline (DEA), 90 °C, 3.5 h, 67%; (d) 2,3-dimethylaniline (**37**), POCl₃, DEA, 90 °C, 4 h, 36–73%; (e) 2,3-dimethylaniline (**37**), TEA, ethanol (EtOH), μ w, 120 °C, 4 h, 19%; and (f) LiOH, EtOH, H₂O, tetrahydrofuran (THF), room temperature (rt), 16–18 h, 15–77%.

Diarylether **24** was obtained by reacting chloropyrimidine **43** with 2,3-dimethylphenol (**56**) under microwave irradiation forming **57** followed by mild alkaline hydrolysis to yield **24** (Scheme 5).

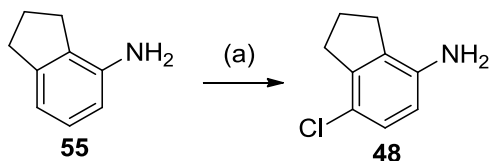
For the synthesis of chain-elongated thioether **15** (Scheme 6), thiobarbituric acid (**42**) was reacted with ethyl 3-bromopropionate (**58**) to form **59**, which was then treated with POCl₃ to generate the corresponding chloropyrimidine **60**. Microwave irradiation of **60** and aniline **37** was performed

to obtain **61**, followed by mild alkaline hydrolysis of **61** to yield **15**.

Ether analogue **13** was prepared via an inverse strategy (Scheme 7). 2,4,6-Trichloropyrimidine (**62**) and ethyl 2-hydroxyacetate (**63**) were reacted to **64** in a nucleophilic aromatic substitution. Compound **65** was obtained by microwave-assisted reaction of **64** with aniline **37**, followed by alkaline hydrolysis to yield **13**.

Scheme 3. Synthesis of 16–18, 20, 23, 25, and 26^a

^aReagents and conditions: (a) ethyl bromoacetate (35), EtOH, H₂O, NaOH, 60 °C, 3.5 h, 37%; (b) POCl₃, DEA, 90 °C, 5 h, 78%; (c) 2,3-dimethylaniline (37), TEA, EtOH, μ w, 120 °C, 4 h, 45%; (d) anilines 44–48, TEA, EtOH, μ w, 120 °C, 4 h, 32–68%; (e) DMF, NaOH, DMS, 40 °C, 15 h, 52%; (f) DMF, NaOH, DIPS, 40 °C, 25 h, 13%; and (g) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 16 h, 61–95%.

Scheme 4. Synthesis of 48^a

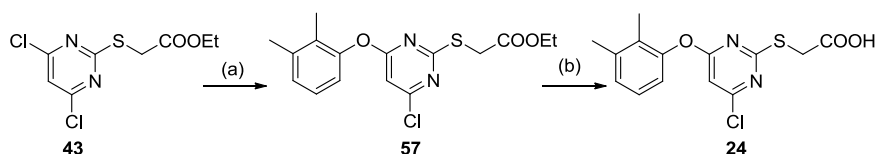
^aReagents and conditions: (a) DMF, NCS, rt, 23 h, 32%.

Propionic acid derivatives 14, 27, and 28 were prepared via a third synthetic strategy (Scheme 8) involving the introduction of the acidic side chain after the formation of the diarylamine moiety. For this, methylsulfanylpyrimidines 66 and 67 were reacted with aniline 37 or 55 under microwave irradiation to form 68 and 69. Subsequently, the methylsulfanyl moieties in 68 and 69 were selectively oxidized to the corresponding methyl sulfones 70 and 71 using Na₂WO₄. The methyl sulfone residue as a better leaving group then enabled further substitution with ethyl 3-hydroxypropanoate (72) to obtain

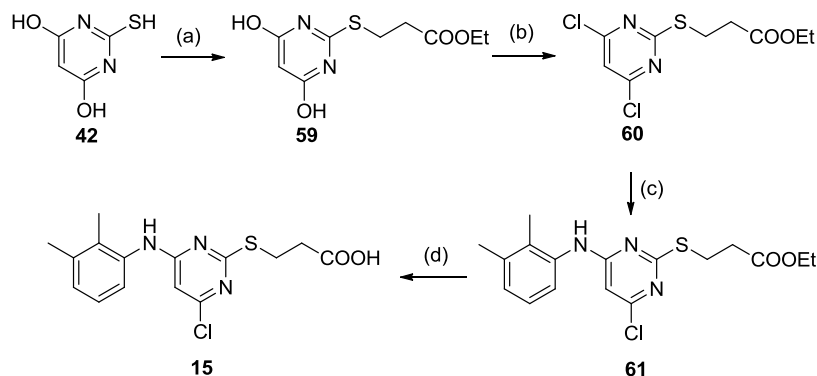
73 and 74. Methylation of 74 with MeI in DMF afforded 75 and mild ester hydrolysis of 73–75 yielded 14, 27, and 28.

2 and analogues 3–28 were characterized in vitro in specific Gal4-based hybrid reporter gene assays for PPAR α , PPAR γ , and PPAR δ as well as RXR α , RXR β , and RXR γ modulation.^{34,35} Gal4-responsive firefly luciferase served as the reporter gene and a constitutively expressed (SV40 promoter) Renilla luciferase was used as an internal control to monitor transfection efficiency and test compound toxicity.

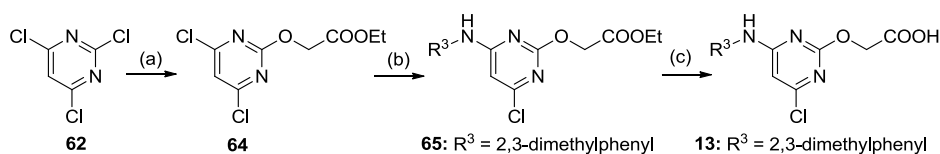
Systematic SAR analysis of all molecular building blocks of 2 on RXRs and PPARs revealed significant differences for both nuclear receptor families (Table 1). Introduction of side chains in the α -position of the carboxylic acid (3–8), which is known to promote potency and activation efficacy on PPAR α and PPAR γ ,²⁵ abrogated activity on RXRs with increasing chain length. Although methyl (3) and dimethyl (4) substitutions were tolerated by RXR α and RXR β , activity on RXR γ was already lost with these small residues suggesting the potential to achieve subtype selectivity. Longer side chains (5–7) as well

Scheme 5. Synthesis of 24^a

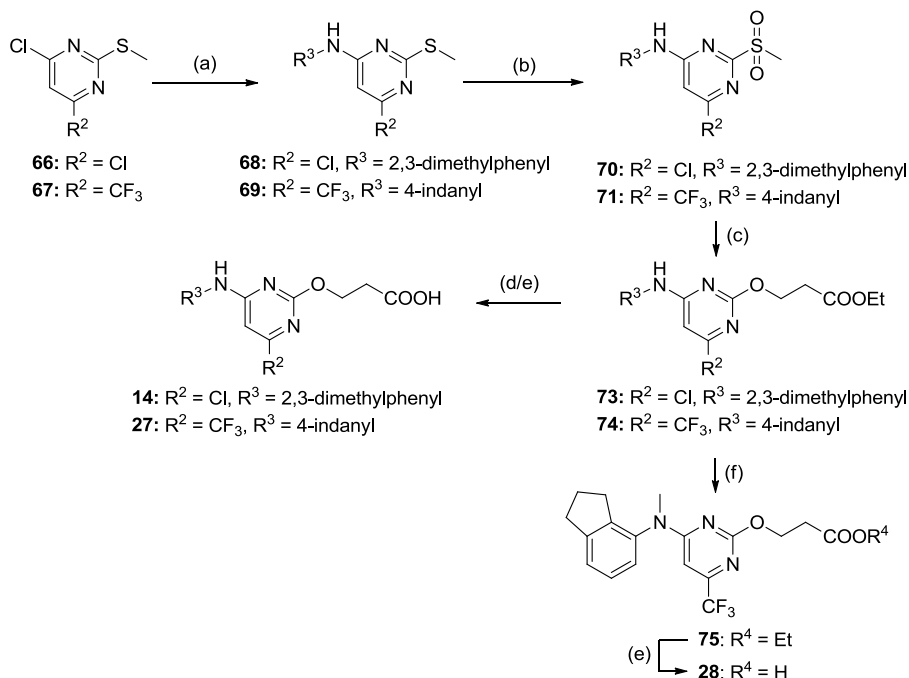
^aReagents and conditions: (a) 2,3-dimethylphenol (56), TEA, EtOH, μ w, 120 °C, 4 h, 11% and (b) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 21 h, 42%.

Scheme 6. Synthesis of 15^a

^aReagents and conditions: (a) ethyl 3-bromopropionate (**58**), EtOH, H₂O, NaOH, 60 °C, 6 h, 28%; (b) POCl₃, DEA, 90 °C, 5 h, 56%; (c) **37**, TEA, EtOH, μ w, 120 °C, 4 h, 39%; and (d) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 16 h, 52%.

Scheme 7. Synthesis of 13^a

^aReagents and conditions: (a) ethyl hydroxyacetate (**63**), dioxane, NaH, 110 °C, 5 h, 5%; (b) 2,3-dimethylaniline (**37**), TEA, EtOH, μ w, 120 °C, 4 h, 24%; and (h) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 16 h, 94%.

Scheme 8. Synthesis of 14, 27, and 28^a

^aReagents and conditions: (a) anilines **37** or **55**, TEA, EtOH, μ w, 120 °C, 4 h, 38–48%; (b) Na₂WO₄, H₂O₂, HOAc, rt, 24 h, 78–94%; (c) ethyl 3-hydroxypropanoate (**72**), lithium bis(trimethylsilyl)amide (LHMSD), THF, rt, 2.5 h, 39–63%; (d) LiOH, EtOH, H₂O, THF, rt, 16 h, 10%; (e) CF₃COOH, H₂O, rt, 24 h, 21–63%; and (f) MeI, K₂CO₃, DMF, rt, 24 h, 77%.

as α -phenyl (**8**) substitution were detrimental on all RXRs thereby producing potent PPAR ligands with selectivity over RXRs. PPARs favored *n*-butyl (**7**) substitution in α -position which produced balanced single-digit micromolar potency and enhanced activation efficacy on PPAR α/γ . The PPAR δ subtype was neither activated by **2** nor by the α -substituted analogues

3–8. The loss of activity on RXRs with increasing α -substituent size agrees with the proposed binding modes of **2** to RXR α (Figure 2a) and RXR β (Figure 2b) where the carboxylic acid is buried in a narrow tunnel lacking space for additional substituents.

Table 1. Activity of 2–28 on RXRs and PPARs in Vitro^{a,b}

#	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀ [μM] (max. rel. activation)					
						RXRα	RXRβ	RXRγ	PPARα	PPARγ	PPARδ
2	S	NH	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	9.1±0.1 (26±1%)	13±1 (16±1%)	31±1 (46±1%)	36±3 (100%)*	54±1 (19±2%)	> 100
3	S	NH	Me	Cl	2,3-dimethylphenyl	27±3 (35±4%)	87±19 (13±3%)	< 10%	8.7±0.2 (141±10%)*	13±1 (27±4%)	> 100
4	S	NH	Me ₂	Cl	2,3-dimethylphenyl	13±1 (27±1%)	20±3 (18±2%)	< 10%	2.3±0.2 (143±14%)*	13±2 (28±4%)	inactive (30 μM)
5	S	NH	Et	Cl	2,3-dimethylphenyl	< 10%	inactive	< 10%	7.7±0.3 (134±9%)*	12±2 (26±3%)	inactive (30 μM)
6	S	NH	nPr	Cl	2,3-dimethylphenyl	< 10%	inactive	< 10%	7.0±0.6 (134±44%)*	5.5±0.7 (25±5%)	inactive (30 μM)
7	S	NH	nBu	Cl	2,3-dimethylphenyl	inactive	inactive	inactive	1.2±0.2 (132±7%)*	3.0±0.1 (28±8%)	inactive (30 μM)
8	S	NH	Ph	Cl	2,3-dimethylphenyl	inactive	inactive	inactive	~ 30	~ 30	inactive (30 μM)
9	S	NH	H	H	2,3-dimethylphenyl	< 10%	inactive	inactive	14±2 (119±8%)	36±1 (14±1%)	inactive
10	S	NH	H	Br	2,3-dimethylphenyl	9.6±0.6 (45±1%)	6±1 (16±1%)	16±1 (40±1%)	5.2±0.4 (46±1%)	13.2±0.8 (23±1%)	17±2 (25±3%)
11	S	NH	H	Me	2,3-dimethylphenyl	19.8±0.6 (31±1%)	22.3±0.1 (19±1%)	36.2±0.5 (39±1%)	21±1 (40±1%)	< 10%	inactive
12	S	NH	H	CF ₃	2,3-dimethylphenyl	10±1 (16±1%)	10.1±0.2 (12±1%)	21±2 (15±1%)	5.4±0.4 (29±1%)	< 10%	6.8±0.2 (20±1%)
13	O	NH	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
14	O-CH ₂	NH	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	6.8±0.8 (47±1%)	11.1±0.3 (28±1%)	26±2 (50±4%)	26±4 (29±2%)	14±1 (14±1%)	13±2 (16±1%)
15	S-CH ₂	NH	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	30.2±3.5 (21.1±2.4%)	< 10%	inactive	7.5±0.1 (34±1%)	< 10%	11±3 (22±2%)
16	S	NH	H	Cl	phenyl	< 10%	< 10%	inactive	28±1 (32±1%)	< 10%	< 10%
17	S	NH	H	Cl	2-methylphenyl	36.4±0.7 (79±3%)	43±4 (32±4%)	52±2 (25±1%)	18±2 (77±6%)	33±4 (18±2%)	29±3 (18±2%)
18	S	NH	H	Cl	3-methylphenyl	25±1 (38±2%)	< 10%	74±11 (13±2%)	20±1 (53±2%)	28±4 (20±2%)	34±13 (20±7%)
19	S	NH	H	Cl	4-indanyl	1.5±0.1 (50±1%)	3.1±0.2 (23±1%)	5.6±0.2 (49±1%)	16±1 (95±8%)*	38±1 (16±3%)	> 100
20	S	NH	H	Cl	5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthyl	1.4±0.1 (43±1%)	2.3±0.3 (39±1%)	3.2±0.1 (43±1%)	1.2±0.2 (55±3%)	2.1±0.2 (14±1%)	7.1±0.8 (30±2%)
21	S	NH	H	Cl	4-chloro-2,3-dimethylphenyl	6.1±0.4 (49±1%)	7.8±0.5 (17±1%)	23±0.1 (72±1%)	14±5 (87±26%)*	49±2 (23±2%)	> 30
22	S	NH	H	Cl	4-bromo-2,3-dimethylphenyl	7.3±0.5 (20±1%)	10.3±0.2 (26±1%)	25±1 (44±1%)	10±1 (115±22%)*	52±3 (11±1%)	> 30
23	S	NH	H	Cl	7-chloro-4-indanyl	2.1±0.1 (48±1%)	3.8±0.1 (20±1%)	6.4±0.3 (45±3%)	1.8±0.3 (51±4%)	3.1±0.3 (11±1%)	4.3±0.2 (40±1%)
24	S	O	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	4.7±0.1 (26±1%)	6.8±0.2 (18±1%)	26.2±0.8 (34±1%)	14±2 (30±2%)	< 10%	< 10%
25	S	NMe	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	2.8±0.1 (19±1%)	5.5±0.2 (20±1%)	17.1±0.8 (45±1%)	< 10%	< 10%	< 10%
26	S	NPr	H	Cl	2,3-dimethylphenyl	9.8±0.4 (11±1%)	< 10%	inactive (20 μM)	25±3 (13±1%)	< 10%	5.7±0.7 (20±1%)
27	O-CH ₂	NH	H	CF ₃	4-indanyl	0.95±0.05 (35±1%)	1.40±0.01 (46±1%)	4.1±0.3 (68±4%)	11.0±0.7 (17±1%)	< 10%	< 10%
28	O-CH ₂	NMe	H	CF ₃	4-indanyl	0.093±0.001 (43±1%)	0.143±0.003 (53±1%)	0.36±0.04 (54±1%)	< 10%	< 10%	< 10%

^aResults are the mean ± standard deviation (SD), $n \geq 3$. Compounds were tested up to 50 μM or the highest nontoxic concentration as indicated. Activity of 2–8, 19, 21, and 22 on PPARs was reported previously.²⁵ Relative activation refers to the reference agonist at 1 μM each, that is, bexarotene (RXRs), GW7647 (PPARα), rosiglitazone (PPARγ), and L165,041 (PPARδ). ^bRelative activation refers to 2 at 100 μM.²⁵

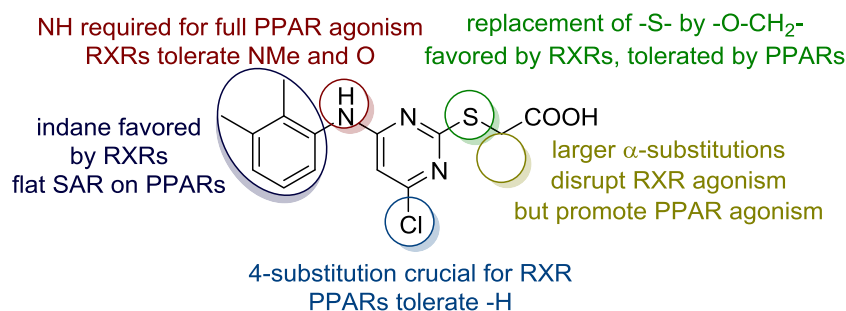


Figure 3. Summarized SAR of **2** on RXRs and PPARs.

Replacement of the reactive and electron withdrawing chlorine substituent on the pyrimidine core of **2** with a hydrogen atom (**9**) turned out as another switch towards PPAR selectivity as activity on RXRs was lost and potency on PPAR α and PPAR γ was enhanced in terms of the EC₅₀ value. Replacement of chlorine (**2**) by bromine (**10**) had little effect on RXR agonistic potency but enhanced activity on all PPARs. As a consequence, **10** also activated PPAR δ with considerable potency.

Substitution in the 4-position of the pyrimidine core, hence, appeared crucial for potency on RXRs. However, halogen substituents on pyrimidine are highly reactive and may hold toxicity potential. Therefore, we introduced less reactive residues. Therein, we succeeded in conserving RXR agonistic potency by introduction of a methyl group (**11**) with moderate loss of activity and especially with a 4-trifluoromethyl-substituent (**12**) that fully retained the activity on RXRs. In parallel, methyl (**11**) and trifluoromethyl (**12**) substitution markedly lowered the activation efficacy on PPARs compared to **2**. Both derivatives **11** and **12** caused no appreciable activation of PPAR γ . PPAR δ was only activated by trifluoromethyl derivative **12** which together with the activity of bromine derivative **10** suggest that the PPAR δ subtype favors bulky electron withdrawing substituents in the 4-position of the pyrimidine. Concomitantly, **12** displayed reduced cytotoxicity compared to **2** confirming the advantage of replacing the reactive chlorine substituent for the compound's toxicity profile.

In addition to the pyrimidine's reactive chlorine substituent, the oxidation-sensitive thioether moiety in **2** appeared unfavorable and, thus, we studied the possibility of its replacement by ether linkers (**13**, **14**). Pure substitution of the sulfur atom by oxygen (**13**) fully disrupted the activity on all RXRs and PPARs. This might be due to concomitant shortening of the chain and a different dihedral angle of oxygen and sulfur.³⁶ To compensate the reduction in chain length, we introduced an additional methylene group (**14**) which was indeed sufficient to restore activity on RXRs with even a slight improvement in potency compared to **2**. On PPARs, this elongated ether **14** was active too, but with markedly reduced activation efficacy rendering the 3-oxopropionic acid residue (**14**) as valuable RXR-favored replacement for the 2-mercaptoacetic acid in **2**. As the additional methylene residue in **14** significantly enhanced the potency compared to **13** on all PPARs and RXRs, we also prepared the one carbon homologated thioether **15**. This chain elongation in **15** was accompanied by enhanced potency on PPAR α and PPAR δ compared to **2**, whereas it was poorly tolerated by PPAR γ . On RXRs, the elongated thioether analogue **15** displayed a marked

loss of activity and only retained weak agonism on the α -subtype but failed to activate RXR β and RXR γ .

We then studied the 2,3-dimethylaniline moiety (**16**–**22**) where the removal of both methyl groups (**16**) was tolerated by PPARs despite a loss of activation efficacy but caused inactivity on RXRs. Reinstating either methyl group (**17** and **18**) was equally sufficient to regain the RXR agonistic activity. Surprisingly, **17** and **18** were even slightly more active on PPAR γ than **2** and also activated PPAR δ with similar potency. On PPAR α , either methyl group promoted potency in terms of EC₅₀ values but with lower activation efficacy than **2**.

Enlargement of the lipophilic dimethylaniline by closing a ring over the two methyl groups in 4-aminoindane derivative **19** was favored by RXRs over PPARs. With a 6-fold improvement in RXR agonistic potency compared to **2** and enhanced RXR activation efficacy, the 4-indanyl substituent in **19**, thus, turned out as another opportunity to achieve RXR selectivity. 5,6,7,8-Tetrahydro-1-naphthylamine derivative **20**, in contrast, displayed equally enhanced activity on both RXRs and PPARs. It constitutes a potent and balanced pan-PPAR/pan-RXR agonist with intermediate activation efficacy that appears suitable to study potential synergies of dual RXR/PPAR activation e.g., in neurodegeneration.

Further focusing on the dimethylaniline moiety of **2**, we then introduced a chlorine (**21**) or bromine (**22**) substituent in the 4-position which caused a slight improvement in potency and activation efficacy on RXRs. On PPARs, halogen substituents in the 4-position of the dimethylaniline (**21**, **22**) diminished activity on PPAR γ but markedly promoted PPAR α agonism. In particular, the 4-chlorine substituent (**21**) seemed suitable to promote the RXR agonism and selectivity over PPAR γ . We, therefore, combined the RXR-favored indane moiety of **19** and the 4-chlorine substituent of **21** in **23** which, however, failed to further enhance RXR agonistic activity or RXR selectivity. In fact, **23** exhibited potent agonism on all RXRs and PPARs.

Finally, we studied the SAR of the diarylamine linker (**24**–**26**). Its replacement by an ether moiety (**24**) slightly promoted the potency on RXRs and PPARs but with a significant loss of activation efficacy on PPARs, thereby generating an improvement in relative RXR selectivity. Methylation of the bridging amine (**25**) had a similar but markedly more pronounced effect by reducing PPAR activation to levels below 10%, whereas further enhancing RXR agonistic potency. The bulkier *N*-isopropyl derivative **26** failed to follow this trend and possessed lower potency on both RXRs and PPAR α/γ but interestingly was favored by PPAR δ .

Our focused systematic SAR analysis discovered specific structural modifications of **2** to promote potency on either RXRs or PPARs (summarized in Figure 3) allowing the design of selective and dual ligands by directed structural changes. In

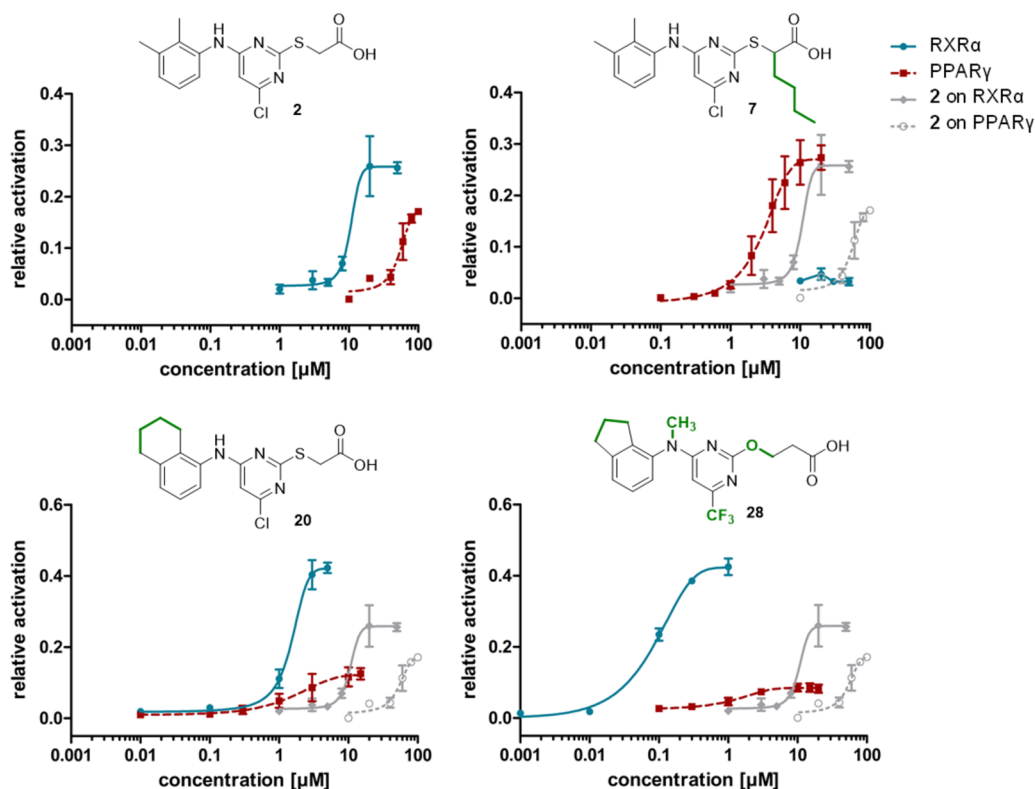


Figure 4. Activity profiles of **2** (gray) and PPAR-selective (**7**), dual-active (**20**) and RXR-selective (**28**) analogues on RXR α (blue) and PPAR γ (red). Results are the mean \pm SD, $n \geq 3$. Relative activation refers to 1 μ M bexarotene (RXR α) and 1 μ M rosiglitazone (PPAR γ).

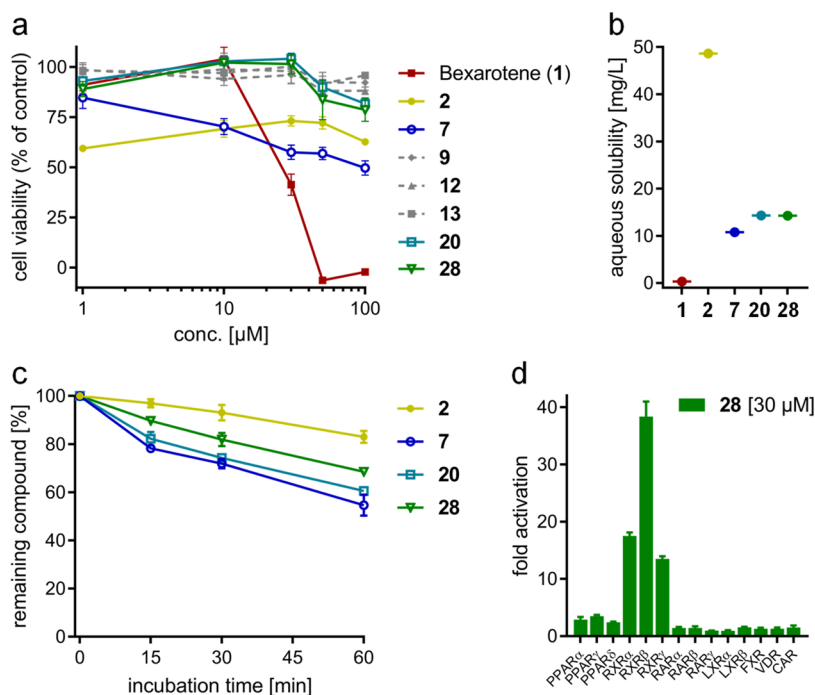


Figure 5. In vitro profiling of **2** and derivatives. (a) **2** and derivatives are markedly less cytotoxic than rexinoid **1**. Replacement of chloropyrimidine and thioether residue has a beneficial effect on toxicity. (b) In contrast to **1**, **2** and derivatives provide high aqueous solubility. (c) With more than 50% parent compound remaining after 60 min of incubation with rat liver microsomes, **2** and derivatives provide favorable metabolic stability. (d) The optimized RXR agonist **28** is highly selective over related nuclear receptors. All results in (a), (c), and (d) are the mean \pm SEM, $n = 3$.

an attempt to apply and combine this knowledge in the design of an optimized RXR agonistic analogue of **2**, we fused the RXR-favored structural modifications of all molecular building blocks (**27**, **28**). Combining the trifluoromethyl group (**12**),

the elongated ether side chain (**14**) and the indane substituent (**19**) produced a potent micromolar RXR agonist (**27**) with a weak remaining activity on PPAR α . When we additionally introduced the RXR-favored *N*-methyl residue from **25** in **28**,

RXR agonistic potency was remarkably enhanced to intermediate nanomolar potency and activity on all PPARs was suppressed.

Molecular docking of **28** in RXR α (Figure 2c) and RXR β (Figure 2d) indicated favorable binding modes and illustrated the importance of the *N*-methyl residue for potency on RXRs as it was conveniently bound in a lipophilic sub-pocket close to helix 11 which was not explored by either co-crystallized ligand in the two receptor subtypes. As already observed for lead compound **2**, the carboxylic acid of **28** participated in the canonical neutralizing contact with Arg316 (RXR α) and Arg387 (RXR β), respectively. The trifluoromethyl group in **28** replacing the chlorine atom in **2** addressed the lipophilic sub-pocket which accommodates the methylene or cyclopropyl moiety, respectively, of the co-crystallized rexinoids. Compared to the chlorine substituent in **2**, the bulkier trifluoromethyl moiety of **28** appeared to more efficiently occupy this lipophilic region of the RXR ligand binding site as another contribution to improved potency.

Starting from the drug Wy14,643 (**2**), four minor but directed structural modifications were sufficient to shift the activity profile from a weak dual RXR/PPAR agonist (**2**) to the potent RXR-selective analogue **28** with a 100-fold gain in potency on all three RXR subtypes (Figure 4). Simultaneously, unfavorable pharmacophore elements were replaced with more convenient moieties. As a result, the optimized RXR agonist revealed reduced toxicity (Figure 5a) and conserved favorable solubility (**28**: 14.3 mg/L, Figure 5b) as well as lipophilicity ($\log P = 2.08$). In addition to the discovery of RXR agonist **28**, the use of alternative structural elements enabled the design of analogues of **2** with selectivity towards PPARs (**7**) or pan-RXR-pan-PPAR agonism (**20**). This specific activity tailoring in structurally very close analogues renders **7**, **20**, and **28** as a set of very useful pharmacological tools to study the role and interplay of RXRs and PPARs in health and disease without different compound-specific artifact effects.

In vitro profiling revealed markedly reduced cytotoxicity for the optimized analogues **20** and **28** (Figure 5a) as well as favorable solubility (Figure 5b) and microsomal stability (Figure 5c) for **2** and derivatives **7**, **20**, and **28**. Toxicity analysis (Figure 5a) also confirmed favorable effects of replacing chlorine in **2** by hydrogen (**9**) or trifluoromethyl (**12**) as well as replacing the thioether moiety in **2** by an ether in **13**. Compared to the classical rexinoid **1**, the selective RXR agonist **28** was clearly superior in terms of toxicity and solubility. Moreover, **7**, **20**, and **28** are highly selective over related nuclear receptors including RARs (Figure 5d, Table S1).

To exclude unspecific effects and confirm the activity of **2**, **7**, **20**, **27**, and **28** on RXRs and PPARs, we studied their interaction with the recombinant ligand binding domains of RXR α and PPAR γ by isothermal titration calorimetry (ITC, Table 2 and Figures S1–S10)³⁷ and observed K_d values in agreement with the EC_{50} s retrieved in the cellular assays. Minor mismatches between K_d and EC_{50} may arise from cellular effects in the reporter gene assay such as cellular uptake or degradation. The ITC experiments especially confirmed high affinity of **28** to RXR α with a double-digit nanomolar K_d value. Compared to the free diarylamine **27**, **28** gained almost a factor 10 in affinity towards RXRs. According to our molecular docking studies (Figure 2c,d) this seems due to favorable binding of the methyl group in a lipophilic sub-pocket close to helix 11 that is not explored by either co-

Table 2. K_d Values (ITC) Confirm Dual or Preferential Binding of **2**, **7**, **20**, **27**, and **28** to RXR α and/or PPAR γ ^a

ID	K_d (RXR α) (μ M)	K_d (PPAR γ) (μ M)
2	1.28	1.34
7	no binding	1.28
20	0.35	0.87
27	0.88	n.d.
28	0.095	0.95
1	0.21	n.d.

^aITC data for **1** on RXR α for comparison. n.d., not determined.

crystallized rexinoid. We also observed binding of **28** to PPAR γ but the reporter gene assays revealed that the compound fails to cause appreciable PPAR γ activation. Molecular docking of **28** in the PPAR γ ligand binding domain (Figure S11a) suggested that its bulky trifluoromethyl substituent and *N*-methyl residue force **28** to a binding mode in the PPAR γ ligand binding domain that prevents the formation of canonical H-bond contacts with the activation triad His323, Tyr327, and His449 resulting in failure to activate the nuclear receptor. Similar observations also hold true for PPAR α (Figure S11b).

To profile **2**, **20**, and **28** under physiologically more relevant conditions in vitro, we studied their activity in a full-length PPAR γ reporter gene assay³⁷ that in contrast to the hybrid Gal4 system involves PPAR γ /RXR heterodimers and thereby reflects the physiological setting. In this test, dual PPAR/RXR agonists **2** and **20** produced significantly stronger activation than the RXR-selective agonist **28** (Figure 6a). When we combined the RXR agonist **28** with the PPAR γ agonist rosiglitazone, we observed synergistic activation of the PPAR γ /RXR heterodimer (Figure 6b). Moreover, when we studied the effects of **2**, **20**, and **28** on the expression of genes regulated by PPAR γ /RXR heterodimers in HepG2 cells, we retrieved similar results as in the full-length PPAR γ /RXR reporter gene assay (Figure 6c). Expression of PPAR γ -regulated angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) was markedly increased by dual PPAR/RXR agonists **2** and **20**, whereas **28** caused only weak induction that failed to reach statistical significance. In contrast, ApoE expression, for which an important regulatory influence of RXR has been reported,¹¹ was induced by **2**, **20**, and **28** with comparable efficacy.

Side effects of known RXR agonists involve elevation of triglyceride levels which mechanistically is mediated via induction of LXR regulated gene sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c).^{6–9} Therefore, we also studied the effect of **28** on the expression of this key regulator of lipid metabolism in HepG2 cells (Figure 6c). In a concentration of 1 μ M, **28** did not alter SREBP-1c expression in contrast to rexinoid **1** which caused a 2-fold induction. When we stimulated SREBP-1c expression with the LXR agonist T0901317, **1** had no further inductive effect, whereas **28** markedly decreased LXR agonist-induced SREBP-1c mRNA levels. To exclude LXR antagonism of **28** as a potential source of this activity, we studied **28** in competition with the LXR agonist in specific Gal4-hybrid reporter gene assays for LXR activity (Figure 6e), where **28** antagonized neither LXR subtype. Moreover, in a full-length LXR reporter gene assay (Figure 6f), **28** neither affected baseline LXR/RXR activity nor the activity of LXR agonist T0901317. These observations are in agreement with previous reports that characterize esters of **2** but not **2** itself as LXR modulators.³⁸

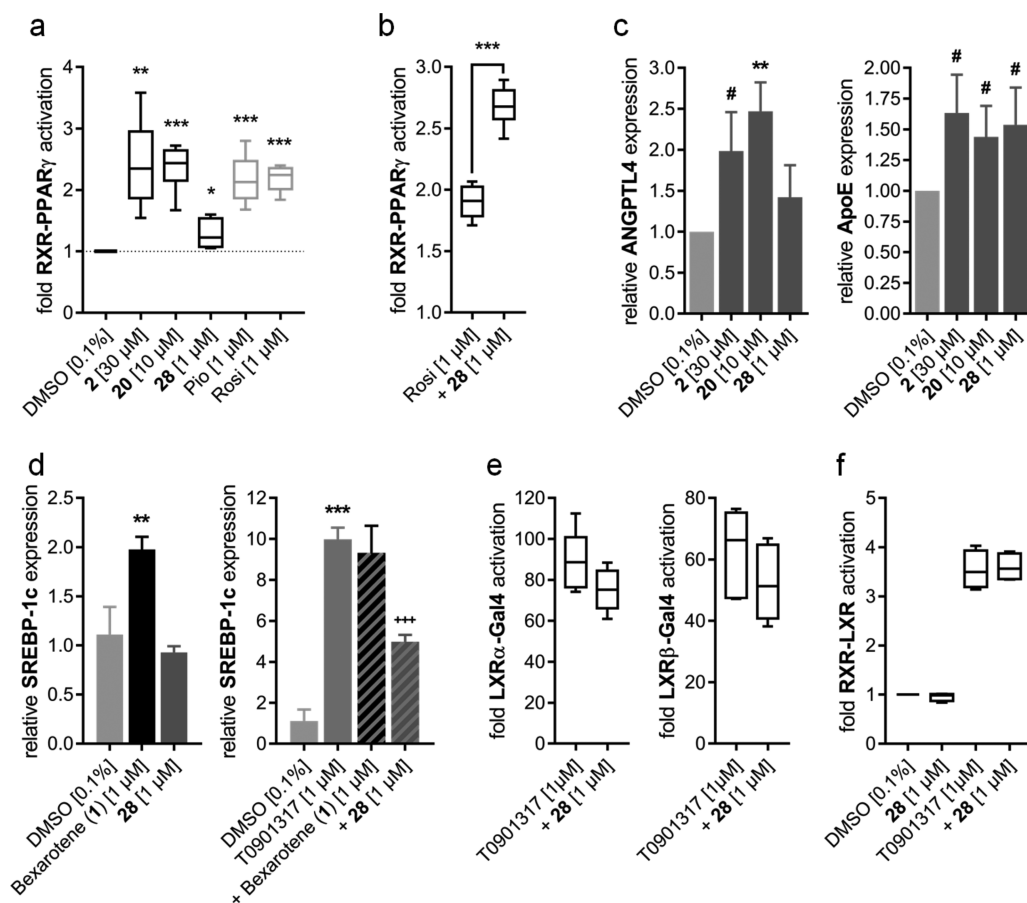


Figure 6. Functional in vitro profiling of **2** and analogues **20** and **28**. (a) In a full-length PPAR γ reporter gene assay involving PPAR γ /RXR heterodimers, the dual activity of **2** and **20** on RXRs and PPARs caused robust activation, whereas RXR-selective analogue **28** had weaker efficacy, $n = 6$. (b) Combination of RXR agonist **28** and the PPAR γ agonist rosiglitazone in the full-length PPAR γ reporter gene assay caused marked synergy through the activation of both receptors in the heterodimer, $n = 6$. (c) Effect of **2**, **20**, and **28** on mRNA expression of PPAR γ /RXR heterodimer-regulated genes. Dual activators **2** and **20** induced expression of ApoE and ANGPTL4, whereas RXR-selective analogue **28** only enhanced ApoE expression. Results are the mean \pm SEM, $n = 3$. (d) Effect of RXR agonist **28** on mRNA expression of RXR/LXR regulated gene sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c). In contrast to rexinoid **1**, **28** did not induce SREBP-1c expression but significantly diminished LXR agonist (T0901317)-induced SREBP-1c expression. Results are the mean \pm SEM, $n = 4$. (e) In specific Gal4-hybrid reporter gene assays, **28** did not affect agonist-induced LXR activity, $n = 6$. (f) In a full-length LXR reporter gene assay where reporter gene expression is governed by full human LXR/RXR heterodimers, **28** neither affected baseline LXR/RXR activity nor LXR activation by the agonist. $n = 4$. # $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; +++ $p < 0.001$ vs T0901317.

Encouraged by this very promising in vitro data, we profiled **28** in vivo. After a single oral dose of 10 mg/kg, **28** showed preferable pharmacokinetics (Figure 7a) with rapid uptake, high bioavailability, and a favorable plasma half-life of 4.2 h. After 2 h, similarly high concentrations of **28** were found in plasma and liver suggesting no hepatic accumulation. The compound reached levels in brain (275 ± 18 ng/g; brain/plasma ratio 1.5%) that were clearly sufficient for RXR modulation (RXR α : $EC_{50} = 0.093 \mu\text{M} = 35$ ng/mL; RXR β : $EC_{50} = 0.143 \mu\text{M} = 54$ ng/mL; RXR γ : $EC_{50} = 0.36 \mu\text{M} = 137$ ng/mL) in the CNS.

In mouse livers, we observed pharmacodynamic effects of **28** by significant modulation of RXR regulated gene expression eight hours after dosing (Figure 7c). Compared to vehicle-treated animals, hepatic expression of RXR heterodimer-regulated genes ANGPTL4,^{39,40} ApoE¹¹ and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)^{41,42} was markedly induced confirming that **28** hits RXR in vivo. In contrast, as already observed in cellular gene expression analysis (Figure 6c), we detected no effect of **28** on SREBP-1c^{8,43} expression in vivo.

CONCLUSIONS AND OUTLOOK

Numerous beneficial effects have been observed for the fatty acid mimetic **2** in animal models and have led to more than 20 patents claiming its therapeutic use in neurodegenerative, inflammatory, and neoplastic disorders beyond many others in metabolic diseases.²⁴ **2** was originally optimized for a maximum lipid-lowering effect in a phenotypic animal model without any knowledge of its molecular target²³ before it was characterized as a moderately potent PPAR agonist decades later.²⁵ However, this activity alone was not sufficient to explain the variety of its promising therapeutic effects. Here, we show that **2** is also an agonist of the RXRs with even higher potency than on the PPARs. RXR agonism of **2** provides a mechanistic basis for its beneficial effects in atopic dermatitis,⁴⁴ MS^{10,45} and AD^{11,30} for which the involvement of RXRs has already been proposed. Moreover, this newly identified target conclusively explains the enormous lipid-lowering efficacy of **2** that arises from simultaneous activation of both partners of the heterodimers which are endogenously formed by PPARs with RXRs.

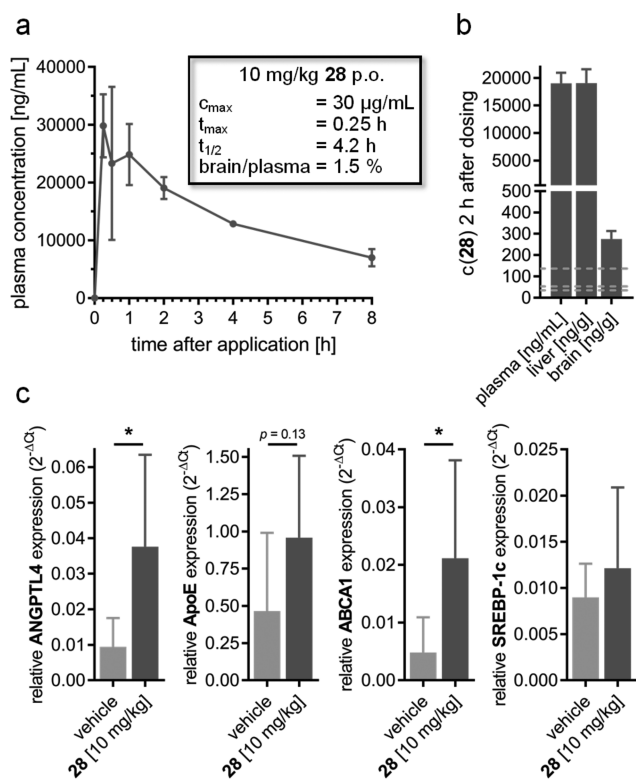


Figure 7. In vivo profiling of **28** (10 mg/kg) in C57BL/6 mice: (a) **28** revealed preferable pharmacokinetics with rapid uptake, high bioavailability and long half-life. (b) After 2 h, similar concentrations of **28** were found in plasma and liver and the compound even reached sufficient levels for RXR modulation in brain. Dotted lines indicate EC_{50} values for the three RXR subtypes. (c) The RXR agonist **28** produced pharmacodynamic effects in vivo with marked induction of hepatic ANGPTL4, ApoE, and ABCA1 expression. In contrast, **28** did not affect SREBP-1c expression in vivo. All results are the mean \pm SD; $n = 6$ for **28**, $n = 3$ for vehicle; * $p < 0.05$.

In addition to deciphering the pharmacological mode of action of **2**, we establish its structure–activity relationship on RXRs and have discovered specific structural modifications suitable to individually control the activity of the compound class on RXRs and PPARs. Using this knowledge, we have developed an analogue (**20**) of **2** with equally strong dual activity on RXRs and PPARs but significantly improved potency and a balanced activity on all receptors. Moreover, the introduction of a side chain in α -position of the carboxylic acid fully disrupted RXR activation leading to a PPAR-selective agonist (**7**) and we succeeded in designing an RXR-selective analogue (**28**) of **2** by combining all RXR-favored structural modifications. Thus, the activity profile of analogues of **2** can be specifically tailored towards dual and selective activation of RXRs and PPARs with minor structural modifications. With this characteristic, the nuclear receptor modulators derived from **2** appear as a superior set of tool compounds to study the involvement and interplay of RXRs and PPARs in disease. Selective RXR agonist **28** and selective PPAR agonist **7** as well as the dual agonist **20** originate from the same lead and display enormous structural similarity despite markedly different potencies on the nuclear receptors. Their use in mechanistic studies in vivo will enable differential modulation of RXRs and PPARs without major differences in compound-specific characteristics such as pharmacokinetics or unspecific toxicity. Studying the interplay of PPARs and RXRs in neuro-

degenerative, inflammatory, neoplastic, and metabolic diseases with **7**, **20**, and **28** as tools may enable a deeper understanding of the pharmacological effects observed for **2** in animal models and improve our knowledge on RXRs and PPARs in various pathologies.

In MS and AD, where already convincing in vivo evidence is available for therapeutic potential of RXRs and PPARs, the set of pharmacological tools will be of great value to study the potential synergies of RXR and PPAR activation. Particularly, in MS, the potential additive or even synergistic activity of this multi-target combination holds great promise. For PPAR γ activation, anti-inflammatory activity on T-cells and macrophages has been reported in MS,^{16,17} whereas RXR activation is associated with regenerative effects on myelination in the CNS.^{10,13–15} Simultaneous RXR/PPAR activation might lead to synergies via the combination of PPAR-mediated anti-inflammatory and RXR-mediated regenerative activities. In addition, RXR activation might cause a boosting effect on PPAR activation through simultaneous activation of its heterodimer partner RXR. Importantly, the pharmacokinetic profile of **28** indicates that the compound class despite its acidic structural element even after a single oral dose reaches concentrations in brain that are sufficient for nuclear receptor modulation in the CNS.

The RXR-selective agonist **28** lacking the lead compound's (**2**) pyrimidin-4-chlorine substituent and the thioether moiety as potentially labile and toxic elements constitutes a strongly optimized analogue of **2** that spares PPARs and exclusively activates RXRs. With its markedly superior solubility, preferable pharmacokinetics and low toxicity, it provides a unique profile amongst known potent RXR ligands. Importantly, **28** did not modulate RXR/LXR activity in vitro and lacked induction of the key regulator of lipogenesis SREBP-1c in vitro and in vivo, which is considered as the source of increased triglyceride levels under rexinoid therapy.^{6–9} Thereby, **28** could avoid a crucial adverse effect of classical rexinoids and may establish a novel class of safer and less lipophilic RXR ligands that can overcome typical obstacles of RXR targeting drug discovery.

EXPERIMENTAL SECTION

General. Purity of all compounds for biological evaluation was confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) (see the Supporting Information for detailed method) to be >95%. The biological activity of **2**, **7**, **20**, and **28** was observed in three independent cellular test systems and direct interaction with the target proteins was confirmed by ITC.

Preparation and Analytical Characterization of **28 and Intermediates.** 3-((4-(2,3-Dihydro-1H-inden-4-ylmethylamino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoic Acid (**28**). **75** (0.12 g, 0.19 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in trifluoroacetic acid (5.0 mL) and stirred at rt for 30 min. Water (5.0 mL) was then added and the mixture was stirred at rt for 24 h. The mixture was extracted with EtOAc (3 \times 15 mL), the combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed under vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (75:23:2) as mobile phase to obtain **28** as a pale yellow solid (60 mg, 63%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 75:23:2) = 0.29. m.p.: 107.9 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.29–7.24 (m, 2H), 6.97 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.68 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.03–2.97 (m, 2H), 2.92 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.77–2.71 (m, 1H), 2.62 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 2.09 (p, J = 7.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.38, 166.38, 165.28, 155.56, 148.19, 142.32, 139.97, 129.37, 125.55, 125.42, 121.88, 95.76, 63.94, 37.48, 34.19, 33.65, 31.08, 25.63. High-resolution mass

spectrometry (HRMS) (matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)): m/z calculated 382.13730 for $C_{18}H_{19}F_3N_3O_3$, found 382.13654 ($[M + H]^+$). HPLC (method B): RT 26.127 min.

N-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-4-yl)-2-(methylsulfanyl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-amine (**69**). 4-Chloro-2-(methylsulfanyl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidine (**67**, 0.50 g, 2.2 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in EtOH (3 mL). 4-Aminoindane (**55**, 0.31 mL, 2.6 mmol, 1.2 equiv) and TEA (0.36 mL, 2.6 mmol, 1.2 equiv) were added and the solution was stirred under microwave irradiation at 120 °C for 4 h. After cooling to rt, EtOAc (30 mL) was added, the mixture was washed with 2 N HCl (2 × 20 mL) and saturated $NaHCO_3$ solution (20 mL), dried over $MgSO_4$, and the solvents were removed under vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (87.5:12.5) as mobile phase to obtain **69** as a colorless solid (0.27 g, 38%). R_f (hexane/EtOAc = 87.5:12.5) = 0.35. 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ = 8.70 (s, 1H), 7.56 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 2.97–2.85 (m, 4H), 2.48 (s, 3H), 2.06 (p, J = 7.4 Hz, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ = 174.13, 162.30, 154.49, 146.63, 134.86, 127.80, 123.69, 122.40, 122.10, 120.06, 98.67, 33.77, 31.33, 25.65, 13.97. Mass spectrometry (MS) (positive electrospray ionization (ESI+)): m/z 326.01 ($[M + H]^+$).

N-(2,3-Dihydro-1*H*-inden-4-yl)-2-methanesulfonyl-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-amine (**71**). **69** (0.49 g, 1.5 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in HOAc (25 mL). Sodium tungstate dihydrate (0.049 g, 0.15 mmol, 0.10 equiv) and hydrogen peroxide 30% (0.6 mL, 6.0 mmol, 4.0 equiv) were added and the mixture was stirred at rt for 24 h. Water (25 mL) was then added and the mixture was extracted with EtOAc (3 × 50 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed under vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (75:25) as mobile phase to obtain **71** as an orange solid (0.43 g, 78%). R_f (hexane/EtOAc = 75:25) = 0.29. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.70 (s, 1H), 7.31–7.10 (m, 3H), 6.91 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.03 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.83 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 2.15 (p, J = 7.5 Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$): δ = 166.61, 163.51, 155.78, 147.43, 139.43, 131.68, 128.04, 124.16, 121.89, 120.16, 102.14, 38.92, 33.29, 30.76, 25.07. MS (ESI+): m/z 379.99 ($[M + Na]^+$).

Ethyl 3-((4-((2,3-Dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (**74**). **71** (0.39 g, 1.1 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in THF (10 mL). Lithium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in hexane, 2.4 mL, 2.4 mmol, 2.2 equiv) was added and the mixture was stirred at rt for 10 min. Ethyl 3-hydroxypropanoate (**72**, 0.15 mL, 1.2 mmol, 1.1 equiv) was then added dropwise over 30 min via a syringe and the mixture was stirred at rt for 4 h. EtOAc (10 mL) and 2 N HCl (10 mL) were added, phases were separated, and the mixture was extracted with EtOAc (2 × 10 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed under vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (75:25) as mobile phase to obtain **74** as a pale yellow oil (0.25 g, 57%). R_f (hexane/EtOAc = 75:25) = 0.5. 1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 8.65 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.51 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 4.07 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.88 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.73 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.00 (p, J = 7.5 Hz, 2H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 171.28, 166.35, 164.82, 155.93, 146.51, 134.98, 127.79, 122.92, 122.25, 121.95, 120.74, 97.67, 63.81, 60.94, 34.43, 33.73, 31.22, 25.57, 14.46. MS (ESI+): m/z 418.05 ($[M + Na]^+$).

Ethyl 3-((4-((2,3-Dihydro-1*H*-inden-4-yl)methylamino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (**75**). **74** (0.15 g, 0.38 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in DMF (7 mL), K_2CO_3 (0.32 g, 2.3 mmol, 6.1 equiv) was added, and the mixture was stirred at rt for 30 min before MeI (0.10 mL, 1.6 mmol, 4.2 equiv) was added dropwise and the mixture was stirred at rt for 24 h. 2 N HCl (10 mL) was then added and the mixture was stirred for 10 min. The mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL), the combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and the solvents were removed under

vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (83.3:16.7) as mobile phase to obtain **75** as a pale yellow oil (0.12 g, 77%). R_f (hexane/EtOAc = 83.3:16.7) = 0.4. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.23 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 6.99–6.92 (m, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.67 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.03–2.95 (m, 2H), 2.85 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.72 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 2.62 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 2.08 (p, J = 7.4 Hz, 2H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 171.10, 165.33, 164.46, 155.36, 147.54, 141.51, 139.11, 128.53, 124.65, 122.61, 118.97, 95.58, 62.95, 60.82, 37.44, 34.18, 33.24, 30.68, 25.04, 14.26. MS (ESI+): m/z 432.09 ($[M + Na]^+$).

For synthesis and analytical characterization of **9**, **11**–**18**, **20** and **23**–**28** and their precursors please refer to the [Supporting Information](#).

In Vitro Pharmacological Characterization. *Hybrid Reporter Gene Assays for PPAR α / γ / δ , RXR α / β / γ , LXRA/ β , RAR α / β / γ , FXR, VDR, CAR. Plasmids.* The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-hPPAR α -LBD,⁴⁶ pFA-CMV-hPPAR γ -LBD,⁴⁶ pFA-CMV-hPPAR δ -LBD,⁴⁶ pFA-CMV-hLXR α -LBD,⁴⁷ pFA-CMV-hLXR β -LBD,⁴⁷ pFA-CMV-hRXR α -LBD,³⁴ pFA-CMV-hRXR β -LBD,³⁴ pFA-CMV-hRXR γ -LBD,³⁴ pFA-CMV-hRAR α -LBD,³⁴ pFA-CMV-hRAR β -LBD,³⁴ pFA-CMV-hRAR γ -LBD,³⁴ pFA-CMV-hFXR-LBD,⁴⁷ pFA-CMV-hVDR-LBD,³⁴ and pFA-CMV-hCAR-LBD³⁴ coding for the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the canonical isoform of the respective nuclear receptor have been reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as the reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth.

Assay Method. HEK293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high glucose with 10% fetal calf serum (FCS), sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) at 37 °C and 5% CO_2 . Twenty-four hours before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (3 × 10⁴ cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega), and the corresponding Gal4-fusion nuclear receptor plasmid. Five hours after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and additionally containing 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. After overnight (14–16 h) incubation with the test compounds, the cells were assayed for luciferase activity using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by Renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of the untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of a test compound at a respective concentration by the fold activation of a respective reference agonist at 1 μ M (PPAR α : GW7647 (EC₅₀ = 6 nM⁴⁸); PPAR γ : rosiglitazone (EC₅₀ = 18 nM⁴⁹); PPAR δ : L165,041 (EC₅₀ = 125 nM⁵⁰); RXR α / β / γ : bexarotene (EC₅₀: 33 nM (α)⁵, 24 nM (β)⁵, 25 nM (γ)⁵); RAR α / β / γ : tretinoin (EC₅₀: 240 nM (α),⁵¹ 38 nM (β),⁵¹ 6 nM (γ);⁵¹ LXRA/ β : T09021317 (EC₅₀ ~ 50 nM⁴²); FXR: GW4064 (EC₅₀ = 70 nM⁵²); CAR: CITCO (EC₅₀ = 49 nM),⁵³ VDR: calcitriol (EC₅₀ = 8 nM⁵⁴)). Maximum relative activation on PPAR γ refers to the activity of rosiglitazone (1 μ M) as the reference agonist. For compounds that were characterized relative to pioglitazone (1 μ M) previously, a factor between the activation efficacies of rosiglitazone (1 μ M) and pioglitazone (1 μ M) was determined to adjust the maximum relative activation values accordingly. All hybrid assays were validated with the above-mentioned reference agonists which yielded EC₅₀ values in agreement with the literature.

Full-Length Reporter Gene Assays for RXR/PPAR γ and RXR/LXR Heterodimer Activation.³⁷ HEK293T cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 μ g/mL) at 37 °C and 5% CO₂. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (3 \times 10⁴ cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with the reporter RXR-PPAR γ responsive construct PPRE1-pGL3 or the RXR-LXR responsive construct ABCA1-pGL3 as well as pRL-SV40 (Promega). Five hours after transfection, the medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), now additionally containing 0.1% DMSO, and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (12–14 h) incubation with the test compounds, the cells were assayed for luciferase activity using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by Renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control.

Quantification of mRNA Expression by Quantitative Real-Time (qRT) Polymerase Chain Reaction (PCR). HepG2 cells were incubated with **2** (30 μ M), **20** (10 μ M), **28** (1 μ M), **1** (1 μ M, positive control), T0901317 (1 μ M, positive control), or 0.1% DMSO as untreated control for 12 h. Medium containing the test compounds was renewed after 6 h. The cells were then harvested, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS), and then directly used for RNA extraction. 2 μ g of total RNA were extracted from HepG2 cells by the Total RNA Mini Kit (R6834-02, Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA). RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fischer Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol. RXR target gene expression was evaluated by quantitative real-time PCR analysis with a StepOnePlus System (Life Technologies, Carlsbad, CA) using Power SYBR Green (Life Technologies; 12.5 μ L/well). Each sample was set up in duplicates and repeated in at least three independent experiments. The expression was quantified by the comparative $\Delta\Delta$ Ct method and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as the reference gene. The following PCR primers were used: hGAPDH: 5'-ATA TGA TTC CAC CCA TGG CA (fw), 5'-GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC (rev); hApoE: 5'-GGT CGC TTT TGG GAT TAC CT (fw), 5'-CTC CAG TTC CGA TTT GT (rev); hANGPTL4: 5'-ATT CTT TCC AGC GGC TTC TG (fw), 5'-GAG GAC TGG AGA CGC GGA G (rev); and hSREBP-1c: 5'-GGA GGG GTA GGG CCA ACG GCC T (fw), 5'-CAT GTC TTC GAA AGT GCA ATC C (rev).

Isothermal Titration Calorimetry (ITC). Isothermal titration calorimetry (ITC) was conducted on an Affinity ITC (TA Instruments Affinity ITC). The recombinant PPAR γ ligand binding domain protein (180–250 μ M) or the RXR α ligand binding domain protein (110–230 μ M) and the corresponding Wy14,643 derivatives (20–40 μ M) were each dissolved in *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-ethanesulfonic acid buffer (25 mM; adjusted to pH 7.5 with KOH; further containing 150 mM KF, 10% glycerol (w/w), 1% DMSO (v/v) and 5 mM dithiothreitol). The ITC instrument was adjusted to a temperature of 25 °C and the stirring rate was set at 75 rpm. 190 μ L compound solution was filled into the reaction cell and PPAR γ or RXR α ligand binding domain solution was titrated in 19–25 injections. The first injection had a reduced volume of 1.0 μ L and was followed by injections of 2.5 μ L. An interval of 300 s was maintained between individual injections. The heat of dilution resulting from titrating PPAR γ /RXR α ligand binding domain protein solution into the buffer solution was recorded in an additional ITC

run and subtracted from the raw ITC data obtained for the Wy14,643 derivatives. ITC raw data were analyzed using a NanoAnalyze software package (version 3.7.5). An independent binding model was used to fit the reaction enthalpy (ΔH), binding affinity constant (K_d), and stoichiometry (n). Free energy change (ΔG) was calculated from the equation $\Delta G = -RT \ln K$ and the entropy (ΔS) was calculated from $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

In Vivo Pharmacological Characterization. Animals and Compound Application. Twelve male C57BL6/JRj mice (23–26 g body weight, purchased from Janvier Labs, France) were used for the pharmacokinetic study. The animals were housed in a temperature-controlled room (20–24 °C) and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle. Food and water were available ad libitum. The in-life phase was performed by the contract research organization Pharmacelsus (Saarbrücken, Germany). All experimental procedures were approved by and conducted in accordance with the regulations of the local Animal Welfare authorities (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen, Saarbrücken). Nine animals received a single oral dose of 10 mg/kg body weight of RXR agonist **28** in water containing 1% hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)/Tween 80 (99:1). Three animals received the vehicle (water containing 1% HPMC/Tween 80 (99:1)). All animals behaved normal throughout the study and showed no adverse effects.

Blood, Brain, and Liver Sampling. At six time points (15, 30, 60, 120, 240, and 480 min after application of **28**), blood (20 μ L) was obtained from three animals from the lateral tail vein. At the 120 min time point (three animals) and at the 480 min time point (six animals), mice were anesthetized under isoflurane and blood (~500 μ L) was obtained by retro-orbital puncture. For brain and liver collection, mice were sacrificed by cervical dislocation after the blood sampling and complete brain and liver were immediately snap-frozen and stored at –80 °C until further evaluation. Plasma, brain and liver were equally obtained from three control mice which received oral application of the vehicle (1% HPMC/Tween 80 (99:1)).

Pharmacokinetic Analysis. The RXR agonist **28** was quantified from the above described animal samples using LC–MS. For plasma levels, three samples each for the 15, 30, 60, 120, and 240 min time points and six samples for the 480 min time point were used. Brain and liver concentrations were quantified from three samples taken at the 120 min time point. On the basis of the obtained plasma levels, pharmacokinetic analysis was performed applying a noncompartment model using the Kinetica 5.0 software (Thermo Scientific, Waltham).

Quantification of mRNA Levels from Mouse Livers: Hepatocyte Isolation of Mouse Liver Tissue and RT-qPCR. Liver samples from six mice receiving a single oral dose of **28** (10 mg/kg) and three mice receiving vehicle were obtained 8 h post dose and used to study mRNA expression in liver. To homogenize the liver samples for qRT-PCR analysis, one-third of each liver was placed on one Falcon Cell Strainer with 40 μ m pore size (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium) in a 50 mL Falcon tube. Every tissue was rinsed with PBS buffer containing 10% FCS and 1% PenStrep and pressed through the cell strainer until 5 mL cell suspension had been collected. The samples were centrifuged at 1200 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellets were washed with 5 mL cold PBS buffer and again centrifuged at 1200 rpm for 10 min at 4 °C. After discarding the supernatant, the cell pellets were re-suspended in 1 mL PBS and total RNA was extracted using EZA Total RNA Kit I (Omega Bio-tek Inc., Norcross, GA) following the Animal Tissue Protocol. The extracted RNA was used for qRT-PCR and equally treated as described for mRNA quantification from HepG2 cells (see above). PCR primers for the murine genes were: mGAPDH: 5'-CGA CTT CAA CAG CAA CTC CCA CTC TTC C (fw), 5'-TGG GTG GTC CAG GGT TTC TTA CTC CTT (rev); mSREBP-1c: 5'-ACT GGA CAC AGC GGT TTT GA (fw), 5'-CGG GAA GTC ACT GTC TTG G (rev); mABCA1: 5'-CGA CCA TGA AAG TGA CAC GC (fw), 5'-AGC ACA TAG GTC AGC TCG TG (rev); mApoE: 5'-AGA ACT GAC GGC ACT GAT GG (fw), 5'-CGT AGA TCC TCC ATG TCG GC (rev); and mANGPTL4: 5'-AAG ATG CAC

AGC ATC ACA GG (fw), 5'-ATG GAT GGG AAA TTG GAG C (rev).

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01848.

Figures, synthetic procedures, analytical characterization and further methods for in vitro characterization (PDF) Molecular formula strings with in vitro activity data (CSV)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de. Phone +49 69 798 29327.

ORCID

Ewgenij Proschak: 0000-0003-1961-1859

Daniel Merk: 0000-0002-5359-8128

Author Contributions

All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by DFG (PR-1405/2-2; SFB1039 A07) and LOEWE Research Center Translational Medicine and Pharmacology TMP. E.P. was supported by DFG (PR-1405/4-1).

■ ABBREVIATIONS

AD, Alzheimer's disease; ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ANGPTL4, angiotensin-like protein 4; ApoE, apolipoprotein E; CNS, central nervous system; DEA, diethylaniline; DIPS, diisopropylsulfate; DMS, dimethyl sulfate; EtOH, ethanol; ITC, isothermal titration calorimetry; LiOH, lithium hydroxide; LXR, liver X receptor; MS, multiple sclerosis; μ w, microwave; NaH, sodium hydride; NaOH, sodium hydroxide; POCl₃, phosphorus(V) oxychloride; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RAR, retinoid acid receptor; rt, room temperature; RXR, retinoid X receptor; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein 1c; TEA, triethylamine

■ REFERENCES

- (1) Michalik, L.; Auwerx, J.; Berger, J. P.; Chatterjee, V. K.; Glass, C. K.; Gonzalez, F. J.; Grimaldi, P. A.; Kadowaki, T.; Lazar, M. A.; O'Rahilly, S.; Palmer, C. N. A.; Plutzky, J.; Reddy, J. K.; Spiegelmann, B. M.; Staels, B.; Wahli, W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 726–741.
- (2) Germain, P.; Chambon, P.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Lazar, M. A.; Leid, M.; De Lera, A. R.; Lotan, R.; Mangelsdorf, D. J.; Gronemeyer, H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 760–772.
- (3) Lamers, C.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Therapeutic Modulators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR): A Patent Review (2008–present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 803–841.

- (4) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Zhi, L.; McClurg, M. R.; Berger, E.; Wagoner, M.; Mais, D. E.; Suto, C. M.; Davies, P. J. A.; et al. Design and Synthesis of Potent Retinoid X Receptor Selective Ligands That Induce Apoptosis in Leukemia Cells. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3146–3155.

- (5) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Badea, B. A.; White, S. K.; Mais, D. E.; Berger, E.; Suto, C. M.; Goldman, M. E.; Heyman, R. A. Synthesis and Structure—Activity Relationships of Novel Retinoid X Receptor-Selective Retinoids. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2930–2941.

- (6) Vaz, B.; de Lera, A. Advances in Drug Design with RXR Modulators. *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7*, 1003–1016.

- (7) DeBose-Boyd, R. A.; Ye, J. SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. *Trends Biochem. Sci.* **2018**, *43*, 358–368.

- (8) Zhang, G. H.; Lu, J. X.; Chen, Y.; Guo, P. H.; Qiao, Z. L.; Feng, R. F.; Chen, S. E.; Bai, J. L.; Huo, S. D.; Ma, Z. R. ChREBP and LXR α Mediate Synergistically Lipogenesis Induced by Glucose in Porcine Adipocytes. *Gene* **2015**, *565*, 30–38.

- (9) Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. SREBPs: Activators of the Complete Program of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis in the Liver. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 1125–1131.

- (10) Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Nait Oumesmar, B.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Baron-Van Evercooren, A.; Chambon, P.; French-Constant, C.; Franklin, R. J. M. Retinoid X Receptor Gamma Signaling Accelerates CNS Remyelination. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14*, 45–53.

- (11) Koster, K. P.; Smith, C.; Valencia-Olvera, A. C.; Thatcher, G. R. J.; Tai, L. M.; LaDu, M. J. Retinoids as Therapeutics for Alzheimer Disease: Role of APOE. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 708–720.

- (12) Hanke, T.; Merk, D.; Steinhilber, D.; Geisslinger, G.; Schubert-Zsilavecz, M. Small Molecules with Anti-Inflammatory Properties in Clinical Development. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *157*, 163–187.

- (13) Hanafy, K. A.; Sloane, J. A. Regulation of Remyelination in Multiple Sclerosis. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3821–3828.

- (14) Chandraratna, R. A.; Noelle, R. J.; Nowak, E. C. Treatment with Retinoid X Receptor Agonist IRX4204 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am. J. Transl. Res.* **2016**, *8*, 1016–1026.

- (15) Merk, D. Chances and Challenges of Retinoid X Receptor Gamma Targeting for Regenerative Multiple Sclerosis Treatment. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 2411.

- (16) Vallée, A.; Lecarpentier, Y.; Guillemin, R.; Vallée, J.-N. Demyelination in Multiple Sclerosis: Reprogramming Energy Metabolism and Potential PPAR γ Agonist Treatment Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1212.

- (17) Mrak, R. E.; Landreth, G. E. PPAR γ , Neuroinflammation, and Disease. *J. Neuroinflamm.* **2004**, *1*, 5.

- (18) Kaiser, C. C.; Shukla, D. K.; Stebbins, G. T.; Skias, D. D.; Jeffery, D. R.; Stefoski, D.; Katsamakias, G.; Feinstein, D. L. A Pilot Test of Pioglitazone as an Add-on in Patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *211*, 124–130.

- (19) Shukla, D. K.; Kaiser, C. C.; Stebbins, G. T.; Feinstein, D. L. Effects of Pioglitazone on Diffusion Tensor Imaging Indices in Multiple Sclerosis Patients. *Neurosci. Lett.* **2010**, *472*, 153–156.

- (20) Esmaeili, M. A.; Yadav, S.; Gupta, R. K.; Waggoner, G. R.; Deloach, A.; Calingasan, N. Y.; Beal, M. F.; Kiaei, M. Preferential PPAR- α Activation Reduces Neuroinflammation, and Blocks Neurodegeneration in Vivo. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 317–327.

- (21) Cramer, P. E.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Lee, C. Y. D.; Karlo, J. C.; Zinn, A. E.; Casali, B. T.; Restivo, J. L.; Goebel, W. D.; James, M. J.; Brunden, K. R.; Wilson, D. A.; Landreth, G. E. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β -Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* **2012**, *335*, 1503–1506.

- (22) Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5235–5266.

- (23) Santilli, A. A.; Scotese, A. C.; Tomarelli, R. M. A Potent Antihypercholesterolemic Agent: [4-Chloro-6-(2,3-Xylidino)-2-Pyrimidinylthio]Acetic Acid (Wy-14643). *Experientia* **1974**, *30*, 1110–1111.

- (24) Pollinger, J.; Merk, D. Therapeutic Applications of the Versatile Fatty Acid Mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2017**, *27*, 517–525.
- (25) Rau, O.; Syha, Y.; Zettl, H.; Kock, M.; Bock, A.; Schubert-Zsilavecz, M. Alpha-Alkyl Substituted Pirinixic Acid Derivatives as Potent Dual Agonists of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha and Gamma. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 191–195.
- (26) Chiba, T.; Takeuchi, S.; Esaki, H.; Yamamura, K.; Kurihara, Y.; Moroi, Y.; Furue, M. Topical Application of PPAR α (but Not β/δ or γ) Suppresses Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice. *Allergy* **2012**, *67*, 936–942.
- (27) Kippenberger, S.; Bernd, A.; Kaufmann, R.; Bock, A.; Thaci, D.; Kock, M.; Gassenmeier, T. Use of Pirinixic Acid and Its Salts in Topical Preparations for Treating Chronic Inflammatory Diseases, Especially Psoriasis. WO2005/107874A2, Nov 17, 2005.
- (28) Kuenzli, S.; Saurat, J.-H. Effect of Topical PPAR β /Delta and PPARalpha Agonists on Plaque Psoriasis. *Dermatology* **2003**, *206*, 252–256.
- (29) Cunard, R.; DiCampli, D.; Archer, D. C.; Stevenson, J. L.; Ricote, M.; Glass, C. K.; Kelly, C. J. WY14,643, a PPAR Ligand, Has Profound Effects on Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 6806–6812.
- (30) Connop, B. P.; Grant, A.; MacDonald, D.; Nathwani, P. S.; Reiner, P. B.; Zhang, Z. Compounds, Compositions and Methods for Modulating Beta-Amyloid Production. US20,030,191,144A1, Oct 09, 2003.
- (31) Boerma, L. J.; Xia, G.; Qui, C.; Cox, B. D.; Chalmers, M. J.; Smith, C. D.; Lobo-Ruppert, S.; Griffin, P. R.; Muccio, D. D.; Renfrow, M. B. Defining the Communication between Agonist and Coactivator Binding in the Retinoid x Receptor α Ligand Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 814–826.
- (32) Love, J. D.; Gooch, J. T.; Benko, S.; Li, C.; Nagy, L.; Chatterjee, V. K. K.; Evans, R. M.; Schwabe, J. W. R. The Structural Basis for the Specificity of Retinoid-X Receptor-Selective Agonists: New Insights into the Role of Helix H12. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 11385–11391.
- (33) Schubert-Zsilavecz, M.; Syha, Y.; Kock, M.; Bock, A.; Rau, O.; Kippenberger, S.; Steinhilber, D.; Popescu, L. Derivate Des Pyrimidins Und Triazines Und Deren Verwendung. DE102005025161A1, Dec 07, 2006.
- (34) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J. S.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; Heering, J.; Lamers, C.; Lüddens, H.; Wurglics, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Non-Acidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7199–7205.
- (35) Schmidt, J.; Rotter, M.; Weiser, T.; Wittmann, S.; Weizel, L.; Kaiser, A.; Heering, J.; Goebel, T.; Angioni, C.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Geisslinger, G.; Kahnt, A.; Steinhilber, D.; Proschak, E.; Merk, D. A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7703–7724.
- (36) Meanwell, N. A. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2529–2591.
- (37) Heitel, P.; Gellrich, L.; Heering, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Modulator (SPPAR γ M) in Vitro. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, No. 13554.
- (38) Thomas, J.; Bramlett, K. S.; Montrose, C.; Foxworthy, P.; Eacho, P. I.; McCann, D.; Cao, G.; Kiefer, A.; McCowan, J.; Yu, K.; Grese, T.; Chin, W. W.; Burris, T. P.; Michael, L. F. A Chemical Switch Regulates Fibrate Specificity for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α) Versus Liver X Receptor. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2403–2410.
- (39) La Paglia, L.; Listi, A.; Caruso, S.; Amodio, V.; Passiglia, F.; Bazan, V.; Fanale, D. Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. *PPAR Res.* **2017**, *2017*, 1–15.
- (40) Liu, L.; Zhuang, X.; Jiang, M.; Guan, F.; Fu, Q.; Lin, J. ANGPTL4 Mediates the Protective Role of PPAR γ Activators in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, No. e3054.
- (41) Schmitz, G.; Langmann, T. Transcriptional Regulatory Networks in Lipid Metabolism Control ABCA1 Expression. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2005**, *1735*, 1–19.
- (42) Repa, J. J.; Turley, S. D.; Lobaccaro, J. A.; Medina, J.; Li, L.; Lustig, K.; Shan, B.; Heyman, R. A.; Dietschy, J. M.; Mangelsdorf, D. J. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science* **2000**, *289*, 1524–1529.
- (43) Tian, J.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. Insulin Induction of SREBP-1c in Rodent Liver Requires LXR α -C/EBP β Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113*, 8182–8187.
- (44) Son, J. H.; Park, S. Y.; Cho, Y. S.; Byun, Y. S.; Chung, B. Y.; Cho, H. J.; Kim, H. O.; Park, C. W. Two Cases of Successful Treatment of Refractory Chronic Inflammatory Skin Disease, Atopic Dermatitis and Psoriasis with Oral Alitretinoin. *Ann. Dermatol.* **2017**, *29*, 503–506.
- (45) Cunard, R.; DiCampli, D.; Archer, D. C.; Stevenson, J. L.; Ricote, M.; Glass, C. K.; Kelly, C. J. WY14,643, a PPAR Ligand, Has Profound Effects on Immune Responses In Vivo. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 6806–6812.
- (46) Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**, *72*, 881–887.
- (47) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1193–1198.
- (48) Brown, P. J.; Stuart, L. W.; Hurley, K. P.; Lewis, M. C.; Winegar, D. A.; Wilson, J. G.; Wilkison, W. O.; Ittoop, O. R.; Willson, T. M. Identification of a Subtype Selective Human PPAR α Agonist through Parallel-Array Synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1225–1227.
- (49) Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliewer, S. A.; Gampe, R. T.; McKee, D. D.; Moore, J. T.; Willson, T. M. Structural Determinants of Ligand Binding Selectivity between the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 13919–13924.
- (50) Ekambomé Basséne, C.; Suzenet, F.; Hennuyer, N.; Staels, B.; Caignard, D.-H.; Dacquet, C.; Renard, P.; Guillaumet, G. Studies towards the Conception of New Selective PPAR β/δ Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4528–4532.
- (51) Beard, R. L.; Duong, T. T.; Teng, M.; Klein, E. S.; Standevan, A. M.; Chandraratna, R. A. S. Synthesis and Biological Activity of Retinoic Acid Receptor-Specific Amides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3145–3148.
- (52) Maloney, P. R.; Parks, D. J.; Haffner, C. D.; Fivush, A. M.; Chandra, G.; Plunket, K. D.; Creech, K. L.; Moore, L. B.; Wilson, J. G.; Lewis, M. C.; Jones, S. A.; Willson, T. M. Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2971–2974.
- (53) Maglich, J. M.; Parks, D. J.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Goodwin, B.; Billin, A. N.; Stoltz, C. A.; Kliewer, S. A.; Lambert, M. H.; Willson, T. M.; Moore, J. T. Identification of a Novel Human Constitutive Androstane Receptor (CAR) Agonist and Its Use in the Identification of CAR Target Genes. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 17277–17283.
- (54) Wang, B.; Hao, M.; Zhang, C. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Nonsecosteroidal Vitamin D3 Receptor Ligands as Anti-Tumor Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1428–1436.

Tuning nuclear receptor selectivity of Wy14,643 towards selective retinoid X receptor modulation

Julius Pollinger^[a], Leonie Gellrich^[a], Simone Schierle^[a], Whitney Kilu^[a], Jurema Schmidt^[a], Lena Kalinowsky^[a], Julia Ohrndorf^[a], Astrid Kaiser^[a], Jan Heering^[b], Ewgenij Proschak^[a], Daniel Merk^{*[a]}

[a] Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438 Frankfurt, Germany

[b] Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt, Germany

* E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de

- SUPPORTING INFORMATION -

Table of Contents

1 Supporting figures & tables	2
2 Chemistry	8
2.1 General	8
2.2 Synthesis and analytical characterization of 3-28 and their precursors	9
3 Methods for <i>in vitro</i> pharmacological characterization	24
3.1 Toxicity assay	
3.2 Determination of aqueous solubility	
3.3 Determination of logP	
3.4 Metabolism assay	
4 Computational methods	28
5 Abbreviations	29
6 Supporting references	30

1 Supporting figures & tables

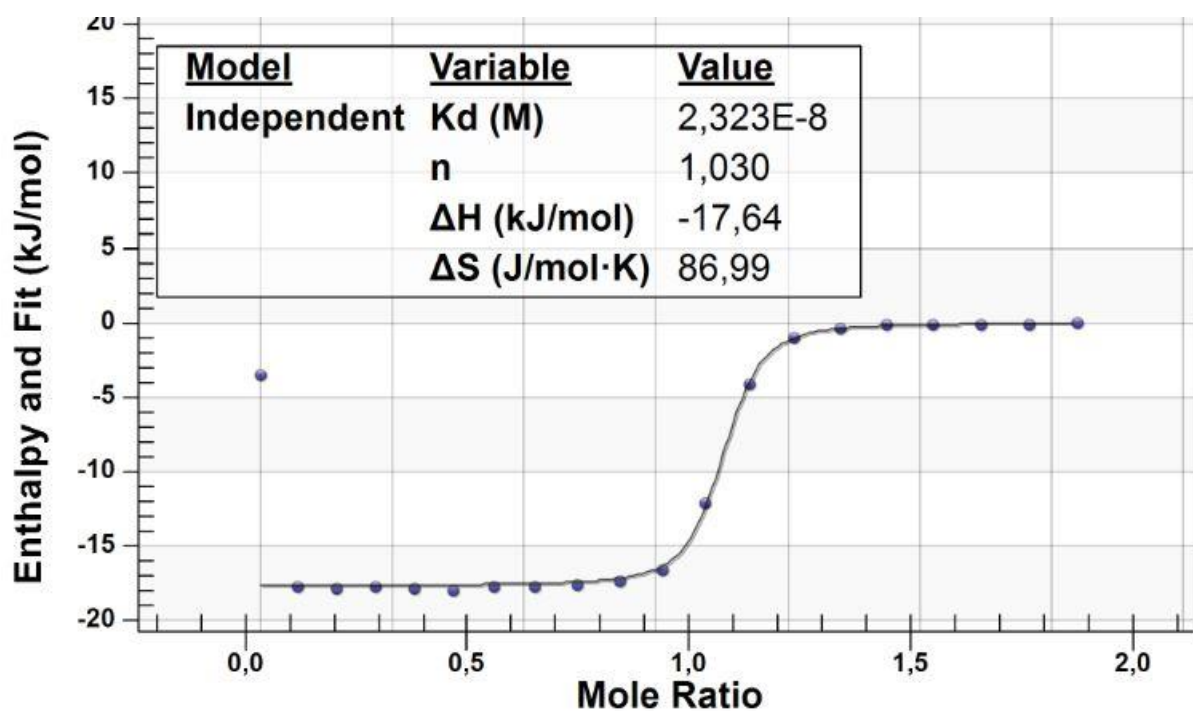


Figure S1: Isothermal titration calorimetry of 1 for RXR α .

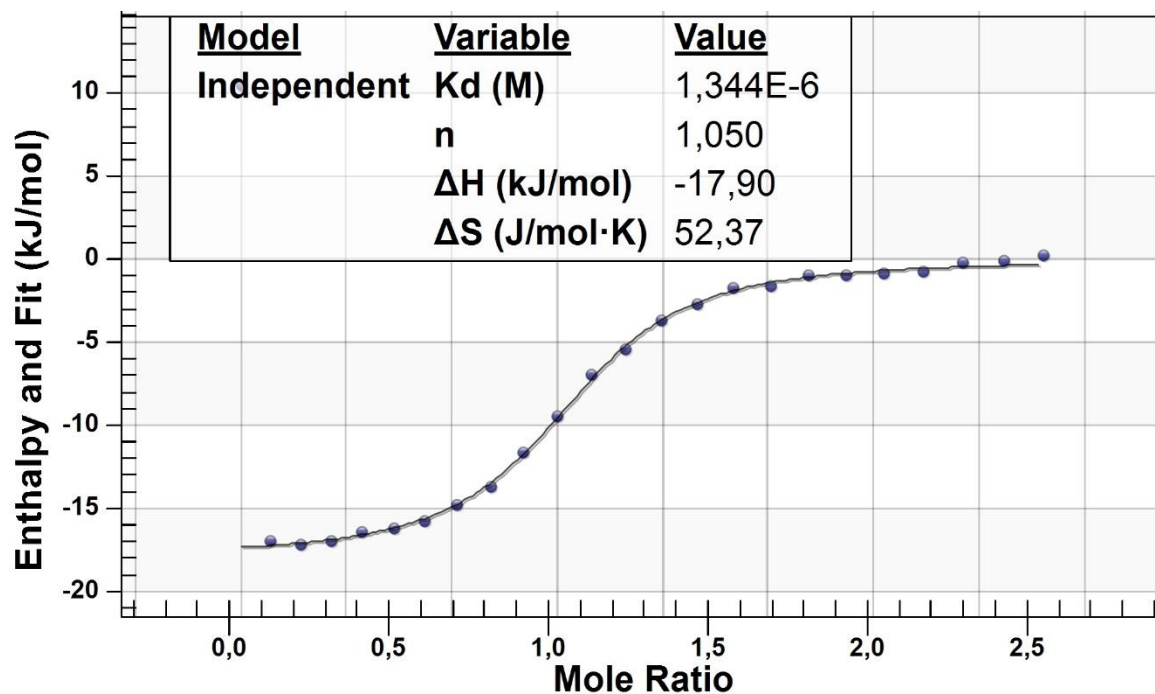


Figure S2: Isothermal titration calorimetry of 2 with the PPAR γ LBD.

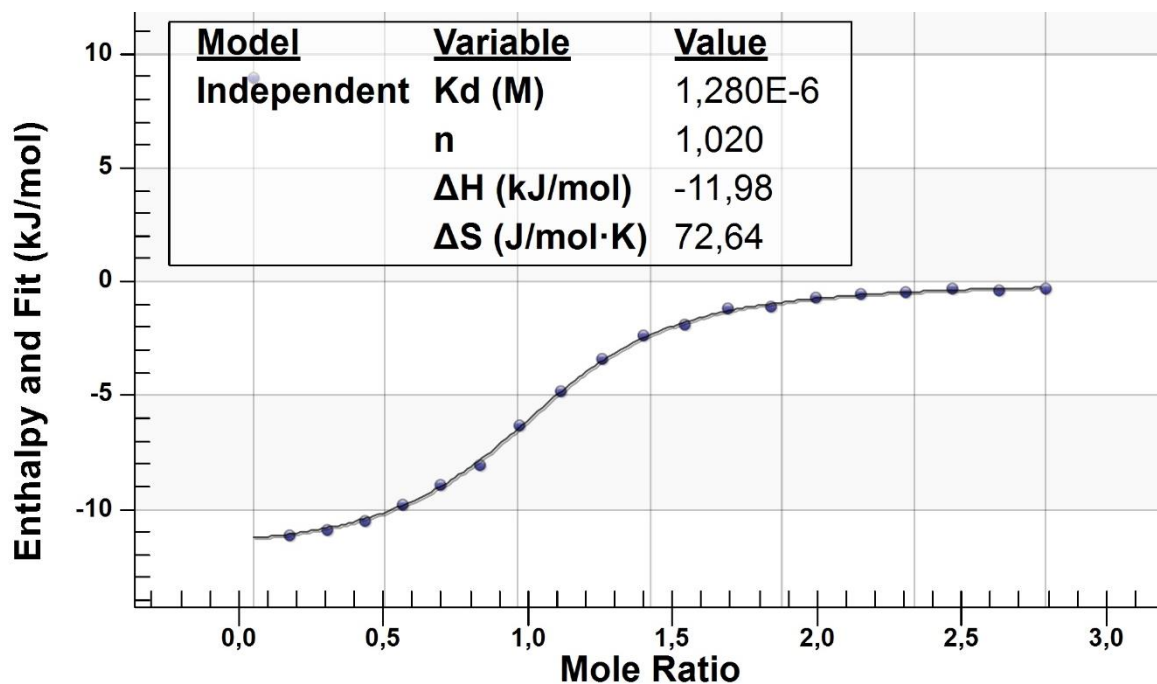


Figure S3: Isothermal titration calorimetry of 2 with the RXR α LBD.

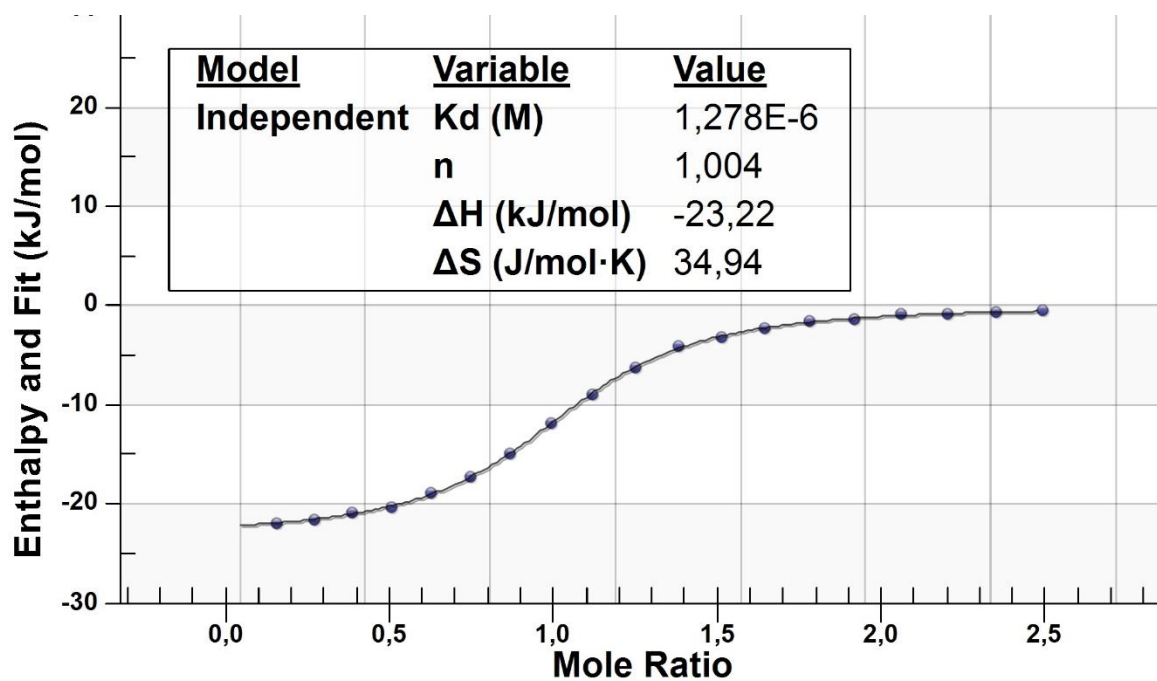


Figure S4: Isothermal titration calorimetry of 7 with the PPAR γ LBD.

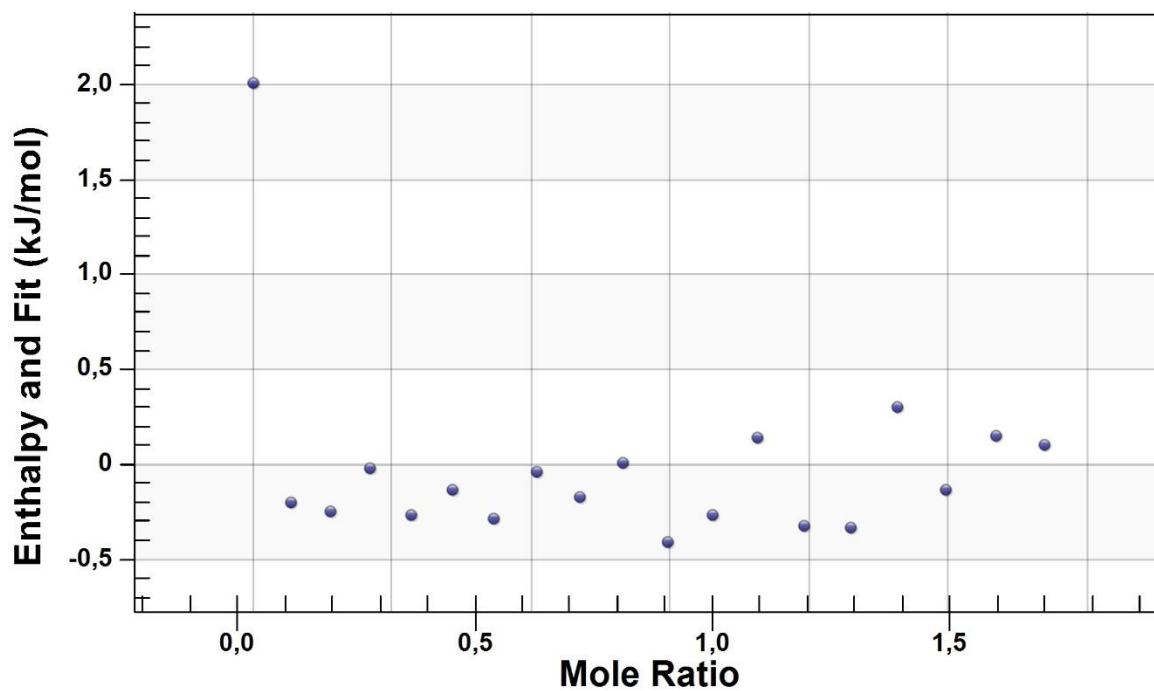


Figure S5: Isothermal titration calorimetry of **7** with the RXR α LBD.

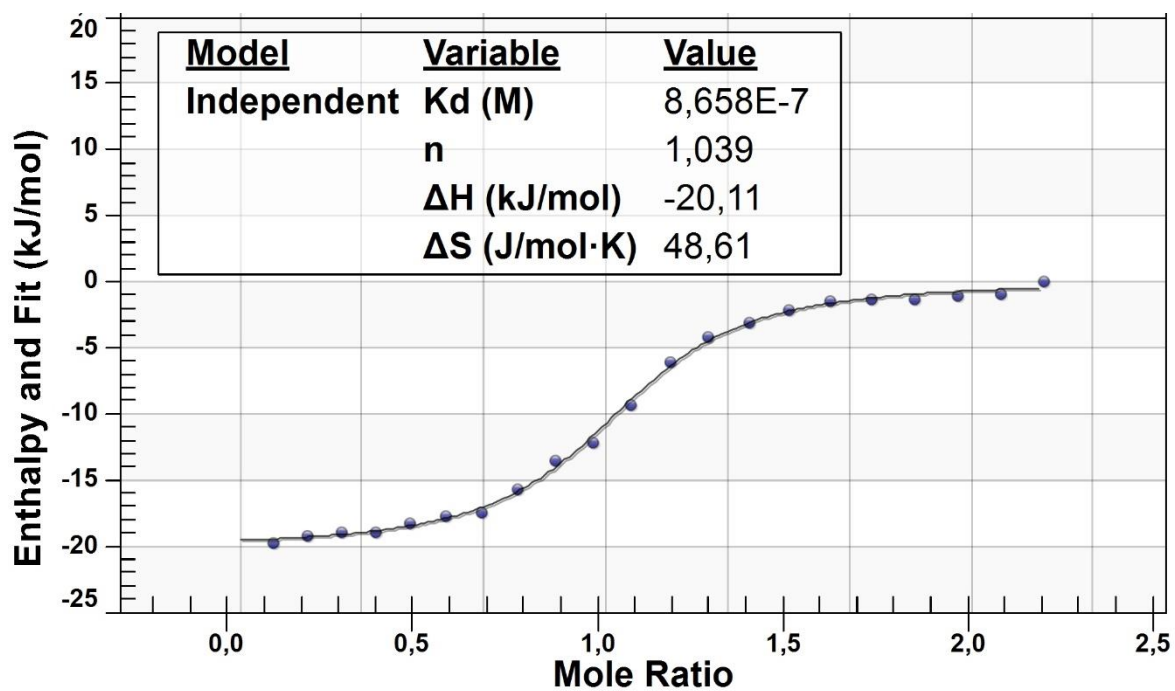


Figure S6: Isothermal titration calorimetry of **20** with the PPAR γ LBD.

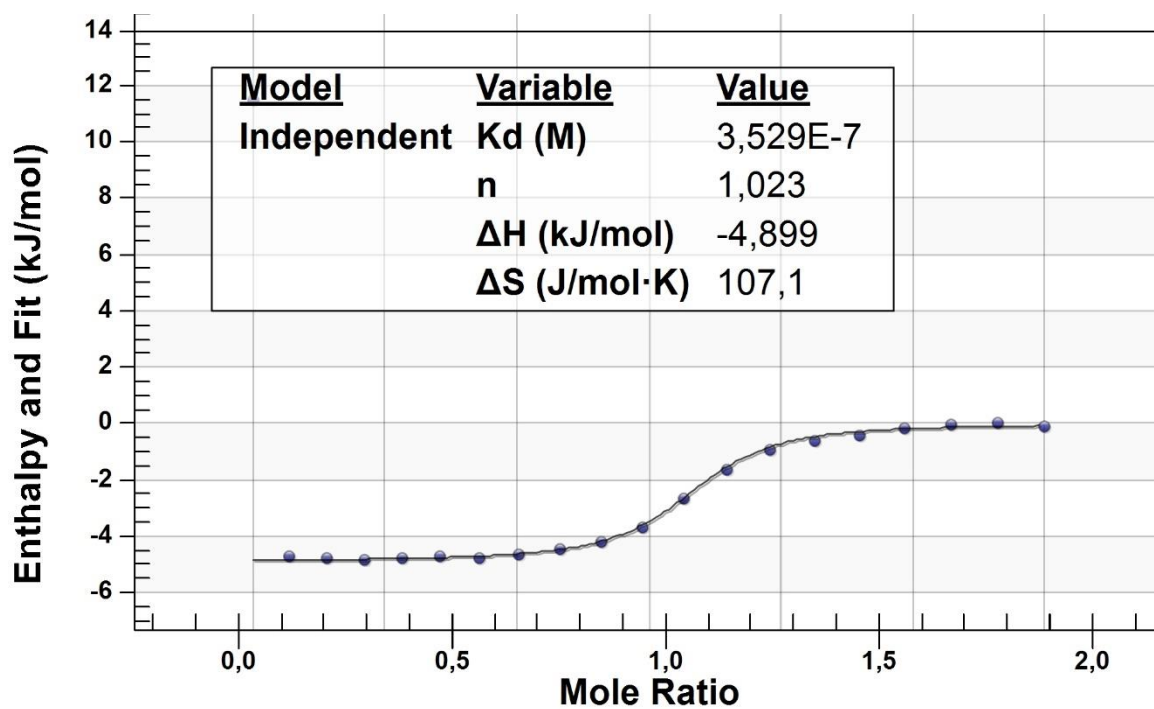


Figure S7: Isothermal titration calorimetry of **20** with the RXR α LBD.

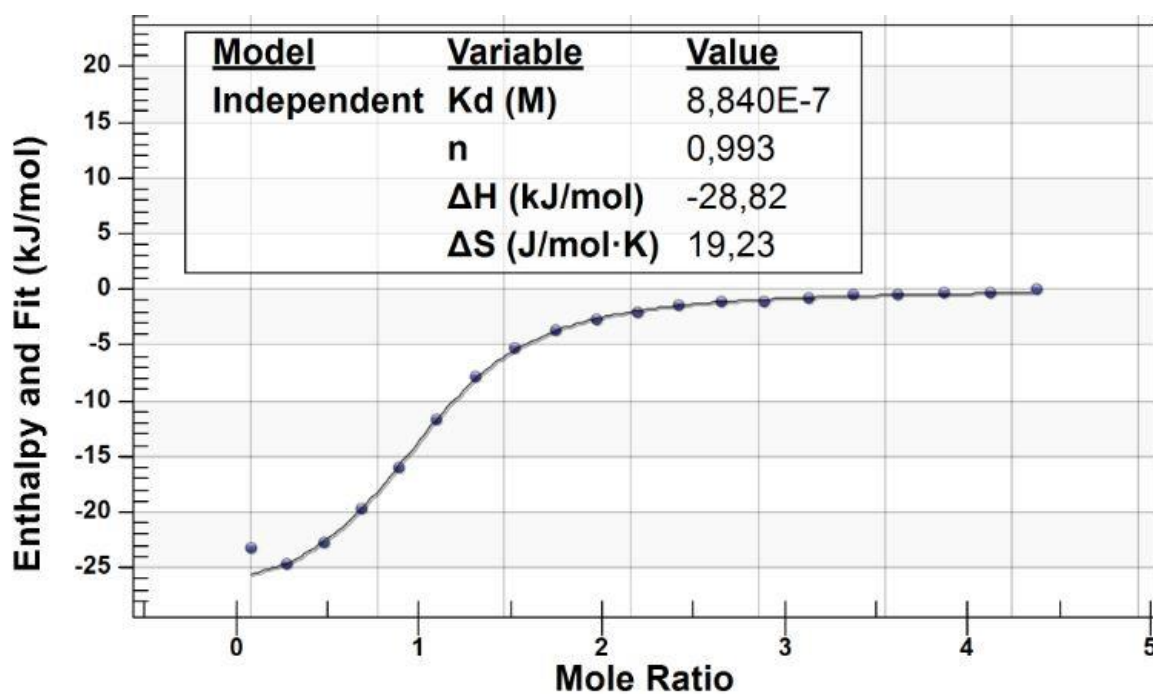


Figure S8: Isothermal titration calorimetry of **27** for RXR α .

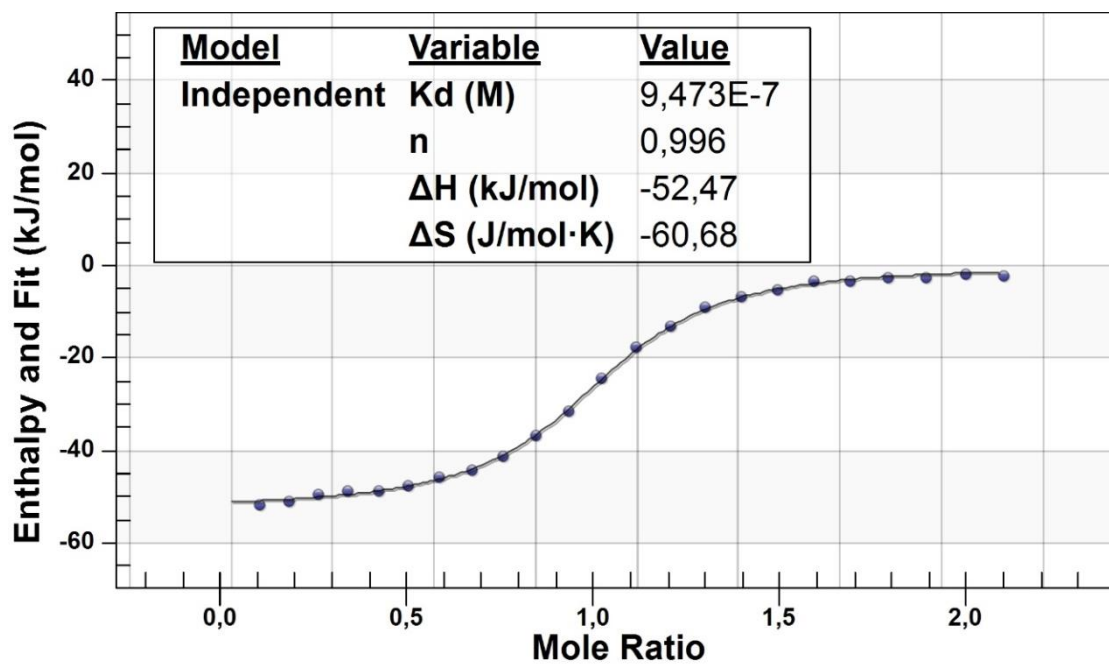


Figure S9: Isothermal titration calorimetry of **28** with the PPAR γ LBD.

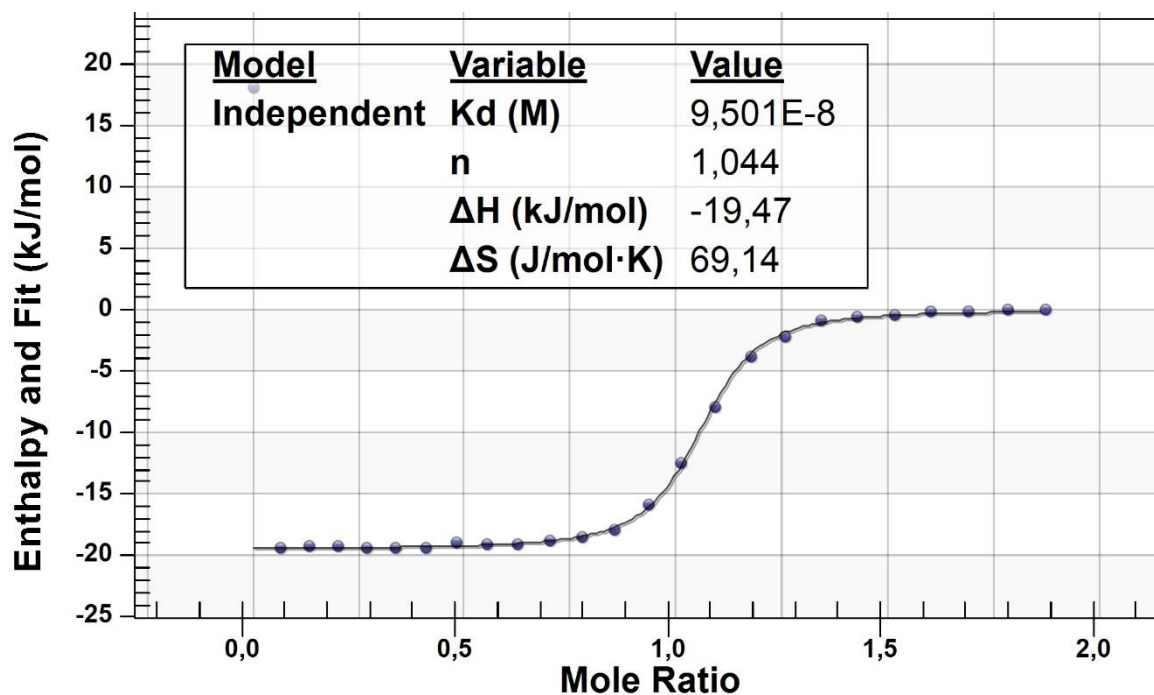


Figure S10: Isothermal titration calorimetry of **28** with the RXR α LBD.

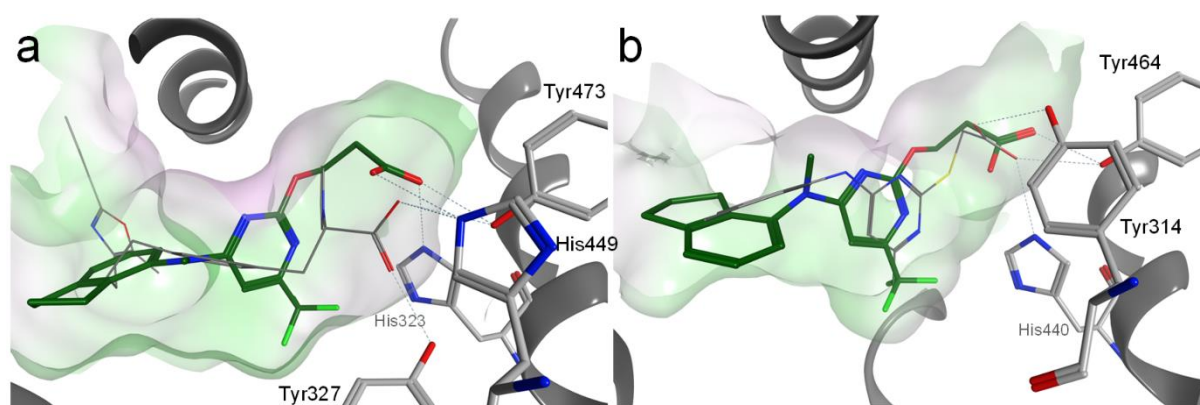


Figure S11: Molecular docking of **28** in PPAR γ (a, PDB-ID: 2Q8S¹) and PPAR α (b, PDB-ID: 4BCR²) indicate that the bulkiness of combining N-methyl group and trifluoromethyl moiety together with the resulting dihedral angle between pyrimidine core and indane substituent prevent the formation of a binding mode that allows a participation of the carboxylic acid in the canonical H-bond network with the activation triad His323/Tyr327/His449 (PPAR γ) or Tyr314/His440/Tyr464 (PPAR α) which illustrates why **28** fails to activate PPARs.

Table S1: *In vitro* selectivity profiles of **2**, **7**, **20** and **28** at 30 μ M on related nuclear receptors. Relative activation refers to the respective reference agonist at 1 μ M each: T0901317 (LXRs), tretinoin (RARs), CITCO (CAR), GW4064 (FXR) and calcitriol (VDR). Results are mean \pm SD, n=3. Inactive - no statistically significant activation at 30 μ M or relative activation at 30 μ M < 5%.

	LXR α	LXR β	RAR α	RAR β	RAR γ	CAR	FXR	VDR
2	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	>30 μ M	inactive	inactive
7	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	>30 μ M	inactive	inactive
20	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	24.0\pm1.1 11.3 \pm 0.4%	inactive	>30 μ M
28	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive

2 Chemistry

2.1 General

All chemicals and solvents were of reagent grade and used without further purification unless otherwise specified. All reactions were conducted in oven-dried glassware under argon atmosphere and in absolute solvents. NMR spectra were recorded on a Bruker AV 400, Bruker AV 300, Bruker am250xp or a Bruker AV 500 spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to TMS as reference; approximate coupling constants (J) are shown in hertz (Hz). Mass spectra were obtained on a VG Platform II (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using electrospray ionization (ESI). High resolution mass spectra were recorded on a MALDI LTQ ORBITRAP XL instrument (Thermo Fisher Scientific). Microwave irradiation was performed on a CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System, Discover- SP W/Activent. Melting points were determined on a Büchi M-560 (Büchi Labortechnik, Flawil, Switzerland). Compound purity was analyzed on a Waters 600 Contoller HPLC using a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and Waters 717 plus Autosampler or Hitachi Chromaster with a 5160 pump system, using a DAD 5430 and 5260 Autosampler both equipped with a MultoHigh100 RP18-5 μ 250x4 mm column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) using a gradient (H₂O+0.1% formic acid/MeOH 80:20 isocratic for 5 min to MeOH after additional 45 min and MeOH for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm (method A) or using a gradient (H₂O+0.1% formic acid/MeOH 60:40 isocratic for 5 min to MeOH after additional 25 min and MeOH for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm (method B).

Compounds **2-8**, **10**, **19**, **21**, **22** were published previously^{3,4} and have been tested for purity by elemental analysis by the Microanalytical Laboratory of the Institute of Organic Chemistry and Chemical Biology, University of Frankfurt, on a Foss Heraeus CHN–O–rapid elemental analyzer (Heraeus, Hanau, Germany). Their integrity was rechecked by NMR spectroscopy. All new final compounds (**9**, **11-18**, **20**, **23-28**) for biological evaluation had a purity of >95% according to HPLC–UV analysis at wavelengths 245 and 280 nm.

2.2 Synthesis and analytical characterization of 9, 11-18, 20, 23-28 and their precursors

2-(4-((2,3-Dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (9)

Ethyl 2-((4-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**39**, 0.20 g, 0.66 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (8.0 mL) and EtOH (1.5 mL). LiOH (0.14 g, 3.3 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (2.0 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to the solution and the mixture was extracted with EtOAc (3x 30 mL). The solvent was evaporated in vacuum to obtain **9** as a yellow solid (140 mg, 77%). M.p.: 225.1 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.62 (s, 1H), 8.10 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 7.13 (s, 3H), 6.57 (s, 1H), 3.87 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.08 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.23, 165.59, 160.73, 147.72, 137.78, 134.79, 132.18, 128.39, 125.82, 123.77, 101.75, 32.51, 20.11, 14.13. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 290.09577 for C₁₄H₁₆N₃O₂S found 290.09564 ([M+H]⁺). HPLC (method A): RT 23.102 min.

2-((4-((2,3-Dimethylphenyl)amino)-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (11)

Ethyl 2-((4-((2,3-dimethylphenyl)amino)-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**40**, 0.22 g, 0.66 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (8.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (0.14 g, 3.3 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **11**, which was filtrated and isolated. Further purification was performed by recrystallization from acetone/water to obtain **11** as a colorless solid (30 mg, 15%). M.p.: decomposition at 209 °C. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 10.46 (s, 1H), 7.17 - 7.07 (m, 3H), 6.34 (s, 1H), 3.89 (s, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.06 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 169.18, 165.16, 160.99, 156.48, 137.82, 134.76, 132.36, 128.49, 125.88, 123.94, 100.05, 32.47, 30.72, 20.09, 14.07. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 304.11142 for C₁₅H₁₈N₃O₂S, found 304.11167 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 14.693 min.

2-((4-((2,3-Dimethylphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (12)

Ethyl 2-((4-((2,3-dimethylphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl) acetate (**38**, 60 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (6.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (40 mg, 0.75 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **12**, which was filtrated and isolated as brown solid (30 mg, 56%). M.p.: 140 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.30 - 7.10 (m, 3H), 6.60 (s, 1H), 3.93 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.18 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.35, 170.12, 163.35, 154.67, 145.91, 139.02, 136.26, 129.33, 126.88, 124.97, 121.71, 98.57, 33.36, 20.49, 14.32. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 358.08316 for C₁₅H₁₅N₃O₂SF₃, found 358.08357 ([M+H]⁺). HPLC (method A): RT 31.749 min.

2-((4-Chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)acetic acid (13)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)acetate (**65**, 65 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (6.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (40 mg, 1.0 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The

mixture was stirred for 16 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **13**, which was filtrated and isolated as a colorless solid (55 mg, 94%). M.p.: 193.5 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 11.28 (s, 1H), 8.54 (s, 1H), 7.23 - 7.10 (m, 3H), 6.11 (s, 1H), 4.82 (s, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.16 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 169.81, 165.78, 165.19, 160.91, 138.95, 136.83, 133.78, 129.13, 126.88, 125.24, 97.71, 63.64, 20.50, 14.25. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 308.07965 for C₁₄H₁₅N₃O₃Cl, found 308.08055 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 29.511 min.

3-((4-Chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoic acid (14)

Ethyl 3-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (**73**, 0.2 g, 0.57 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (8 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (0.12 g, 2.8 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 ml) and added to the solution. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x 10 mL) Combined organic layers were dried over MgSO₄, and the solvent was removed in vacuum. The obtained oil was further purified by HPLC to obtain **14** as a colorless solid (20 mg, 11%). M.p.: 179.5 °C. ¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.15 - 7.09 (m, 3H), 5.98 (s, 1H), 4.52 - 4.45 (m, 2H), 2.72 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.15 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 174.62, 166.38, 165.79, 161.20, 139.50, 137.06, 134.47, 129.69, 127.19, 125.71, 97.23, 64.40, 34.65, 20.51, 14.27. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 322.09530 for C₁₅H₁₇N₃O₃Cl, found 322.09467 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 28.137 min.

3-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoic acid (15)

Ethyl 3-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoate (**61**, 0.19 g, 0.54 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (6.0 mL) and EtOH (1.0 mL). LiOH (0.11 g, 2.7 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x 10 mL) Combined organic layers were dried over MgSO₄, and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (65:33:2) as mobile phase to obtain **15** as a colorless solid (120 mg, 65%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 65:33:2) = 0.17. M.p.: 216.5 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.59 (s, 1H), 7.23 - 7.09 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 3.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.17 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 173.23, 172.26, 163.96, 159.87, 139.04, 136.73, 133.98, 129.27, 126.93, 125.34, 98.92, 34.50, 26.51, 20.50, 14.30. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 338.07245 for C₁₅H₁₇N₃O₂SCl, found 338.07269 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 25.067 min.

2-((4-Chloro-6-(phenylamino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (16)

Ethyl 2-((4-chloro-6-(phenylamino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**50**, 200 mg, 0.62 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (8 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (0.13 g, 3.0 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 15 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **16**, which was filtrated and isolated as a pale yellow solid (100 mg, 56%). M.p.: 174.4 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 11.19 (s, 1H), 9.02 (s, 1H), 7.60 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.00 (s, 2H).

^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 171.70, 170.11, 162.20, 159.39, 139.50, 129.88, 124.92, 122.19, 101.26, 33.54. HRMS (MALDI): m/z calculated 296.02550 for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_1$, found 296.02573 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). HPLC (method A): RT 29.784 min.

2-((4-Chloro-6-((2-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (17)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**51**, 100 mg, 0.29 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (5 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (60 mg, 1.5 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **17**, which was filtrated and isolated as a yellow solid (70 mg, 75%). M.p.: 152.8 °C. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 7.46 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.32 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.26 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 7.20 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 6.27 (s, 1H), 3.93 (s, 2H), 2.28 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 171.45, 170.06, 163.37, 159.77, 136.73, 134.50, 131.83, 127.59, 127.47, 126.96, 99.62, 33.38, 18.05. HRMS (MALDI): m/z calculated 310.04115 for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_1$, found 310.04121 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). HPLC (method A): RT 30.472 min.

2-((4-Chloro-6-((3-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (18)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((3-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**52**, 0.16 g, 0.47 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (7 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (100 mg, 2.3 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added to precipitate **18**, which was filtrated and isolated as a yellow solid (140 mg, 98%). M.p.: 165.2 °C. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 7.46 (s, 1H), 7.41 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H), 4.02 (s, 2H), 2.34 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 171.58, 170.13, 162.12, 159.29, 139.62, 139.37, 129.75, 125.64, 122.60, 119.21, 101.20, 33.49, 21.48. HRMS (MALDI): m/z calculated 310.04115 for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}_1$, found 310.04133 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). HPLC (method A): RT 31.617 min.

2-((4-Chloro-6-((5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (20)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**53**, 100 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (6 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (60 mg, 1.3 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 17 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added and filtrated. The obtained solid was washed with 1 ml acetone to obtain **20** as colorless solid (70 mg, 77%). M.p.: decomposition at 205 °C. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): δ = 8.46 (s, 1H), 7.23 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.15 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 3.93 (s, 2H), 2.79 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 2.67 (t, J = 5.5 Hz, 2H), 1.80 - 1.72 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): δ = 171.38, 170.19, 163.61, 159.73, 139.55, 136.43, 133.82, 128.54, 126.70, 124.45, 99.39, 33.45, 30.27, 25.47, 23.52, 23.40. HRMS (MALDI): m/z calculated 350.07245 for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2\text{ClS}$, found 350.07266 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). HPLC (method B): RT 32.501 min.

2-((4-Chloro-6-((7-chloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (23)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((7-chloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**54**, 0.1 g, 0.26 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (6 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (50 mg, 1.3 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 18 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added. The mixture was extracted with EtOAc (3x 10 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄, and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (75:23:2) as mobile phase to obtain **23** as a colorless solid (85 mg, 89%). *R_f* (hexane/EtOAc/HOAc = 75:23:2) = 0.28. M.p.: decomposition at 199 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.57 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.46 (s, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.00 - 2.94 (m, 4H), 2.14 - 2.08 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 171.55, 170.15, 162.51, 159.60, 144.22, 140.56, 133.86, 127.73, 127.36, 124.30, 100.70, 33.50, 33.26, 32.26, 24.76. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 370.01783 for C₁₅H₁₄N₃O₂Cl₂S, found 370.01892 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 30.010 min.

2-((4-Chloro-6-(2,3-dimethylphenoxy)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (24)

Ethyl 2-((4-chloro-6-(2,3-dimethylphenoxy)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**57**, 60 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq) was dissolved in a mixture of THF (5 mL) and EtOH (1 mL). LiOH (30 mg, 0.75 mmol, 5.0 eq) was dissolved in water (1.5 mL) and added to the solution. The mixture was stirred for 21 h at room temperature. The organic solvents were removed in vacuum and 2 N HCl (5 mL) was added. The obtained oil was further purified by HPLC to obtain **24** as a colorless solid (20 mg, 42%). M.p.: 138.7 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.18 - 7.11 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.76 (s, 1H), 3.82 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.04 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.40, 170.79, 169.49, 162.09, 151.37, 139.84, 129.73, 128.49, 127.33, 120.08, 103.24, 33.52, 20.02, 12.47. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 325.04082 for C₁₄H₁₄N₂O₃ClS, found 325.04093 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 29.186 min.

2-((4-Chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)(methyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (25)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**49**, 0.3 g, 0.85 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 10 mL). Solid NaOH (85 mg, 2.1 mmol, 2.5 eq) was added and the mixture was stirred for 10 min at 40 °C. DMS (0.1 mL, 1.0 mmol, 1.2 eq) was added dropwise via syringe. After 3 h at 40 °C, water (10 mL) was added and the reaction was stirred at 40 °C for 12 h. 20 mL of 2 N HCl were added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 30 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (75:23:2) as mobile phase to obtain **25** as colorless solid (150 mg, 52%). *R_f* (hexane/EtOAc/HOAc = 75:23:2) = 0.4. M.p.: 177.9 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.28 - 7.22 (m, 2H), 7.10 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 3.99 (s, 2H), 3.40 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 1.96 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 171.26, 170.49, 163.44, 159.13, 142.35, 140.24, 135.21, 130.87, 128.34, 126.06, 98.99, 37.77, 33.78, 20.38, 13.78. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 338.07245 for C₁₅H₁₇N₃O₂SCl, found 338.07294 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 32.806 min.

(((2,3-Dimethylphenyl)(propan-2-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetic acid (26)

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**49**, 0.3 g, 0.85 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 10 mL). Solid NaOH (0.1 g, 2.5 mmol, 3.0 eq) was added and the mixture was stirred for 10 min at 40 °C. DIPS (0.17 mL, 1.0 mmol, 1.2 eq) was added dropwise via syringe. After 19 h at 40 °C, water (10 mL) was added and the reaction was stirred at 40 °C for 6 h. 20 mL of 2 N HCl were added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 30 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (65:33:2) as mobile phase to obtain **26** as colorless solid (40 mg, 13%). *R_f* (hexane/EtOAc/HOAc = 65:33:2) = 0.27. M.p.: 150.6 °C. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.32 - 7.24 (m, 2H), 7.03 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.24 - 5.12 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 2.35 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.30 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 171.05, 170.39, 163.23, 159.25, 140.19, 137.71, 137.10, 131.03, 128.16, 127.82, 99.72, 49.49, 33.77, 21.90, 20.55, 19.76, 14.98. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 336.10375 for C₁₇H₂₁N₃O₂SCl, found 336.10469 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 35.276 min.

3-((4-((2,3-Dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoic acid (27)

Ethyl 3-((4-((2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (**74**, 75 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq) was dissolved in trifluoroacetic acid (5 mL) and stirred for 30 min at room temperature. Water (5 mL) was added to the mixture and stirred for 24 h at room temperature. The reaction mixture was extracted three times with EtOAc (3x 15 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by HPLC to obtain **27** as a colorless solid (15 mg, 21%). M.p.: 163.1 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.62 (s, 1H), 7.23 - 7.08 (m, 3H), 6.54 (s, 1H), 4.67 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.98 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.84 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 2.14 - 2.07 (m, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 175.76, 164.45, 163.85, 156.76, 147.09, 139.25, 132.60, 127.76, 123.30, 121.79, 120.46, 95.48, 63.77, 34.29, 33.36, 30.67, 25.07. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 368.12165 for C₁₇H₁₇F₃N₃O₃, found 368.12196 ([M+H]⁺). HPLC (method B): RT 25.140 min.

3-((4-((2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)(methyl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoic acid (28)

Ethyl 3-((4-((2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)(methyl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (**75**, 0.12 g, 0.19 mmol, 1.0 eq) was dissolved in trifluoroacetic acid (5 mL) and stirred for 30 min at room temperature. Water (5 mL) was added to the mixture and stirred for 24 h at room temperature. The reaction mixture was extracted three times with EtOAc (3x 15 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (75:23:2) as mobile phase to obtain **28** as pale yellow solid (60 mg, 63%). *R_f* (hexane/EtOAc/HOAc = 75:23:2) = 0.29. M.p.: 107.9 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.29 - 7.24 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 4.68 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.03 - 2.97 (m, 2H), 2.92 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.77 - 2.71 (m, 1H), 2.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.09 (p, *J* = 7.5 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.38, 166.38, 165.28, 155.56, 148.19, 142.32, 139.97, 129.37, 125.55, 125.42, 121.88, 95.76, 63.94, 37.48, 34.19, 33.65,

31.08, 25.63. HRMS (MALDI): m/z calculated 382.13730 for $C_{18}H_{19}F_3N_3O_3$, found 382.13654 ($[M+H]^+$). HPLC (method B): RT 26.127 min.

Ethyl 2-((4-hydroxypyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (29)

2-Thiouracil (**32**, 0.77 g, 6.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 9 mL) and ethyl bromoacetate (**35**, 0.80 mL, 7.2 mmol, 1.2 eq) was added dropwise to the solution. The mixture was stirred for 3 h at 90 °C. Then, 20 mL water were added and the solution was extracted six times with EtOAc (6x 30 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 50 mL of hydrochloric acid (2N) and 50 mL of saturated $NaHCO_3$ solution, dried over $MgSO_4$, and the solvents were evaporated in vacuum to obtain **29** as a pale yellow solid (0.61 g, 48%). 1H NMR (250 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 7.86 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 6.14 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.00 (s, 2H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 168.38, 163.46, 162.58, 154.06, 109.45, 61.16, 32.33, 14.05. MS (ESI+): m/z 215.11 ($[M+H]^+$).

Ethyl 2-((4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (30)

6-Methyl-2-thiouracil (**33**, 0.99 g, 7.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 11 mL). Ethyl bromoacetate (**35**, 0.9 mL, 8.4 mmol, 1.2 eq) was added dropwise via syringe and the solution was stirred for 3 h at 90 °C. Water (30 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 30 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 20 mL of hydrochloric acid (2 N) and 20 mL of saturated $NaHCO_3$ solution, dried over $MgSO_4$, and the solvents were evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (50:48:2) as mobile phase to obtain **30** as a colorless solid (0.46 g, 29%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 50:48:2) = 0.63. 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 12.47 (s, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.96 (s, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 168.53, 164.40, 162.38, 161.64, 106.59, 61.06, 32.39, 23.19, 14.10. MS (ESI-): m/z 227.17 ($[M-H]^-$).

Ethyl 2-((4-hydroxy-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (31)

2-Mercapto-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-ol (**34**, 0.6 g, 3.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 30 mL). TEA (0.45 mL, 3.4 mmol, 1.1 eq) was added and the reaction mixture was stirred with external cooling. Ethyl bromoacetate (**35**, 0.4 mL, 3.4 mmol, 1.1 eq) was added dropwise via syringe. The reaction was stirred for 5 min. 2 N HCl (20 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 50 mL). The combined organic layers were dried over $MgSO_4$ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (65:33:2) as mobile phase to obtain **31** as a colorless solid (0.46 g, 54%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 65:33:2) = 0.43. 1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ = 11.90 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 4.16 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ = 168.50, 165.65, 162.83, 152.78, 121.41, 108.74, 62.22, 33.60, 14.34. MS (ESI-): m/z 281.08 ($[M-H]^-$).

Ethyl 2-((4-chloro-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (36)

Ethyl 2-((4-hydroxy-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**31**, 0.42 g, 1.5 mmol, 1.0 eq) was dissolved in $POCl_3$ (3.0 mL, 32.4 mmol, 18.0 eq). DEA (0.5 mL, 4.1 mmol, 3.0 eq) was added dropwise via syringe. The mixture was stirred for 3.5 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the reaction was carefully added to 100 mL of a mixture of ice and water.

This mixture was extracted three times with EtOAc (3x 100 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 50 mL of HCl (2 N) and 50 mL of saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄, and the solvents were evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (8:1) as mobile phase to obtain **36** as a yellow oil (0.28 g, 67%). R_f (hexane/EtOAc = 8:1) = 0.56. ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.77 (s, 1H), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.07 (s, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 174.27, 168.63, 163.96, 157.18, 120.84, 114.59, 62.17, 34.28, 14.42. MS (ESI⁺): *m/z* 226.93 ([M-C₃H₅O₂]⁺).

Ethyl 2-((4-((2,3-dimethylphenyl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (38)

Ethyl 2-((4-chloro-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**36**, 0.25 g, 0.83 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (1.0 mL) and TEA (0.2 mL, 1.25 mmol, 1.5 eq). 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.25 mL, 2.5 mmol, 3.0 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (6:1) as mobile phase to obtain **38** as a brown oil (60 mg, 19%). R_f (hexane/EtOAc = 6:1) = 0.21. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.81 (s, 1H), 7.31 - 7.09 (m, 3H), 6.57 (s, 1H), 4.10 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.36, 169.38, 163.44, 139.02, 136.42, 129.36, 126.89, 125.08, 123.60, 119.97, 116.34, 97.97, 61.80, 33.65, 20.50, 14.40, 14.32. MS (ESI⁻): *m/z* 384.13 ([M-H]⁻).

Ethyl 2-((4-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (39)

Ethyl 2-((4-hydroxypyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**29**, 0.5 g, 2.33 mmol, 1.0 eq) was dissolved in POCl₃ (4 mL, 42.0 mmol, 18.0 eq) and DEA (0.4 mL, 2.33 mmol, 1.0 eq). 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.85 mL, 7.0 mmol, 3.0 eq) was added dropwise via a syringe. The mixture was stirred for 4 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the reaction was carefully added to 100 mL of a mixture of ice and water. The solution was extracted with EtOAc (6x 100 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 20 mL of hydrochloric acid (2 N) and 20 mL of saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄, and the solvents were evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/TEA (65:33:2) as mobile phase to obtain **39** as a brown oil (260 mg, 36%). R_f (hexane/EtOAc/TEA = 65:33:2) = 0.36. ¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.21 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.15 - 7.07 (m, 2H), 6.16 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, acetone-*d*₆): δ = 170.30, 169.82, 162.61, 156.60, 138.76, 137.20, 133.54, 128.68, 126.70, 124.99, 101.34, 61.60, 33.38, 20.53, 14.46, 14.31. MS (ESI⁺): *m/z* 318.12. ([M+H]⁺).

Ethyl 2-((4-((2,3-dimethylphenyl)amino)-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (40)

Ethyl 2-((4-hydroxy-6-methylpyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**30**, 0.4 g, 1.75 mmol, 1.0 eq) was dissolved in POCl₃ (3 mL, 31.5 mmol, 18.0 eq) and DEA (0.3 mL, 1.75 mmol, 1.0 eq). 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.65 mL, 5.3 mmol, 3.0 eq) was added dropwise via syringe. The mixture

was stirred for 4 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the reaction was carefully added to 100 mL of a mixture of ice and water. The solution was extracted with EtOAc (6x 100 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 20 mL of HCl (2 N) and 20 mL of saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄, and the solvents were evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/TEA (65:33:2) as mobile phase to obtain **40** as an orange oil (0.25 g, 73%). R_f (hexane/EtOAc/TEA = 65:33:2) = 0.43. ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.02 (s, 1H), 7.19 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.11 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H), 6.01 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.88 (s, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.15 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 169.95, 169.82, 166.57, 163.23, 138.76, 137.48, 133.62, 128.60, 126.72, 125.12, 99.44, 61.56, 33.46, 23.82, 20.54, 14.52, 14.31. MS (ESI+): *m/z* 332.16 ([M+H]⁺).

Ethyl 2-((4,6-dihydroxypyrimidin-2-yl)sulfanyl) (41)

4,6-Dihydroxy-2-mercaptopyrimidine (**42**, 2.5 g, 17.25 mmol, 1.0 eq) was suspended in EtOH (19 mL). NaOH (0.76 g, 19 mmol, 1.1 eq) was dissolved in water (19 mL) and added to the mixture. Ethyl bromoacetate (**35**, 2.3 mL, 20.8 mmol, 1.2 eq) was added dropwise via syringe. The mixture was stirred at 60 °C for 3.5 h. The reaction mixture was then cooled to -8 °C overnight and the precipitate was isolated and washed twice with water and diethylether. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (33:65:2) as mobile phase to obtain **41** as colorless solid (1.3 g, 34%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 33:65:2) = 0.38. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.78 (s, 2H), 5.21 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.01 (s, 2H), 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.99, 168.36, 167.72, 85.56, 61.12, 32.03, 13.98. MS (ESI+): *m/z* 321.04 ([M+H]⁺).

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (43)

Ethyl 2-((4,6-dihydroxypyrimidin-2-yl)sulfanyl) (**41**, 1.0 g, 4.3 mmol, 1.0 eq) was dissolved in POCl₃ (7.5 mL, 78.2 mmol, 18.0 eq). DEA (0.7 mL, 4.3 mmol, 1.0 eq) was added dropwise via syringe. The mixture was stirred for 5 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the reaction was carefully added to 100 mL of a mixture of ice and water. The mixture was extracted three times with EtOAc (3x 100 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 50 mL of HCl (2 N) and 50 mL of saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄, and the solvents were evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **43** as a colourless solid (0.9 g, 78%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.68. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.74 (s, 1H), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.05 (s, 2H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 171.52, 168.02, 160.96, 117.01, 61.17, 33.31, 14.03. MS (ESI+): *m/z* 193.06 ([M-C₃H₅O₂]⁺).

7-Chloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-4-amine (48)

4-Aminoindane (**55**, 1.5 g, 11.26 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 5 mL). NCS (1.5 g, 11.26 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 10 mL) and added dropwise over 30 min via syringe. The reaction mixture was stirred at room temperature for 23 h. Water (60 mL) was added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 60 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (5:1) as mobile phase to obtain **48** as a purple solid (0.6 g,

32%). R_f (hexane/EtOAc = 5:1) = 0.32. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6): δ = 6.88 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 4.36 (s, 2H), 2.87 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.09 - 2.00 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, acetone- d_6): δ = 143.66, 142.84, 130.38, 127.46, 127.40, 114.42, 33.15, 30.97, 24.46. MS (ESI+): m/z 168.04 ([M+H] $^+$).

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (49)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**38**, 0.6 g, 2.25 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (3.0 mL) and TEA (0.4 mL, 2.7 mmol, 1.2 eq). 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.3 mL, 2.7 mmol, 1.2 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **49** as brown oil (0.37 g, 47%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.33. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6): δ = 8.52 (s, 1H), 7.22 - 7.11 (m, 3H), 6.13 (s, 1H), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6): δ = 171.26, 169.39, 163.80, 159.80, 139.02, 136.58, 133.87, 129.27, 126.90, 125.25, 99.19, 61.79, 33.63, 20.50, 14.48, 14.28. MS (ESI-): m/z 350.14 ([M-H] $^-$).

Ethyl 2-((4-chloro-6-(phenylamino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (50)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**43**, 0.25 g, 0.94 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (1.0 mL) and TEA (0.4 mL, 2.8 mmol, 3.0 eq). Aniline (**44**, 0.1 mL, 0.94 mmol, 1.0 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 ml of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **50** as pale yellow solid (200 mg, 68%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.37. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, acetone- d_6): δ = 8.99 (s, 1H), 7.59 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.38 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 7.14 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.98 (s, 2H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6): δ = 171.56, 169.38, 140.10, 129.85, 124.93, 122.22, 101.26, 61.89, 33.74, 14.48. MS (ESI-): m/z 332.01 ([M-H] $^-$).

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (51)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**43**, 0.25 g, 0.94 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (1.0 mL) and TEA (0.4 ml, 2.8 mmol, 3.0 eq). *o*-Toluidine (**45**, 0.1 mL, 0.94 mmol, 1.0 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **51** as colorless oil (100 mg, 32%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.34. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6): δ = 8.48 (s, 1H), 7.43 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.35 - 7.17 (m, 3H), 6.24 (s, 1H), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.22 (t, J = 7.1 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6): δ = 171.37, 169.37, 163.48, 159.79, 136.89, 134.64, 131.82, 127.56, 127.50, 127.08, 99.61, 61.81, 33.65, 18.05, 14.49. MS (ESI-): m/z 336.03 ([M-H] $^-$).

Ethyl 2-((4-chloro-6-((3-methylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (52)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**43**, 0.25 g, 0.94 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (1.0 mL) and TEA (0.4 mL, 2.8 mmol, 3.0 eq). *m*-Toluidine (**46**, 0.1 mL, 0.94 mmol, 1.0 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **52** as pale yellow oil (0.16 g, 50%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.32. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.92 (s, 1H), 7.44 - 7.33 (m, 2H), 7.25 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.99 (s, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 191.39, 171.49, 169.37, 162.22, 159.38, 139.62, 139.39, 129.68, 125.74, 122.85, 119.37, 101.16, 33.75, 21.57, 14.44. MS (ESI⁻): *m/z* 336.03 ([M-H]⁻).

Ethyl 2-((4-chloro-6-((5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-1-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (53)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**43**, 0.15 g, 0.56 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 2 mL EtOH. 5,6,7,8-Tetrahydro-1-naphthylamine (**47**, 0.06 mL, 0.67 mmol, 1.2 eq) and TEA (0.1 mL, 0.67 mmol, 1.2 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **53** as brown oil (140 mg, 64%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.5. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.32 (s, 1H), 7.22 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.15 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.90 (s, 2H), 2.79 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.81 - 1.70 (m, 4H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 171.26, 169.38, 163.57, 159.75, 139.52, 136.45, 133.82, 128.51, 126.64, 124.45, 99.35, 61.80, 33.65, 30.29, 25.48, 23.54, 23.41, 14.48. MS (ESI⁻): *m/z* 376.01 ([M-H]⁻).

Ethyl 2-((4-chloro-6-((7-chloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (54)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**43**, 0.45 g, 1.7 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 3 mL EtOH. 7-Chloro-2,3-dihydro-1*H*-inden-4-amine (**48**, 0.31 g, 1.85 mmol, 1.1 eq) and TEA (0.25 mL, 1.85 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **54** as purple oil (110 mg, 16%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.4. ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.51 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 2H), 2.99 - 2.93 (m, 4H), 2.15 - 2.08 (m, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, acetone-*d*₆): δ = 171.35, 169.35, 162.47, 159.60, 144.19, 140.60, 133.83, 127.64, 124.29, 114.46, 100.86, 61.85, 33.68, 33.27, 32.29, 24.76, 14.46. MS (ESI⁻): *m/z* 396.07 ([M-H]⁻).

Ethyl 2-((4-chloro-6-(2,3-dimethylphenoxy)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (57)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)acetate (**43**, 0.4 g, 1.5 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (3.0 mL) and TEA (0.25 mL, 1.8 mmol, 1.2 eq). 2,3-Dimethylphenol (**56**, 0.22 g, 1.8 mmol, 1.2 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 ml of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/TEA (84:14:2) as mobile phase to obtain **57** as colorless oil (60 mg, 11%). R_f (hexane/EtOAc/TEA = 84:14:2) = 0.7. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.20 - 7.11 (m, 2H), 7.01 - 6.94 (m, 2H), 4.02 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.83 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 171.43, 169.90, 167.90, 161.22, 150.50, 138.90, 128.80, 127.61, 126.42, 119.25, 102.43, 61.08, 32.87, 19.16, 13.56, 11.61. MS (ESI+): *m/z* 375.02 ([M+Na]⁺).

Ethyl 3-((4,6-dihydroxypyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoate (59)

4,6-Dihydroxy-2-mercaptopyrimidine (**42**, 2.5 g, 17.25 mmol, 1.0 eq) was suspended in EtOH (19 mL). NaOH (0.76 g, 19 mmol, 1.1 eq) was dissolved in water (19 mL) and added to the mixture. Ethyl 3-bromopropionate (**58**, 2.7 mL, 20.8 mmol, 1.2 eq) was added dropwise via syringe. The mixture was stirred at 60 °C for 3.5 h. After cooling to room temperature 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (33:65:2) as mobile phase to obtain **59** as colorless solid (1.2 g, 28%). R_f (hexane/EtOAc/HOAc = 33:65:2) = 0.75. ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆): δ = 5.37 (s, 1H), 4.12 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.07, 169.11, 163.16, 86.95, 61.15, 34.54, 26.19, 14.47. MS (ESI+): *m/z* 245.06 ([M+H]⁺).

Ethyl 3-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoate (60)

Ethyl 3-((4,6-dihydroxypyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoate (**59**, 1.0 g, 4.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in POCl₃ (6.9 ml, 73.8 mmol, 18.0 eq). DEA (0.7 mL, 4.31 mmol, 1.0 eq) was added dropwise via syringe. The mixture was stirred for 5 h at 90 °C. After cooling to room temperature, the reaction was carefully added to 100 mL of a mixture of ice and water. The mixture was extracted three times with EtOAc (3x 100 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 mL, washed with 50 mL of HCl (2 N) and 50 mL of saturated NaHCO₃ solution, dried over MgSO₄, and the solvents were evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (6:1) as mobile phase to obtain **60** as a pale yellow oil (0.65 g, 56%). R_f (hexane/EtOAc = 6:1) = 0.62. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.40 (s, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 173.98, 171.81, 162.21, 117.16, 61.06, 34.16, 26.97, 14.49. MS (ESI+): *m/z* 234.94 ([M-C₂H₅O]⁺).

Ethyl 3-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoate (61)

Ethyl 3-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)sulfanyl)propanoate (**60**, 0.4 g, 1.4 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (3.0 mL) and TEA (0.25 mL, 1.7 mmol, 1.2 eq). 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.2 mL, 1.6 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation

for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **61** as yellow oil (0.37 g, 47%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.45. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.54 (s, 1H), 7.23 - 7.10 (m, 3H), 6.15 (s, 1H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.69 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 172.13, 172.12, 163.88, 159.83, 138.97, 136.69, 133.89, 129.20, 126.86, 125.29, 99.03, 60.89, 34.84, 26.47, 20.50, 14.52, 14.31. MS (ESI+): *m/z* 388.07 ([M+Na]⁺).

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)oxy)acetate (64)

2,4,6-Trichloropyrimidine (**62**, 1.9 ml, 16.35 mmol, 1.0 eq) was dissolved in dioxane (abs., 100 mL). Sodium hydride (0.5 g, 21.26 mmol, 1.3 eq) was suspended in the solution under constant stirring and the reaction mixture was heated to 110° C. Ethyl hydroxyacetate (**63**, 2.0 mL, 21.26 mmol, 1.3 eq) was added dropwise via syringe. The reaction was stirred and heated to 110 °C for 5 h. 2 N HCl (50 mL) was added and the product was extracted with EtOAc (3x 100 mL). The combined organic layers were reduced to a volume of approx. 50 ml, dried over MgSO₄, and the solvent was evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) and a second column chromatography with hexane/DCM (1:1) as mobile phase to obtain **64** as a pale yellow oil (0.2 g, 5%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.6. R_f (hexane/DCM = 1:1) = 0.8. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 7.43 (s, 1H), 4.99 (s, 2H), 4.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 168.15, 164.73, 163.65, 115.99, 65.23, 61.78, 14.43. MS (ESI+): *m/z* 251.04 ([M+H]⁺).

Ethyl 2-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)acetate (65)

Ethyl 2-((4,6-dichloropyrimidin-2-yl)oxy)acetate (**64**, 0.2 g, 0.8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (3.0 mL) and TEA (0.35 mL, 2.4 mmol, 3.0 eq). 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.1 mL, 0.9 mmol, 1.1 eq) was added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed using column chromatography with hexane/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **65** as a brown oil (60 mg, 24%). R_f (hexane/EtOAc = 4:1) = 0.3. ¹H NMR (300 MHz, acetone-*d*₆): δ = 8.50 (s, 1H), 7.22 - 7.10 (m, 3H), 6.14 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone-*d*₆): δ = 168.94, 165.77, 165.13, 160.88, 138.92, 136.85, 133.82, 129.14, 126.82, 125.29, 97.83, 64.08, 61.34, 20.50, 14.44, 14.27. MS (ESI-): *m/z* 334.14 ([M-H]⁻).

6-Chloro-N-(2,3-dimethylphenyl)-2-(methylsulfanyl)pyrimidin-4-amine (68)

4,6-Dichloro-2-methylsulfanyl-pyrimidine (**66**, 0.6 g, 3.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 3 mL EtOH. 2,3-Dimethylaniline (**37**, 0.45 mL, 3.7 mmol, 1.2 eq) and TEA (0.5 mL, 3.7 mmol, 1.2 eq) were added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO₃ solution (20 mL), dried over MgSO₄, and

the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (7:1) as mobile phase to obtain **68** as colorless solid (0.83 g, 48%). R_f (hexane/EtOAc = 7:1) = 0.39. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 9.43 (s, 1H), 7.15 - 7.07 (m, 3H), 6.12 (s, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.07 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 171.39, 162.18, 157.90, 137.68, 135.72, 132.35, 127.85, 125.75, 124.05, 98.34, 20.12, 14.04, 13.35. MS (ESI-): m/z 278.07 ($[\text{M-H}]^-$).

***N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-2-(methylsulfanyl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-amine (69)**

4-Chloro-2-(methylsulfanyl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidine (**67** 0.5 g, 2.2 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 3 mL EtOH. 4-Indane (**55**, 0.3 mL, 2.6 mmol, 1.2 eq) and TEA (0.36 mL, 2.6 mmol, 1.2 eq) were added and the solution was stirred under microwave irradiation for 4 h at 120 °C. After cooling to room temperature, 30 mL of EtOAc were added, the mixture was washed twice with 2 N HCl (20 mL) and once with saturated NaHCO_3 solution (20 mL), dried over MgSO_4 , and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (7:1) as mobile phase to obtain **69** as colorless solid (0.27 g, 38%). R_f (hexane/EtOAc = 7:1) = 0.35. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6): δ = 8.70 (s, 1H), 7.56 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.19 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 2.97 - 2.85 (m, 4H), 2.48 (s, 3H), 2.06 (p, J = 7.4 Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6): δ = 174.13, 162.30, 154.49, 146.63, 134.86, 127.80, 123.69, 122.40, 122.10, 120.06, 98.67, 33.77, 31.33, 25.65, 13.97. MS (ESI+): m/z 326.01 ($[\text{M+H}]^+$).

6-Chloro-*N*-(2,3-dimethylphenyl)-2-methylsulfonylpyrimidin-4-amine (70)

6-Chloro-*N*-(2,3-dimethylphenyl)-2-(methylsulfanyl)pyrimidin-4-amine (**68**, 0.85 g, 3.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in HOAc (50 mL). Sodium tungstate dihydrate (0.1 g, 0.3 mmol, 0.1 eq) and hydrogen peroxide 30% (1.2 mL, 12.0 mmol, 4.0 eq) were added and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. 50 mL of water were added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 50 mL). Combined organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (2:1) as mobile phase to obtain **70** as brown solid (0.8 g, 85%). R_f (hexane/EtOAc = 2:1) = 0.18. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, acetone- d_6): δ = 9.12 (s, 1H), 7.28 - 7.14 (m, 3H), 6.55 (s, 1H), 3.23 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.19 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone- d_6): δ = 166.80, 164.77, 160.73, 139.33, 135.84, 133.88, 129.81, 127.13, 124.89, 105.17, 39.17, 20.45, 14.26. MS (ESI-): m/z 310.07 ($[\text{M-H}]^-$).

***N*-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-2-methanesulfonyl-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-amine (71)**

N-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-2-(methylsulfanyl)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-amine (**69**, 0.5 g, 1.5 mmol, 1.0 eq) was dissolved in HOAc (25 mL). Sodium tungstate dihydrate (50 mg, 0.15 mmol, 0.1 eq) and hydrogen peroxide 30% (0.6 mL, 6.0 mmol, 4.0 eq) were added and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. 25 mL of water were added and the mixture was extracted three times with EtOAc (3x 50 mL). Combined organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (3:1) as mobile phase to obtain **71** as orange solid (0.43 g, 78%). R_f (hexane/EtOAc = 3:1) = 0.29. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.70 (s, 1H), 7.31 - 7.10 (m, 3H), 6.91 (s, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.03 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.83 (t, J = 7.3 Hz, 2H),

2.15 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): $\delta = 166.61, 163.51, 155.78, 147.43, 139.43, 131.68, 128.04, 124.16, 121.89, 120.16, 102.14, 38.92, 33.29, 30.76, 25.07$. MS (ESI+): m/z 379.99 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Ethyl 3-((4-chloro-6-((2,3-dimethylphenyl)amino)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (73)

6-Chloro-*N*-(2,3-dimethylphenyl)-2-methylsulfonylpyrimidin-4-amine (**70**, 0.3 g, 1.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in THF (10 mL). Lithium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in hexane, 2.2 mL, 2.2 mmol, 2.2 eq) was added and the mixture was stirred for 10 min at room temperature. Ethyl 3-hydroxypropanoate (**72**, 0.12 mL, 1.1 mmol, 1.1 eq) was added dropwise over 30 min via syringe. The mixture was stirred for 2.5 h at room temperature. EtOAc (10 mL) was added and the reaction mixture was washed with 2N HCl (10 mL). The water phase was extracted twice with EtOAc (2x 10 mL). Combined organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (2:1) as mobile phase to obtain **73** as pale yellow solid (220 mg, 63%). R_f (hexane/EtOAc = 2:1) = 0.51. ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): $\delta = 8.55$ (s, 1H), 7.30 - 7.09 (m, 3H), 6.08 (s, 1H), 4.48 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.12 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): $\delta = 171.25, 165.81, 165.35, 160.98, 138.97, 136.88, 129.17, 126.87, 125.35, 125.30, 97.29, 63.71, 60.93, 34.46, 20.50, 14.49, 14.29$. MS (ESI+): m/z 372.07 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Ethyl 3-((4-((2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (74)

N-(2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)-2-methanesulfonyl-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-4-amine (**71**, 0.4 g, 1.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved THF (10 mL). Lithium bis(trimethylsilyl)amide (1 M in hexane, 2.4 mL, 2.4 mmol, 2.2 eq) was added and the mixture was stirred for 10 min at room temperature. Ethyl 3-hydroxypropanoate (**72**, 0.15 mL, 1.2 mmol, 1.1 eq) was added dropwise over 30 min via syringe. The mixture was stirred for 4 h at room temperature. EtOAc (10 mL) was added and the reaction mixture was washed with 2 N HCl (10 mL). The mixture was extracted twice with EtOAc (2x 10 mL). Combined organic layers were dried over MgSO_4 and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (3:1) as mobile phase to obtain **74** as pale yellow oil (0.25 g, 57%). R_f (hexane/EtOAc = 3:1) = 0.5. ^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6): $\delta = 8.65$ (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.12 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 4.51 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 4.07 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.88 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.84 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.73 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.00 (p, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, acetone- d_6): $\delta = 171.28, 166.35, 164.82, 155.93, 146.51, 134.98, 127.79, 122.92, 122.25, 121.95, 120.74, 97.67, 63.81, 60.94, 34.43, 33.73, 31.22, 25.57, 14.46$. MS (ESI+): m/z 418.05 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Ethyl 3-((4-((2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)(methyl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (75)

Ethyl 3-((4-((2,3-dihydro-1*H*-inden-4-yl)amino)-6-(trifluoromethyl)pyrimidin-2-yl)oxy)propanoate (**74**, 0.15 g, 0.38 mmol, 1.0 eq) was dissolved in abs. DMF (7 mL) and K_2CO_3 (0.32 g, 2.3 mmol, 6.1 eq) were added and stirred for 30 min at room temperature. MeI (0.1 mL, 1.6 mmol, 4.2 eq) was added dropwise. The reaction was stirred at room temperature for 24 h. After that, 10 mL 2 N HCl was added and stirred for 10 min. The mixture was extracted three

times with EtOAc (3x 15 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (5:1) as mobile phase to obtain **75** as pale yellow oil (0.12 g, 77%). R_f (hexane/EtOAc = 5:1) = 0.4. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.23 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 6.99 - 6.92 (m, 1H), 5.97 (s, 1H), 4.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 3.03 - 2.95 (m, 2H), 2.85 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.08 (p, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 171.10, 165.33, 164.46, 155.36, 147.54, 141.51, 139.11, 128.53, 124.65, 122.61, 118.97, 95.58, 62.95, 60.82, 37.44, 34.18, 33.24, 30.68, 25.04, 14.26. MS (ESI⁺): *m/z* 432.09 ([M+Na]⁺).

3 Methods for *in vitro* pharmacological characterization

3.1 Toxicity assay (water-soluble tetrazolium assay)

WST-1 assay (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz) was performed according to manufacturer's protocol. In brief, HepG2 cells were seeded in DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% FCS in 96 well plates ($3 \cdot 10^4$ cells/well). After 24 h, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 1% charcoal stripped FCS and cells were incubated with the test compounds (final concentrations 1 µM, 10 µM, 30 µM, 50 µM and 100 µM) or DMEM/0.1% DMSO as negative control. After 48 h, WST reagent (Roche Diagnostics International AG) was added to each well according to manufacturer's instructions. After 55 min. incubation, absorption (450 nm/ reference: 620 nm) was determined with a Tecan Infinite M200 (Tecan Deutschland GmbH). Each experiment was repeated at least three times in triplicates.

3.2 Determination of aqueous solubility

Aqueous solubility of compounds **1**, **2**, **7**, **20** and **28** was determined using Whatman Uniprep filters (Whatman plc, Maidstone, UK). 3 mg of each compound and 2 mL H₂O dest. were inserted into the Uniprep vessel and the mixture was shaken at 37 °C for 24 h. The mixture was then pressed through the Uniprep filter and the concentration of dissolved compound in filtrate was quantified by HPLC (Waters 600 Controller and Waters 2487 Dual Absorbance Detector equipped with a MultoHigh100 Phenyl 5 µ 240+4 mm column, CS-Chromatographie Service GmbH) using external calibration.

3.3 Determination of logP

LogP values of **1,2**, **7**, **20** and **28** were determined by HPLC analysis using a VWR Hitachi Chromaster System with DAD 5430. The HPLC column was a MultoHigh 100RP18 (4,6 mm I.D., 250 mm length, 5 µ particle size) from Chromatographie-Service GmbH (Langerwehe, Germany). A linear gradient was used with mobile phase A as 100% acetonitrile, and mobile phase B as 100% 10 mM ammonium acetate (adjusted to pH 7.4 with ammonium hydroxide and acetic acid). The gradient table was: 0 min/ 5% A, 2.0 min/ 5% A, 12.0 min/ 95% A, 20 min/ 95% A, 30 min/ 5% A, 35 min/ 5% A. Flow rate was 0.5 ml/min, and UV spectra were collected at 254 nm and 280 nm. The samples were dissolved in DMSO at 30 µM and 50 µL were injected.

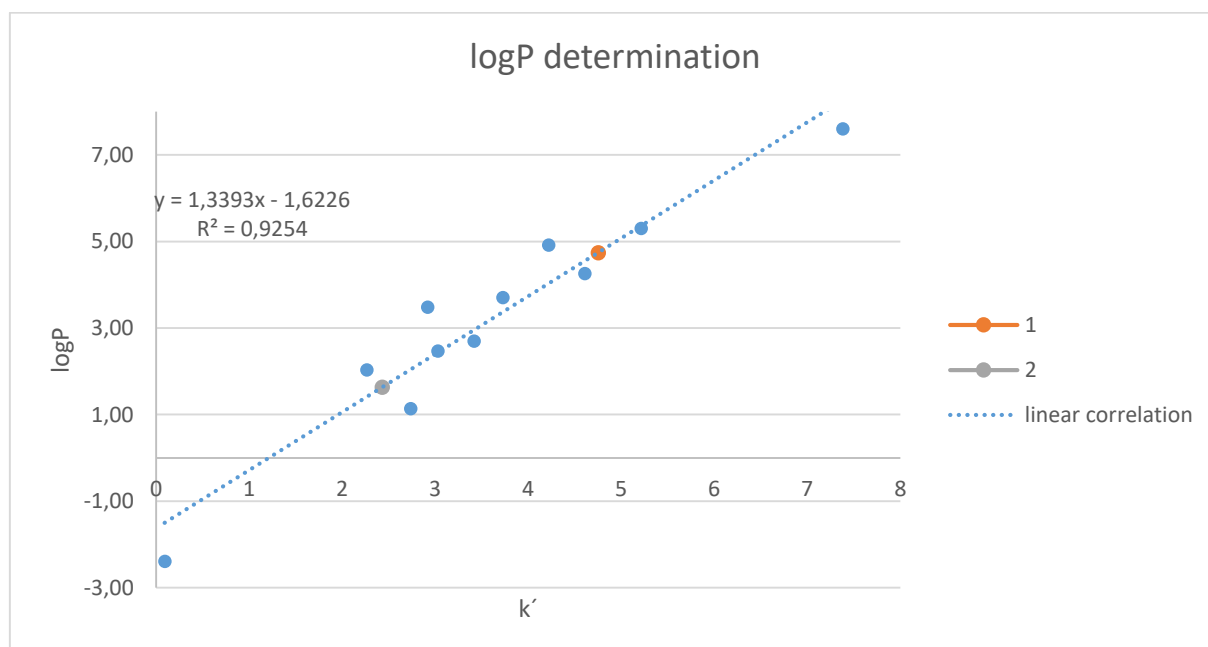
The HPLC capacity factor k' was determined according to:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

Where t_R is the retention time and t_0 the retention time of the unretained reference compound (thiourea). The logP was calibrated to k' by running 11 reference compounds (see below) and plotting k' versus literature logP values.⁵ All determinations were performed three times.

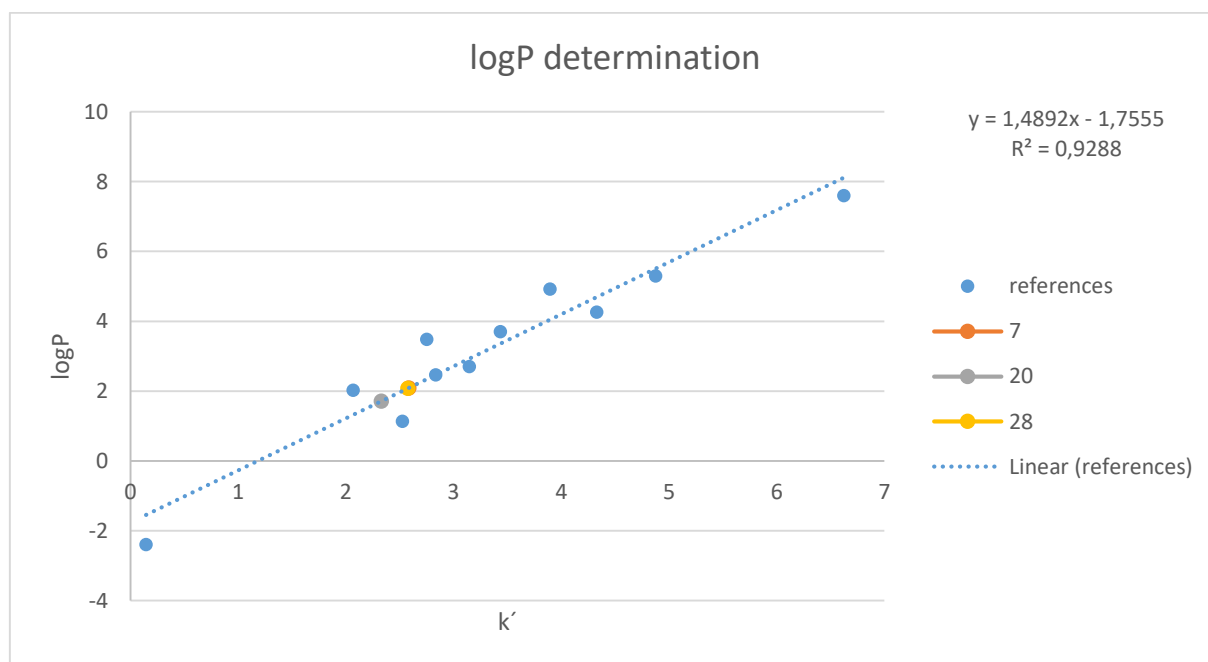
Reference compounds:

Compound	t_R [min.]	k'	logP (literature)	logP (calculated)	$\Delta\log P$
Thiourea	3,1				
Levodopa	0,289	0,093333333	-2,39	-1,50	-0,89
Chloramphenicol	8,488	2,738064516	1.14	2,04	-0,90
Furosemide	7,026	2,266290323	2.03	1,41	0,62
Penytoin	9,388	3,028225806	2.47	2,43	0,04
Albendazol	10,591	3,416505376	2.7	2,95	-0,25
Propanolol	9,053	2,920430108	3.48	2,29	1,19
Amodiaquine	11,560	3,729032258	3.7	3,37	0,33
Lovastatin	14,287	4,608602151	4.26	4,55	-0,29
Amitriptylin	13,080	4,219354839	4.92	4,03	0,89
Fenofibrate	16,168	5,215376344	5.3	5,36	-0,06
Clofazimine	22,879	7,380268817	7.6	8,26	-0,66
1	14,729	4,751397849		4,74	
2	7,536	2,430806452		1,63	



Reference compounds:

Compound	t_R [min.]	k'	logP (literature)	logP (calculated)	$\Delta\log P$
Thiourea	3,3				
Levodopa	0,473	0,143434343	-2,39	-1,54	-0,85
Chloramphenicol	8,331	2,524545455	1,14	2,00	-0,86
Furosemide	6,817	2,065606061	2,03	1,32	0,71
Penytoin	9,344	2,831616162	2,47	2,46	0,01
Albendazol	10,374	3,143737374	2,7	2,93	-0,23
Propanolol	9,072	2,749141414	3,48	2,34	1,14
Amodiaquine	11,332	3,434040404	3,7	3,36	0,34
Lovastatin	14,282	4,327979798	4,26	4,69	-0,43
Amitriptylin	12,851	3,894242424	4,92	4,04	0,88
Fenofibrate	16,088	4,87510101	5,3	5,50	-0,20
Clofazimine	21,850	6,621313131	7,6	8,10	-0,50
7	8,521	2,58222222		2,09	
20	7,681	2,327575758		1,71	
28	8,496	2,574646465		2,08	



3.4 Metabolism assay

The solubilized test compounds **2**, **7**, **20** and **28** (5 μ L, final concentration 10 μ M in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4)) were pre-incubated at 37 $^{\circ}$ C in 432 μ L of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) together with a 50 μ L NADPH regenerating system (30 mM glucose-6-phosphate, 4 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 mM NADP, 30 mM MgCl₂). After 5 min, the reaction was started by the addition of 13 μ L of microsome mix from the liver of Sprague–Dawley rats (Invitrogen; 20 mg protein/mL in 0.1 M phosphate buffer) in a shaking water bath at 37 $^{\circ}$ C. The reaction was stopped by addition of 500 μ L of ice-cold methanol at 0, 15, 30 and 60 min. The samples were centrifuged at 5000 g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C. The supernatants were analyzed and test compound was quantified by HPLC: mobile phase: MeOH 83%/H₂O 17%/formic acid 0.1%; flow-rate: 1 mL/min; stationary phase: MultoHigh Phenyl phase, 5 μ m, 250 \times 4, precolumn, phenyl, 5 μ m, 20 \times 4; detection wavelength: 330 and 254 nm; injection volume: 50 μ L. Control samples were performed to check the stability of **2**, **7**, **20** and **28** in the reaction mixture: first control was without NADPH, which is needed for the enzymatic activity of the microsomes, second control was with inactivated microsomes (incubated for 20 min at 90 $^{\circ}$ C), third control was without test compound (to determine the baseline). The amounts of the test compounds **2**, **7**, **20** and **28** were quantified by an external calibration curve, where data are expressed as mean \pm SEM of single determinations obtained in three independent experiments.

4 Computational methods

Molecular docking studies: Molecular modelling experiments were carried out using MOE (Molecular Operating Environment v. 2015.10⁶, Chemical Computing Group, Montreal, Canada). The X-ray structures of RXR α (in complex with bexarotene, PDB-ID: 4K6I⁷), RXR β (in complex with LG100268, PDB-ID: 1H9U⁸), PPAR α (in complex with **2**, PDB-ID: 4BCR²), and PPAR γ (in complex with agonist 53, PDB-ID: 2Q8S¹) were prepared using the *Protonate 3D*⁹ and the *Energy Minimize* function. Ligands were placed using *Triangle Matcher* with the scoring function *London dG*. For refinement the *Rigid Receptor* method was chosen with the scoring function *Affinity dG*.

5 Abbreviations

d	duplet
DCM	methylene chloride
DEA	<i>N,N</i> -diethylaniline
DIPS	diisoproylsulfate
DMF	dimethylformamide
DMS	dimethylsulfate
DMSO	dimethyl sulfoxide
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl acetate
ESI	electrospray ionization
eq	equivalents
HCl	hydrochloric acid
HOAc	acetic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
LBD	ligand binding domain
LiOH	lithium hydroxide
MALDI	matrix-assisted laser desorption/ionization
MeI	methyl iodide
MeOH	methanol
MgSO ₄	magnesium sulfate
M.p.	melting point
NaOH	sodium hydroxide
NCS	<i>N</i> -Chlorosuccinimide
p	quintett
POCl ₃	phosphorus (V) oxychloride
ppm	parts per million
RT	retention time
s	singulett
t	triplett
TEA	triethylamine
THF	tetrahydrofurane
TMS	tetramethylsilane
q	quartett

6 Supporting references

- (1) Casimiro-Garcia, A.; Bigge, C. F.; Davis, J. A.; Padalino, T.; Pulaski, J.; Ohren, J. F.; McConnell, P.; Kane, C. D.; Royer, L. J.; Stevens, K. A.; Auerbach, B. J.; Collard, W. T.; McGregor, C.; Fakhoury, S. A.; Schaum, R. P.; Zhou, H. Effects of Modifications of the Linker in a Series of Phenylpropanoic Acid Derivatives: Synthesis, Evaluation as PPAR α/γ Dual Agonists, and X-Ray Crystallographic Studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16* (9), 4883–4907.
- (2) Bernardes, A.; Souza, P. C. T.; Muniz, J. R. C.; Ricci, C. G.; Ayers, S. D.; Parekh, N. M.; Godoy, A. S.; Trivella, D. B. B.; Reinach, P.; Webb, P.; Skaf, M. S.; Polikarpov, I. Molecular Mechanism of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Activation by WY14643: A New Mode of Ligand Recognition and Receptor Stabilization. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425* (16), 2878–2893.
- (3) Rau, O.; Syha, Y.; Zettl, H.; Kock, M.; Bock, A.; Schubert-Zsilavecz, M. Alpha-Alkyl Substituted Pirinixic Acid Derivatives as Potent Dual Agonists of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha and Gamma. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2008**, *341*, 191–195.
- (4) Schubert-Zsilavecz, M.; Syha, Y.; Kock, M.; Bock, A.; Rau, O.; Kippenberger, S.; Steinhilber, D.; Popescu, L. Derivate Des Pyrimidins Und Triazins Und Deren Verwendung. Ger. Offen. DE 102005025161 A1. Dec 07, 2006
- (5) Kim, S.; Thiessen, P. A.; Bolton, E. E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B. A.; Wang, J.; Yu, B.; Zhang, J.; Bryant, S.H. PubChem Substance and Compound Databases. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D1202–D1213.
- (6) Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE), 2015.10. 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 2016.
- (7) Boerma, L. J.; Xia, G.; Qui, C.; Cox, B. D.; Chalmers, M. J.; Smith, C. D.; Lobo-Ruppert, S.; Griffin, P. R.; Muccio, D. D.; Renfrow, M. B. Defining the Communication between Agonist and Coactivator Binding in the Retinoid x Receptor α Ligand Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (2), 814–826.
- (8) Love, J. D.; Gooch, J. T.; Benko, S.; Li, C.; Nagy, L.; Chatterjee, V. K. K.; Evans, R. M.; Schwabe, J. W. R. The Structural Basis for the Specificity of Retinoid-X Receptor-Selective Agonists: New Insights into the Role of Helix H12. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (13), 11385–11391.
- (9) Labute, P. Protonate3D: Assignment of Ionization States and Hydrogen Coordinates to Macromolecular Structures. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *75* (1), 187–205.

16.4 Computer-assisted Selective Optimization of Side-Activities - from Cinalukast to a PPAR α Modulator

Pollinger, J.; Schierle, S.; Neumann, S.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Merk, D. Computer-assisted Selective Optimization of Side-Activities - from Cinalukast to a PPAR α Modulator. *ChemMedChem* **2019**, *14* (14), 1343–1348.

Reprinted with permission from Pollinger, J.; Schierle, S.; Neumann, S.; Ohrndorf, J.; Kaiser, A.; Merk, D. *ChemMedChem* **2019**, *14* (14), 1343–1348. Copyright (2019) John Wiley and Sons.

Computer-Assisted Selective Optimization of Side-Activities—from Cinalukast to a PPAR α Modulator

Julius Pollinger⁺, Simone Schierle⁺, Sebastian Neumann, Julia Ohrndorf, Astrid Kaiser, and Daniel Merk^{*[a]}

Automated computational analogue design and scoring can speed up hit-to-lead optimization and appears particularly promising in selective optimization of side-activities (SOSA) where possible analogue diversity is confined. Probing this concept, we employed the cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT₁R) antagonist cinalukast as lead for which we discovered peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) modulatory activity. We automatically generated a virtual library of

close analogues and classified these roughly 8000 compounds for PPAR α agonism and CysLT₁R antagonism using automated affinity scoring and machine learning. A computationally preferred analogue for SOSA was synthesized, and in vitro characterization indeed revealed a marked activity shift toward enhanced PPAR α activation and diminished CysLT₁R antagonism. Thereby, this prospective application study highlights the potential of automating SOSA.

Introduction

Computer-assisted drug discovery increasingly strives to automate structural optimization of bioactive small molecules in order to minimize experimental efforts.^[1] Repeated design–synthesize–test cycles of typical hit-to-lead expansion in medicinal chemistry may considerably profit from modern computational approaches to compound prioritization. A particular promising application of such virtual compound optimization lies in its combination with the concept of selective optimization of side-activities^[2,3] (SOSA), in which (weak) off-target activities of approved or experimental drugs are turned into the main activity of a new, closely related structural analogue while diminishing the activity on the original target. A great advantage of this concept are the superior properties of drugs being used as lead compounds. Because drugs have already been optimized for favorable physicochemical properties, bioavailability and safety, the starting point of SOSA-based drug discovery is, by definition, drug-like. However, to conserve the favorable drug-like properties of the lead compound selected for a SOSA campaign, structural modifications usually need to be kept small during optimization. Within such confined chemical space, virtual prioritization of a drug's structural analogues for predicted activity on the desired side-target appears very promising.

To probe this concept of computer-assisted SOSA, we selected the cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT₁R) antagonist cinalukast (**1**) as lead compound for which we discovered weak

partial agonistic activity on peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)^[4,5] in a systematic screening campaign. The fatty acid mimetic^[6] cinalukast (**1**)^[7,8] has favorable physicochemical properties and its modular architecture allows various structural modifications. Thus, **1** appears well suited for SOSA, but its low-yielding five-step synthesis renders a systematic structure–activity relationship (SAR) study of **1** an elaborate task. We used **1** as lead for computer-assisted SOSA aiming to structurally optimize the drug's PPAR α agonism. We automated the design of cinalukast analogues and their activity prediction on PPAR α and CysLT₁R. After successful proof-of-concept evaluations, a computationally preferred analogue was synthesized and biologically characterized. It comprised higher activity on PPAR α than **1** and simultaneously revealed markedly lower CysLT₁R antagonism, confirming the potential of this computer-assisted structural optimization approach.

Results and Discussion

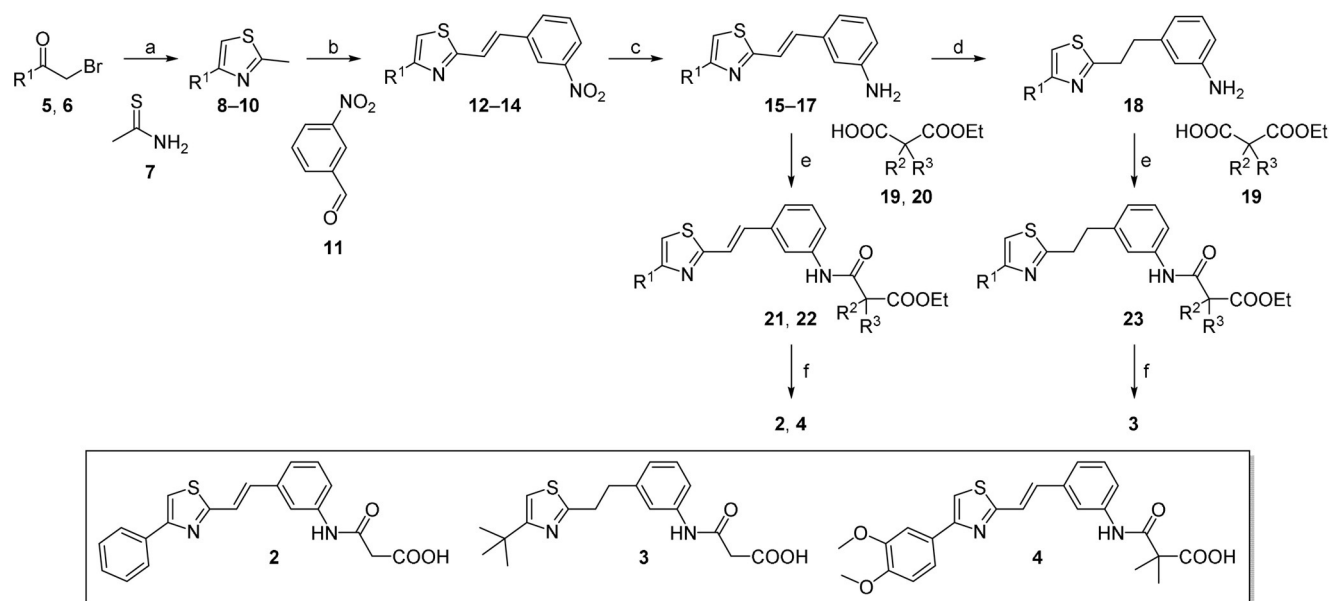
Synthesis

Cinalukast derivatives **2–4** were synthesized in five to six steps according to Scheme 1 starting from bromomethylketones **5** and **6**, which were first cyclized with thioacetamide (**7**) to 2-methylthiazoles **8** and **9**. 4-*tert*-Butyl-2-methylthiazole **10** was commercially available. Condensation of **8–10** with 3-nitrobenzaldehyde (**11**) to nitrostyrylthiazoles **12–14** followed by reduction with SnCl₂/HCl then produced aminostyrylthiazoles **15–17**. Further reduction of the styryl moiety in **15** with H₂/Pd(C) afforded phenethylthiazole **18**. Compounds **16–18** were then coupled with dicarboxylic acid monoethyl esters **19** and **20** to obtain esters **21–23** using EDC·HCl and 4-DMAP, and saponification of **21–23** yielded test compounds **2–4**. *E/Z* isomerism was observed for **2** and **4**, and their *E* isomers (*E/Z* > 95%)

[a] J. Pollinger,⁺ S. Schierle,⁺ S. Neumann, J. Ohrndorf, A. Kaiser, Dr. D. Merk
Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-
von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt (Germany)
E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de

[⁺] These authors contributed equally to this work

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201900286>.



Scheme 1. Synthesis of cinalukast derivatives 2–4: a) thioacetamide, DMF, reflux, 4 h, 74–82%; b) NaOAc, HOAc, reflux, 10 h, 14–24%; c) SnCl₂, EtOH, 65 °C, 2–3 h, 55–66%; d) H₂ (1 bar), Pd(C), RT, 18 h, 94%; e) EDC-HCl, 4-DMAP, CHCl₃, 60 °C, 12–16 h, 14–28%; f) LiOH, THF/H₂O, RT, 12 h, 21–71%.

were isolated for *in vitro* pharmacological characterization by preparative HPLC. The commercial sample of 1 contained the pure *E* isomer. The observed *E/Z* isomerism turned out to be light dependent, but was not observed under the conditions of the *in vitro* test system used in this study, confirming that it does not affect the activity data (see Supporting Information for details).

Biological evaluation

PPAR α modulatory activity of 1 and derivatives 2–4 was determined in a specific PPAR α –Gal4 hybrid reporter gene assay^[9,10] relying on a chimeric receptor composed of the human PPAR α ligand binding domain (LBD) and the DNA binding domain of the receptor Gal4 from yeast to govern reporter gene expression. A Gal4-inducible firefly luciferase served as reporter, and a constitutively expressed *Renilla* luciferase was used to monitor test compound toxicity and transfection efficiency. CysLT₁R antagonism of 1 and 4 was assessed in a cell-based Ca²⁺-flux assay in competition with 0.1 nM leukotriene D₄.^[11]

Computer-assisted structural optimization

Characterization of cinalukast (1) on therapeutically relevant nuclear receptors revealed partial agonistic activity on PPAR α (EC₅₀ = 10 ± 2 μM, 5.3 ± 0.6-fold activation). With this attractive side-activity, 1 was chosen as lead for SOSA-based optimization toward PPAR α agonism with computational support. To predict the potency of 1 and analogues on the nuclear receptor PPAR α , we chose the HYDE scoring function.^[12] HYDE estimates free energies of binding for ligand–protein complexes focusing on hydrogen bond formation between ligand and protein as well as dehydration of binding sites.^[12] Therein, it considers ligand geometry and interaction angles. HYDE was successfully

applied on hydrophobic ligand binding sites previously^[13–16] and appeared suitable for predicting the interaction of 1 and analogues with the highly lipophilic PPAR α ligand binding site. Although scoring functions for computational ranking of protein–ligand interactions are error-prone in many cases, it was shown that scoring can have predictive power and provide reliable correlation between computational score and biological potency for some targets.^[17,18] Especially for PPARs,^[18] scoring may be applied successfully when the co-crystallized ligand in the template used for scoring sufficiently resembles the studied molecules.

Aiming to evaluate the suitability of HYDE for our approach, we first studied the correlation between the HYDE score for analogues of 1 concerning affinity to PPAR α and their activity on the nuclear receptor. For this proof-of-concept, we selected simple building blocks that were available in house to minimize synthesis efforts and costs. We manually designed a small library comprising 27 derivatives of 1 with variations in the thiazole substituent, in the acidic side chain, as well as in the geometry and saturation degree of the central styrylthiazole moiety (Table S1). To prioritize compounds for synthesis, we docked all 27 cinalukast analogues into the PPAR α ligand binding site using FlexX^[19] and calculated the HYDE scores for the top-ranking poses. The PPAR α LBD complex X-ray structure PDB ID 4Cl4^[20] served as structural template, as it contains a ligand with similar linear three-ring structure as 1. The results suggested that both the thiazole substituent and the acidic side chain length had marked impact on potency (Table S1). Amongst the simplified derivatives with no variations in the central styrylthiazole moiety, compound 2 (Scheme 1) comprising a 4-phenylthiazole moiety and a 3-oxopropanoic acid side chain appeared most favored (–63 kJ mol^{–1}).

To computationally assess the importance of the carboxylic acid for HYDE scores on PPAR α , we studied the influence of re-

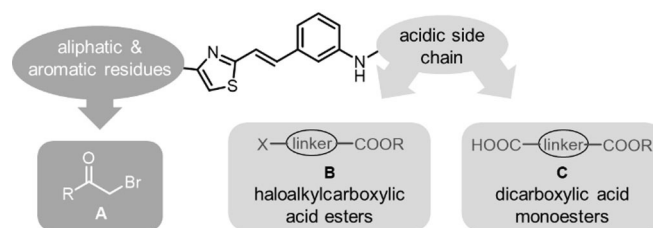
placing it in **2** with an amide, a nitrile, an alcohol, or a methyl group (Table S2). As expected for the fatty acid sensor PPAR α ,^[5] all four replacements were predicted as significantly less active by HYDE. The scores also suggested that a hydrogen bond donor (amide, alcohol) is essential while the scores for the nitrile and the terminal methyl moiety were markedly lower. Based on these observations, we selected carboxylic acid derivative **2** for synthesis and in vitro characterization.

Concerning variations in the styrylthiazole residue, the HYDE results suggested that changes in the geometry would be detrimental (Table S1, row a) for potency on PPAR α but that reduction of the styryl residue might be tolerated (Table S1, rows b and c). The 4-*tert*-butylthiazole derivative **3** (Scheme 1) with reduced styryl residue and 3-oxopropanoic acid side chain was predicted as weak PPAR α modulating cinalukast analogue (-55 kJ mol^{-1}) and to cover a broader structural variation in this proof-of-concept evaluation, we selected **3** for synthesis and in vitro characterization.

Proof-of-concept cinalukast derivatives **2** and **3** showed partial agonistic activity on PPAR α with lower potency and activation efficacy than **1** (**2**: $EC_{50} = 11.7 \pm 0.5 \mu\text{M}$, 3.0 ± 0.1 -fold activity; **3**: $EC_{50} = 73 \pm 17 \mu\text{M}$, 3.3 ± 0.5 -fold activity; Table S3). No direct correlation between the in vitro potencies of cinalukast (**1**) and derivatives **2** and **3** with their HYDE scores was observed, but the prediction agreed well with the rank order of potency, particularly when considering EC_{50} value and activation efficacy. This result sufficiently validated the HYDE-based compound prioritization for further computer-assisted optimization of **1** toward selective PPAR α agonism.

As the prospective proof-of-concept study confirmed the suitability of HYDE to predict PPAR α modulatory potency of **1** and derivatives, we aimed to use this tool in a markedly expanded chemical space of cinalukast analogues considered for structural optimization. For this, we automatically generated a combinatorial library from all suitable building blocks that were commercially available from typical vendors. To retain the basic molecular architecture of drug **1**, consider the observations from the proof-of-concept evaluation, and keep structural changes small according to the SOSA concept, we only varied the thiazole substituent and the acidic side chain. The virtual combinatorial library was generated from bromomethylketones (**A**) for the generation of the 4-substituted styrylthiazole residue as well as haloalkyl carboxylic acid esters (**B**) and dicarboxylic acid monoesters (**C**) to introduce the acidic side chain (Scheme 2). The latter (**B** & **C**) covered linear and branched alkyl chains as well as aromatic moieties for broader structural variety. The resulting library contained 7922 cinalukast analogues.

In an automated workflow, the structures of this virtual combinatorial library were docked with FlexX before the top-scored docking poses were assessed with HYDE for their predicted interaction with PPAR α using PDB ID 4CI4^[20] as structural template. According to the SOSA concept, the molecules were also filtered for low lipophilicity ($\text{clog}P \leq 4$). Among the five computationally favored compounds for interaction with PPAR α (Table 1, top 30 in Table S4), the top three (**4a**, **4b**, **4**)



Scheme 2. Virtual combinatorial library design. The thiazole substituent covered aliphatic and aromatic residues with varying size and substitution patterns, the acidic side chain covered aromatic and linear or branched aliphatic carboxylic acid moieties linked to the aminostyryl scaffold via an amine or amide bond.

hardly differed in their scores for PPAR α , whereas **4c** and **4d** comprised slightly lower predicted affinities.

We then computationally assessed the potential of these PPAR α -favored cinalukast analogues to interact with CysLT₁R. Due to the lack of X-ray data of this G protein-coupled receptor as structural template, the computational estimation of CysLT₁R affinity had to follow a ligand-based strategy. We retrieved all available compounds with annotated activity on CysLT₁R from ChEMBL^[21] (215 potent antagonists with $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$, 904 weak antagonists with $IC_{50} > 1 \mu\text{M}$, or inactive examples) and used this collection of compounds with reliable activity data to train a random forest model for high/low activity classification on CysLT₁R. Known compounds were assigned to two classes with an activity threshold of $1 \mu\text{M}$. Molecules were represented by various fingerprints (MACCS,^[22] Morgan,^[23] AtomPair^[24]) for individually training random forest models. Stratified 50/50% train-test splitting with cross-validation (Table S5) revealed high prediction accuracy for all models. All three models predicted cinalukast as highly active (class 1) and agreed in the classification of compounds **4** and **4a–d** which were assigned to class 2 with high confidence (Table 1). In light of the close structural similarity of **4** and **4a–d** to the known CysLT₁R antagonist **1**, this ligand-based activity prediction approach seemed reasonable.

Moreover, the predictions agreed with the limited data on the SAR of cinalukast (**1**) and derivatives as CysLT₁R antagonists available in the literature^[25] which suggest the importance of the 2,2-diethyl-4-oxobutanoic acid residue both in terms of chain length and ethyl substituents as well as of a small aliphatic ring as thiazole substituent for high potency on CysLT₁R. The latter is also reflected by SAR data for other CysLT₁R antagonists such as zafirlukast,^[6,26,27] for which small terminal aliphatic rings (cyclobutyl, cyclopentyl) were found to be essential for antagonism, while larger rings were markedly less active.

Cinalukast analogue **4**, comprising a shortened 2,2-dimethyl-3-oxopropionic acid side chain and a bulky dimethoxyphenyl substituent on the thiazole, was selected for synthesis (Scheme 1) and in vitro characterization based on its favorable activity prediction profile and building block availability. In vitro characterization of **4** revealed robust PPAR α activation (13.7 ± 0.1 -fold) with an EC_{50} value of $8.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ and markedly decreased activity on CysLT₁R relative to lead compound **1**

Table 1. Computational activity predictions for top-five-ranked entries of the combinatorial cinalukast analogue library. The top three compounds **4a**, **4b**, and **4** differed marginally in their predicted activities, and **4** was selected for synthesis and in vitro characterization based on building block availability.

ID	Structure	PPAR α HYDE score ^[a]	CysLT ₁ R random forest ^[b]
1		-83	class 1
4a		-85	class 2
4b		-84	class 2
4		-81	class 2
4c		-76	class 2
4d		-69	class 2

[a] HYDE-based PPAR α affinity prediction (the respective top-scored pose was considered for each molecule): kJ mol⁻¹. [b] CysLT₁R antagonism was computationally assessed with a random forest classification model to assign candidates to high (class 1: IC₅₀ < 1 μ M) or low (class 2: IC₅₀ > 1 μ M) CysLT₁R antagonistic potency. Cinalukast (**1**) was used for comparison.

(Figure 1 b). Thus, the structural modifications caused a remarkable activity shift with enhanced PPAR α activation efficacy (**4**: 13.7-fold vs. **1**: 5.3-fold) and strongly reduced antagonistic activity on CysLT₁R (**4**: IC₅₀ \geq 100 nM vs. **1**: IC₅₀ \approx 1 nM). Moreover, with an aqueous solubility of 21.7 mg L⁻¹ (48 μ M) and preferable lipophilicity (logP 1.6), **4** even exceeded the favorable properties of lead compound **1** (1.1 mg L⁻¹, 2.7 μ M; logP 2.2) further confirming successful SOSA.

Inspection of the predicted binding mode (Figure 1 c) of **4** in the PPAR α ligand binding site compared with **1** revealed only minor differences which agrees with the compounds' very similar HYDE scores. Participation in the canonical hydrogen bond network with Ser280, Tyr314, Tyr464 and His440 was observed for both compounds. Due to its shortened acidic chain, the styrylthiazole moiety of **4** was slightly shifted to this region of the binding site. As a consequence, the benzene ring was bound in closer proximity to Phe318. The large lipophilic cavity at the end of the PPAR α ligand binding site formed by Ile241, Leu247, Leu254, Cys275 and Val332 accommodated the thiazole 4-substituents of both **1** and **4** but appeared more favorably occupied by the dimethoxyphenyl residue of **4**.

Conclusions

Combining virtual activity prediction and selective optimization of side-activities appears very promising for refining side-target activities of approved drugs toward bioactive new chemical

entities with minimized experimental efforts. Because the basic concept of SOSA often demands that structural modifications are confined during optimization in order to conserve the favorable profile of the lead drug, focused virtual libraries of suitable analogues for optimization can be generated. We hypothesized that their computational prioritization is then capable of decreasing time- and cost-intensive design-synthesize-test cycles and can speed up structural optimization for selective activity on the desired target.

Following this concept, we used the CysLT₁R antagonist cinalukast (**1**) as lead for computer-assisted SOSA toward PPAR α agonism. HYDE was chosen as computational scoring approach for PPAR α activity, as it was successfully applied to highly lipophilic binding sites as found in PPARs, previously, and yielded reliable results in a proof-of-concept evaluation. CysLT₁R antagonism was computationally predicted using a random forest model as classifier between high and low CysLT₁R antagonistic potency. From a virtual combinatorial library of close cinalukast analogues, **4** was computationally favored both in terms of high predicted affinity to PPAR α and low estimated CysLT₁R antagonism, and was consequently selected for synthesis and characterization. In vitro profiling of **4** confirmed the predicted activity shift toward higher activation efficacy on PPAR α and markedly improved selectivity over CysLT₁R. Thus, our straightforward computational approach to analogue selection for SOSA successfully predicted the activity profile of **4**.

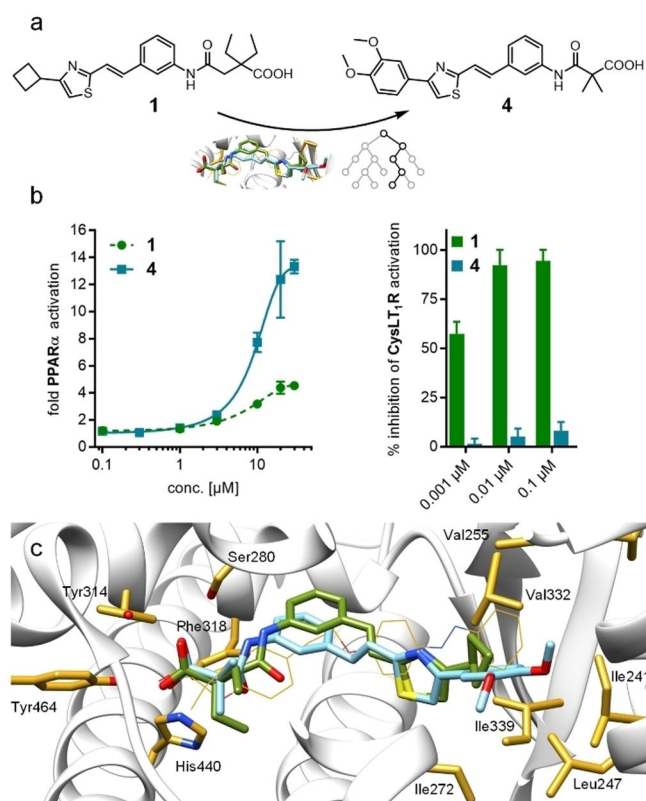


Figure 1. a) Automated docking in the PPAR α ligand binding site (PDB ID: 4Cl4^[20]) and HYDE scoring combined with a random forest model trained on fingerprint representations of known CysLT $_1$,R antagonists successfully classified cinalukast analogue **4** for enhanced PPAR α agonism and diminished CysLT $_1$,R antagonistic potency. b) In vitro characterization of the computationally favored analogue **4** revealed enhanced PPAR α activation efficacy and strongly decreased antagonism on CysLT $_1$,R (inhibition of CysLT $_1$,R activation by 0.1 nM leukotriene D $_4$). Results are the mean \pm SEM, $n \geq 3$ for PPAR α , $n = 2$ for CysLT $_1$,R. c) Predicted binding modes of **1** (green) and **4** (blue) in the PPAR α ligand binding site (PDB ID: 4Cl4^[20]) co-crystallized ligand as yellow wire; docking was performed with FlexX and visualized with UCSF Chimera^[28]. Compounds **1** and **4** form a very similar binding mode. The carboxylic acid residues of **1** and **4** participate in the canonical hydrogen bond network with Ser280, Tyr314, Tyr464, and His440 of the PPAR α LBD. The stylythiazole of **4** is slightly shifted toward the polar end of the binding site due to its shorter carboxylic acid side chain. The cyclobutyl (**1**) and dimethoxyphenyl (**4**) substituents occupy the lipophilic cavity at the end of the pocket, where the latter moiety seems to fill the available lipophilic space more favorably.

The strong activity shift achieved by the computationally selected cinalukast analogue **4** corroborates the potential of applying modern activity prediction techniques on structural compound optimization in early drug discovery. It suggests that experimental efforts in (SOSA-based) optimization of drug molecules toward desired activity profiles can be markedly reduced by automated analogue design and scoring.

Supporting Information

The Supporting Information contains Tables S1–S5, computational methods and model validation, synthetic procedures and analytical characterization of **2–4** and their precursors, data on evaluation of *E/Z* isomerism, as well as methods for in vitro characterization. The

compound datasets used in this study and predicted binding poses for HYDE assessment are provided as .sdf or .csv files.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Francesca Grisoni and Dr. Franca Klingler for scientific advice and technical support. Free use of the BioSolveIT cheminformatics software suite as part of the scientific challenge is gratefully acknowledged. Molecular graphics and analyses were performed with UCSF Chimera, developed by the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, with support from NIH P41-GM103311.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: automation • nuclear receptors • peroxisome proliferator-activated receptors • virtual combinatorial library

- [1] G. Schneider, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2018**, *17*, 97–113.
- [2] C. G. Wermuth, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1303–1314.
- [3] T. Langer, C. G. Wermuth, in *Polypharmacology in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ (USA), **2012**, pp. 227–243.
- [4] L. Michalik, J. Auwerx, J. P. Berger, V. K. Chatterjee, C. K. Glass, F. J. Gonzalez, P. A. Grimaldi, T. Kadowaki, M. A. Lazar, S. O'Rahilly, et al., *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58*, 726–741.
- [5] C. Lamers, M. Schubert-Zsilavecz, D. Merk, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22*, 803–841.
- [6] E. Proschak, P. Heitel, L. Kalinowsky, D. Merk, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5235–5266.
- [7] M. O'Donnell, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1991**, *629*, 413–415.
- [8] M. O'Donnell, H. J. Crowley, B. Yaremko, N. O'Neill, A. F. Welton, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1991**, *259*, 751–758.
- [9] J. Schmidt, M. Rotter, T. Weiser, S. Wittmann, L. Weizel, A. Kaiser, J. Heering, T. Goebel, C. Angioni, M. Wurglics, et al., *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7703–7724.
- [10] D. Flesch, S.-Y. Cheung, J. Schmidt, M. Gabler, P. Heitel, J. S. Kramer, A. Kaiser, M. Hartmann, M. Lindner, K. Lüddens-Dämgen, et al., *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7199–7205.
- [11] H. M. Sarau, R. S. Ames, J. Chambers, C. Ellis, N. Elshourbagy, J. J. Foley, D. B. Schmidt, R. M. Muccitelli, O. Jenkins, P. R. Murdock, et al., *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 657–663.
- [12] N. Schneider, G. Lange, S. Hindle, R. Klein, M. Rarey, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 15–29.
- [13] H. A. Carlson, R. D. Smith, K. L. Damm-Ganamet, J. A. Stuckey, A. Ahmed, M. A. Convery, D. O. Somers, M. Kranz, P. A. Elkins, G. Cui, et al., *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 1063–1077.
- [14] C. Ruggeri, N. Drinkwater, K. K. Sivaraman, R. S. Bamert, S. McGowan, A. Paiardini, *PLoS One* **2015**, *10*, e0138957.
- [15] Z. Gaieb, S. Liu, S. Gathiaka, M. Chiu, H. Yang, C. Shao, V. A. Feher, W. P. Walters, B. Kuhn, M. G. Rudolph, et al., *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2018**, *32*, 1–20.
- [16] P. da Silva Figueiredo Celestino Gomes, F. Da Silva, G. Bret, D. Rognan, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2018**, *32*, 75–87.
- [17] M. Su, Q. Yang, Y. Du, G. Feng, Z. Liu, Y. Li, R. Wang, *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 895–913.
- [18] J. Weber, M. Rupp, E. Proschak, *Mol. Inform.* **2012**, *31*, 631–633.
- [19] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–489.
- [20] J. C. dos Santos, A. Bernardes, L. Giampietro, A. Ammazaloro, B. De Filippis, R. Amoroso, I. Polikarpov, *J. Struct. Biol.* **2015**, *191*, 332–340.

- [21] A. P. Bento, A. Gaulton, A. Hersey, L. J. Bellis, J. Chambers, M. Davies, F. A. Krüger, Y. Light, L. Mak, S. McGlinchey, et al., *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D1083–D1090.
- [22] J. L. Durant, B. A. Leland, D. R. Henry, J. G. Nourse, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1273–1280.
- [23] H. L. Morgan, *J. Chem. Doc.* **1965**, *5*, 107–113.
- [24] R. E. Carhart, D. H. Smith, R. Venkataraghavan, *J. Chem. Inf. Model.* **1985**, *25*, 64–73.
- [25] G. F. Field, J. R. Vermeulen, W. J. Zally (F. Hoffmann-La Roche AG), Eur. Pat. No. EP0355353A2, **1990**.
- [26] F. J. Brown, Y. K. Yee, L. A. Cronk, K. C. Hebbel, R. D. Krell, D. W. Snyder, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1771–1781.
- [27] S. Schierle, C. Flauaus, P. Heitel, S. Willems, J. Schmidt, A. Kaiser, L. Weizel, T. Goebel, A. S. Kahnt, G. Geisslinger, et al., *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 5758–5764.
- [28] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.

Manuscript received: May 10, 2019

Accepted manuscript online: May 29, 2019

Version of record online: June 27, 2019

Table of Contents

1 Supplementary Tables	S3
2 Computational methods	S7
2.1 Proof-of-concept evaluation.....	S7
2.2 Combinatorial library generation and scoring	S7
2.3 CysLT ₁ receptor antagonism prediction	S7
3 Chemistry	S9
3.1 General	S9
3.2 Synthesis and analytical characterization of 2-4 and their precursors	S9
3.3 Evaluation of <i>E/Z</i> isomerism using (<i>E</i>)-2-styrylthiazole as model compound	S14
4 Methods for <i>in vitro</i> pharmacological characterization	S16
4.1 Hybrid reporter gene assay for PPAR α	S16
4.2 CysLT ₁ R antagonism assay	S16
4.3 Determination of aqueous solubility	S16
4.4 Determination of logP	S16
5 Supplementary references	S18

1 Supplementary Tables

Table S1: HYDE-predictions (kJ/mol) for PPAR α activities of proof-of-concept library - effects of thiazole substituent, acidic side chain length and variations in the styrylthiazole.

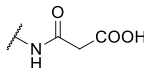
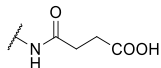
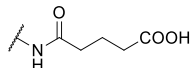






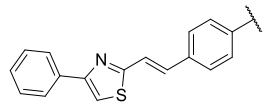
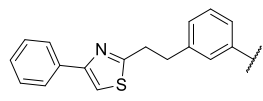
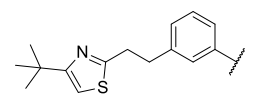
		R ¹		
				
R ²		-33	-17	-53
		-63 (compound 2)	-37	-33
		-39	-44	-47
		-34	-35	-25
		-35	-34	-41
		-37	-55	-45
a		-34	-23	-40
b		-61	-57	-42
c		-55 (compound 3)	-46	-49

Table S2: HYDE-predictions (kJ/mol) for PPAR α activities of carboxylic acid replacements.

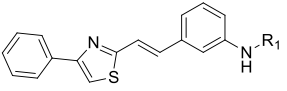
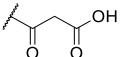
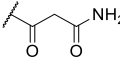
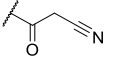
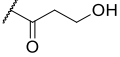
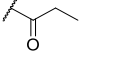
	
	-63 (2)
	-55
	-31
	-56
	-30

Table S3: In vitro activities of cinalukast (**1**) and derivatives **2** and **3** on PPAR α . Activity data are the mean \pm S.E.M., n=3.

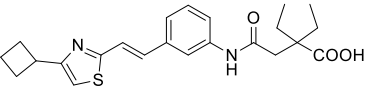
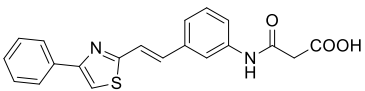
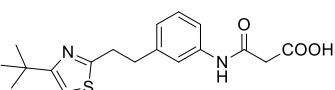
	PPAR α	
	in vitro activity	HYDE-prediction
 <p style="text-align: center;">1</p>	<p>EC₅₀ = 10\pm2 μM</p> <p>5.3\pm0.6-fold act.</p>	-83 kJ/mol
 <p style="text-align: center;">2</p>	<p>EC₅₀ = 11.7\pm0.5 μM</p> <p>3.0\pm0.1-fold act.</p>	-63 kJ/mol
 <p style="text-align: center;">3</p>	<p>EC₅₀ = 73\pm17 μM</p> <p>3.3\pm0.5-fold act.</p>	-55 kJ/mol

Table S4: Top-ranked 30 entries of the virtual combinatorial library concerning predicted HYDE score for PPAR α as retrieved from the automated workflow.

RANK	SMILES
1	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C3)=CS2)=C1</chem>
2	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCC3=CC=CC=C3)=CS2)=C1</chem>
3	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OC)=C(OC)C=C3)=CS2)=C1</chem>
4	<chem>O=C(CCCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C3)=CS2)=C1</chem>
5	<chem>CN(C)C1=CC=C(C2=CSC(/C=C/C3=CC(NC(CCCC(O)=O)=O)=CC=C3)=N2)C=C1</chem>
6	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(N(C)C)C=C3)=CS2)=C1</chem>
7	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(OCC)C=C3)=CS2)=C1</chem>
8	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCCCC)=CS2)=C1</chem>
9	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OC)=C(OC)C(OC)=C3)=CS2)=C1</chem>
10	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCC3=CC=CC=C3)=CS2)=C1</chem>
11	<chem>O=C(CC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCCCC)=CS2)=C1</chem>
12	<chem>O=C(CCCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(OC)C(OC)=C3)=CS2)=C1</chem>
13	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(OC)C(F)=C3)=CS2)=C1</chem>
14	<chem>O=C(CCCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(OC)C(F)=C3)=CS2)=C1</chem>
15	<chem>O=C(CCCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCC3=CC=CC=C3)=CS2)=C1</chem>
16	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(C)=CC=C3)=CS2)=C1</chem>
17	<chem>O=C(CC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(CC)C=C3)=CS2)=C1</chem>
18	<chem>O=C(CC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC=C(N(C)C)C=C3)=CS2)=C1</chem>
19	<chem>O=C(CCCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OCCO4)=C4C=C3)=CS2)=C1</chem>
20	<chem>O=C(CC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCC3=CC=CC=C3)=CS2)=C1</chem>
21	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OC)=C(OC)C=C3)=CS2)=C1</chem>
22	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CC(C)(C)C)=CS2)=C1</chem>
23	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(OCCO4)=C4C=C3)=CS2)=C1</chem>
24	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(F)=C(F)C=C3)=CS2)=C1</chem>
25	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3CCCCC3)=CS2)=C1</chem>
26	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(CCC)=CS2)=C1</chem>
27	<chem>O=C(CC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(Cl)=C(N)C(Cl)=C3)=CS2)=C1</chem>
28	<chem>O=C(CCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(F)=C(OC)C=C3)=CS2)=C1</chem>
29	<chem>O=C(CCCC(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C3=CC(C#N)=CC=C3)=CS2)=C1</chem>
30	<chem>O=C(C(C)(C)C(O)=O)NC1=CC=CC(/C=C/C2=NC(C(C)C)=CS2)=C1</chem>

Table S5: Cross-validation of random forest models to predict CysLT₁R antagonism. Known CysLT₁R antagonists were assigned to classes considering their potency (class 1: IC₅₀ < 1 μM; class 2: IC₅₀ > 1 μM or inactive) and classes were randomly separated in a stratified split to sets 1a (108), 1b (109), 2a (452) and 2b (452) for the 50-50% train-test cross-validation. Random forest models were trained on either 1a+2a or 1b+2b with compounds represented as MACCS, Morgan, or AtomPair fingerprints, and applied to predict the class of compounds contained in the respective other compound collection. Precision, specificity and non-error-rate (balanced accuracy) were calculated for each model according to the formulas in the methods section.

MACCS

Training-Set	Test-Set	Precision	Specificity	Non-error-rate
1a+2a	1b+2b	0.90	0.99	0.95
1b+2b	1a+2a	0.94	0.97	0.96

Morgan

Training-Set	Test-Set	Precision	Specificity	Non-error-rate
1a+2a	1b+2b	0.94	0.98	0.96
1b+2b	1a+2a	0.97	0.99	0.98

AtomPair

Training-Set	Test-Set	Precision	Specificity	Non-error-rate
1a+2a	1b+2b	0.94	0.99	0.96
1b+2b	1a+2a	0.95	0.98	0.97

2 Computational methods

2.1 Proof-of-concept evaluation: The proof-of-concept library containing 27 manually selected analogues of **1** (as specified in Tables 1&2) was manually generated using ChemDraw 11 (PerkinElmer, Waltham, MA, U.S.A.). All components of this library were then docked into the PPAR α ligand binding site of X-ray structure 4Cl4^[1] using FlexX in LeadIT (version 2.3.2, BioSolveIT, St. Augustin, Germany). The X-ray structure was protonated to physiological pH and the binding site of the protein-ligand complex was defined as all residues in a range of 6.5 Å around the crystallized ligand. The ligand to be docked was protonated to physiological pH. Docking was accomplished by a hybrid approach of enthalpy (triangle matcher) and entropy (single interaction scan) with a maximum of 200 poses. All retrieved poses were ranked by the FlexX docking score and the top-ranking pose was considered for assessing the ligand-protein interaction with HYDE inside SeeSAR (version 7.1).

2.2 Combinatorial library generation and scoring: For the generation of the virtual combinatorial library, building blocks (as defined in Scheme S1) available from typical chemical vendors (SigmaAldrich, TCI, Acros Organics, AlfaAesar) were retrieved from Reaxys (www.reaxys.com). All possible analogues of **1** retaining the central styrylthiazole moiety that were available from these building blocks were generated using RDKit (www.rdkit.org) in the Konstanz Information Miner (KNIME, www.knime.com) platform which produced a virtual library of 7922 compounds. Scoring and ranking of these compounds was automated in KNIME using BioSolveIT (version 2.5.0.0001024, BioSolveIT) and RDKit^[2] software/nodes with default settings unless otherwise specified. In this workflow, compounds were prepared (“Generate 3D Coordinates”), energy minimized (RDKit “Optimize Geometry”, using MMFF94), automatically docked with FlexX in LeadIT (“Compute LeadIT docking”, 500 poses, 4Cl4^[1] as template), and affinity of all poses was estimated with HYDE (“assess affinity with HYDE in SeeSAR”). For each molecule, the best scored pose was then extracted and compounds were filtered for a clogP<4. The top-ranking pose was considered for assessing the ligand-protein interaction with HYDE. For visualization and validation, the best scoring docking poses from these workflows were manually inspected with LeadIT. Docking figures were generated with UCSF Chimera^[3].

2.3 CysLT₁ receptor antagonism prediction

All calculations were performed in the KNIME Analytics Platform (v3.3.3-201708231218). RDKit^[2] nodes (Version 3.2.4-v201711201106) for fingerprint calculation were used with default settings unless otherwise specified. 1119 molecules with annotated activity (IC₅₀) on CysLT₁R were downloaded as SMILES from ChEMBL^[4]. The CysLT₁R antagonists zafirlukast and cinalukast were not contained and manually added to the set. Classes were defined as follows:

Class 1: IC₅₀ below 1 μM (217 molecules), class 2: IC₅₀ above 1 μM or no IC₅₀ (904 molecules)

For each molecule of the two groups the fingerprint representations MACCS^[5], Morgan^[6] (radius 2, NumBits 1024), or AtomPair^[7] (path-length 1-30, NumBits 1024) were calculated using “RDKit Fingerprint” node. Both groups were then randomly split in two train-test sets with equal dimensions using a stratified sampling procedure, that is, by preserving the class proportion:

Group 1a: 108 molecules, group 1b: 109; group 2a: 452; group 2b: 452.

Random forest models were trained on the sets 1a+2a, and 1b+2b for each fingerprint representation using the “Random Forest Learner” node (Version 3.3.3-v201711082058). Each model was cross-validated with the respective other dataset (1b+2b or 1a+2a) using the “Random Forest Predictor” node (Version 3.3.3-v201711082058). Model accuracy was calculated on the basis of Precision, Specificity and Non-Error Rate, calculated as follows^[8]:

$$\text{Precision: } Sn = \frac{Tp}{Fn+Tp}$$

$$\text{Specificity: } Sp = \frac{Tn}{Fp+Tn}$$

$$\text{Non-Error Rate} = \frac{Sn+Sp}{2}$$

T_p = Number of correctly predicted positive compounds

F_p = Number of falsely predicted positive compounds

T_n = Number of correctly predicted negative compounds

F_n = Number of falsely predicted negative compounds

All six models revealed high accuracy (Table S5).

No fingerprint representation yielded significantly higher prediction accuracy in the cross-validation, thus all three fingerprints were considered for the final predictive models. For this, all sets of known compounds (1a, 1b, 2a, 2b; 1121 molecules) were combined to re-train random forest models, as described above, for each fingerprint using all the available chemical information. The models were then applied to predict the CysLT₁R antagonism class of the top30 ranked compounds concerning affinity to PPAR α (Table S4) and cinalukast as described above. The class predictions of the top5 ranked compounds were identical (class 2) for the three models with different descriptor representations and cinalukast was correctly identified as highly active compound (class 1).

3 Chemistry

3.1 General: All chemicals and solvents were of reagent grade and used without further purification unless otherwise specified. All reactions were conducted in oven-dried glassware under argon atmosphere and in absolute solvents. NMR spectra were recorded on a Bruker AV 500, Bruker AV 300 or a Bruker am250xp spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) as reference. Multiplicity is reported: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; m, multiplet. Approximate coupling constants (J) are given in hertz (Hz). Mass spectra were obtained on a VG Platform II (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using electrospray ionization (ESI). High-resolution mass spectra were recorded on a MALDI LTQ ORBITRAP XL instrument (Thermo Fisher Scientific). All final compounds were purified by preparative HPLC using a Shimadzu preparative LC-20A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan) with the following conditions: column, Luna (10 μ C18(2) 100Å; 250x21.2 mm; Phenomenex, Torrance, CA, U.S.A.); mobile phase, isocratic 50:50 acetonitrile/H₂O + 0.1 formic acid for 30 min at a flow rate of 21 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm. Compound purity was analyzed on a Waters 600 Controller HPLC (Waters, Milford, MA, U.S.A.) using a Waters 2487 Dual Absorbance Detector and a Waters 717 plus Autosampler or a VWR Chromaster (VWR, Radnor, PA, U.S.A.) with a 5160 pump system, using a DAD 5430 and 5260 Autosampler both equipped with a MultoHigh100 RP18-5 μ 250x4 mm column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) using a gradient (H₂O+0.1% formic acid/MeOH 80:20 isocratic for 5 min to MeOH after additional 45 min and MeOH for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm or using a gradient (H₂O+0.1% formic acid/MeOH 60:40 isocratic for 5 min to MeOH after additional 25 min and MeOH for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV-detection at 245 nm and 280 nm.

3.2 Synthesis and analytical characterization of 2-4 and their precursors

3-Oxo-3-((3-(2-(4-phenylthiazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)propanoic acid (2): Ethyl-3-oxo-3-((3-(2-(4-phenylthiazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)propanoate (**21**, 24.9 mg, 0.068 mmol, 1.00 eq) was dissolved in THF (10 mL). LiOH (8.14 g, 0.340 mmol, 5.00 eq) dissolved in water (10 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solvents were evaporated under reduced pressure, the residue was dissolved in H₂O, the product was precipitated by addition of 2 M aqueous hydrochloric acid, filtered off, washed with cold hexane and dried in vacuum. The product was purified by preparative HPLC to afford **2** as a colorless solid (0.01 g, 52%). ¹H NMR (500 MHz, acetone) δ = 10.36 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.49 – 8.45 (m, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.10 – 8.00 (m, 2H), 7.93 – 7.88 (m, 4H), 7.85 – 7.78 (m, 2H), 3.93 (s, 2H). ¹³C-NMR MS (126 MHz, acetone) δ = 168.90, 166.28, 165.22, 161.95, 155.86, 139.59, 136.52, 134.46, 134.06, 129.37, 128.72, 128.14, 126.28, 122.69, 121.72, 120.03, 117.90, 113.21, 42.80. MS (ESI⁺): m/z 364.95 ([M+H]⁺). HRMS (MALDI): m/z calculated for C₂₀H₁₇N₂O₃S 365.09544, found 365.09385 ([M+H]⁺).

3-((3-(2-(4-(*tert*-Butyl)thiazol-2-yl)ethyl)phenyl)amino)-3-oxopropanoic acid (3): Ethyl 3-((3-(2-(4-(*tert*-butyl)thiazol-2-yl)ethyl)phenyl)amino)-3-oxopropanoate (**23**, 39.2 mg, 0.100 mmol, 1.00 eq) was dissolved in THF (10 mL). LiOH (11.9 mg, 0.500 mmol, 5.00 eq) dissolved in water (10 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solvents were evaporated under reduced pressure, the residue was dissolved in H₂O, the product was precipitated by addition of 2 M aqueous hydrochloric acid, filtered off, washed with cold hexane and dried in vacuum. The product was purified by preparative HPLC to afford **3** as a colorless solid (0.01 g, 21%). ¹H NMR (500 MHz, acetone) δ = 9.98 (s, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.1, 1H), 7.68 (t, J = 7.8, 1H), 7.45 (d, J = 7.6, 1H), 7.39 (s, 1H), 3.94 (s, 2H), 3.72 (t, J = 7.8, 2H), 3.53 (t, J = 8.0, 2H), 1.76 (s, 9H). ¹³C-NMR (126 MHz, acetone) δ = 168.37, 165.77, 165.00, 141.60, 138.91, 128.72, 124.07, 119.54, 117.35, 109.58, 42.18, 35.57, 34.68.

MS (ESI⁺): *m/z* 347.19 ([M+H]⁺). HRMS (MALDI): *m/z* calculated for C₁₈H₂₃N₂O₃S 347.14239, found 347.14256 ([M+H]⁺).

3-((3-(2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)-2,2-dimethyl-3-oxopropanoic acid (4): Ethyl 3-((3-(2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)-2,2-dimethyl-3-oxopropanoate (**22**, 0.136 g, 0.300 mmol, 1.00 eq) was dissolved in THF (10 mL). LiOH (35.9 mg, 1.50 mmol, 5.00 eq) dissolved in water (10 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 12 h. The solvents were evaporated under reduced pressure, the residue was dissolved in H₂O, the product was precipitated by addition of 2 M aqueous hydrochloric acid, filtered off, washed with cold hexane and dried in vacuum. The isomeric mixture (yield 0.10 g, 71%; approx. *E/Z* = 7:3) was separated by preparative HPLC to afford the *E*-isomer of **4** as a yellow solid. ¹H NMR (500 MHz, Acetone) δ = 8.06 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.69 (d, *J*=7.9, 1H), 7.64 (d, *J*=1.9, 1H), 7.60 (dd, *J*=8.3, 2.0, 1H), 7.55 (d, *J*=16.2, 1H), 7.44 (d, *J*=13.2, 1H), 7.41 (d, *J*=4.7, 1H), 7.37 (d, *J*=7.9, 1H), 7.02 (d, *J*=8.3, 1H), 3.90 (s, 4H), 3.85 (s, 3H), 1.55 (s, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, Acetone) δ = 166.70, 156.85, 150.61, 150.47, 140.69, 137.33, 134.71, 130.05, 128.51, 126.65, 123.50, 122.64, 121.34, 119.78, 119.18, 112.74, 112.22, 111.07, 56.15, 56.12, 51.49, 24.01. MS (ESI⁺): *m/z* 452.99 ([M+H]⁺). HRMS (MALDI): *m/z* calculated for C₂₄H₂₅N₂O₅S 453.14787, found 453.14734 ([M+H]⁺).

2-Methyl-4-phenylthiazole (8): 2-Bromo-1-phenylethanone (**5**, 2.0 g, 10 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 100 mL), and thioacetamide (**7**, 0.75 g, 10 mmol, 1.0 eq) was added. The mixture was stirred under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, water (100 mL) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvents were evaporated under reduced pressure. **8** was obtained as a yellow solid and used without further purification (1.3 g, 74%); ¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ = 7.91 (s, 2H), 7.47 – 7.26 (m, 4H), 2.71 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ = 165.52, 153.79, 134.19, 128.76, 127.87, 125.94, 113.74, 18.95. MS (ESI⁺): *m/z* 176.09 ([M+H]⁺).

4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methylthiazole (9): 2-Bromo-1-(3,4-dimethoxyphenyl)ethanone (**6**, 0.78 g, 3.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 40 mL), and thioacetamide (**7**, 0.23 g, 3.0 mmol, 1.0 eq) was added. The mixture was stirred under reflux for 4 h. After cooling to room temperature, water (50 mL) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvents were evaporated under reduced pressure. **9** was obtained as a yellow solid and used without further purification (0.58 g, 82%); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 7.79 (s, 1H), 7.51 – 7.46 (m, 2H), 7.02 – 6.96 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.70 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ = 165.60, 154.33, 149.28, 149.16, 127.72, 118.95, 112.36, 112.30, 110.05, 55.99, 55.97, 19.40. MS (ESI⁺): *m/z* 236.11 ([M+H]⁺).

2-(3-Nitrostyryl)-4-phenylthiazole (12): 2-Methyl-4-phenylthiazole (**8**, 2.6 g, 15 mmol, 1.0 eq), 3-nitrobenzaldehyde (**11**, 6.8 g, 45 mmol, 3.0 eq) and sodium acetate (4.9 g, 60 mmol, 4.0 eq) were dissolved in glacial acetic acid (30 mL). The mixture was stirred under reflux for 10 h. After cooling to room temperature, aqueous sodium bisulfite solution was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:4) as mobile phase. **12** was obtained as a yellow solid (0.65 g, 14%); ¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ = 8.61 – 8.56 (m, 1H), 8.27 – 8.14 (m, 3H), 8.06 – 7.99 (m, 2H), 7.81 – 7.67 (m, 3H), 7.53 – 7.33 (m, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ = 165.74, 155.72,

148.91, 138.06, 134.36, 133.68, 132.08, 130.79, 129.32, 128.76, 126.62, 124.54, 123.61, 122.37, 115.56. MS (ESI⁺): *m/z* 308.97 ([M+H]⁺).

4-(*tert*-Butyl)-2-(3-nitrostyryl)thiazole (13): 4-*tert*-Butyl-2-methylthiazole (**10**, 1.6 g, 10 mmol, 1.0 eq), 3-nitrobenzaldehyde (**11**, 4.5 g, 30 mmol, 3.0 eq) and sodium acetate (3.3 g, 40 mmol, 4.0 eq) were dissolved in glacial acetic acid (20 mL). The mixture was stirred under reflux for 10 h. After cooling to room temperature, aqueous sodium bisulfite solution was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:15) as mobile phase. **13** was obtained as a yellow solid (0.64 g, 22%); ¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ = 8.53 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.23 – 8.12 (m, 2H), 7.75 – 7.54 (m, 3H), 7.31 (s, 1H), 1.33 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ = 166.93, 164.55, 148.42, 137.70, 133.04, 130.92, 130.27, 124.58, 122.95, 121.81, 112.18, 34.57, 29.97. MS (ESI⁺): *m/z* 289.16 ([M+H]⁺).

4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(3-nitrostyryl)thiazole (14): 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-methylthiazole (**9**, 2.5 g, 11 mmol, 1.0 eq), 3-nitrobenzaldehyde (**11**, 4.8 g, 32 mmol, 3.0 eq) and sodium acetate (3.5 g, 42 mmol, 4.0 eq) were dissolved in glacial acetic acid (22 mL). The mixture was stirred under reflux for 10 h. After cooling to room temperature, aqueous sodium bisulfite solution was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 30 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:3) as mobile phase. **14** was obtained as a yellow solid (0.95 g, 24%); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 8.58 (t, *J* = 1.9 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.19 – 8.17 (m, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.83 – 7.80 (m, 1H), 7.74 – 7.68 (m, 2H), 7.60 – 7.56 (m, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.81 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ = 164.99, 155.38, 149.05, 148.91, 148.43, 137.64, 133.18, 131.47, 130.33, 126.90, 124.21, 123.11, 121.93, 118.79, 113.38, 111.90, 109.81, 55.62, 55.56. MS (ESI⁺): *m/z* 368.94 ([M+H]⁺).

3-(2-(4-(*tert*-Butyl)thiazol-2-yl)vinyl)aniline (15): 4-(*tert*-Butyl)-2-(3-nitrostyryl)thiazole (**13**, 0.32 g, 1.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in ethanol (3 mL) and aqueous hydrochloric acid (3 mL), and was then treated with tin chloride (0.83 g, 4.4 mmol, 4.0 eq). The mixture was stirred at 65 °C until a clear solution had formed. After cooling to room temperature, ethanol was evaporated in vacuum and the remaining aqueous mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. **15** was obtained as a yellow solid (0.16 g, 55%) and used without further purification; ¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ = 7.23 (s, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.04 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.85 – 6.79 (m, 2H), 6.59 – 6.52 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 1.31 (s, 9H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ = 165.90, 149.43, 136.45, 135.48, 134.79, 129.80, 121.30, 115.63, 115.31, 112.61, 111.29, 34.97, 30.42. MS (ESI⁺): *m/z* 259.13 ([M+H]⁺).

3-(2-(4-Phenylthiazol-2-yl)vinyl)aniline (16): 2-(3-Nitrostyryl)-4-phenylthiazole (**12**, 0.22 g, 0.80 mmol, 1.0 eq) was dissolved in ethanol (3 mL) and aqueous hydrochloric acid (3 mL), and was then treated with tin chloride (0.61 g, 3.2 mmol, 4.0 eq). The mixture was stirred at 65 °C until a clear solution had formed. After cooling to room temperature, ethanol was evaporated in vacuum and the remaining aqueous mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. **16** was obtained as a yellow solid (0.13 g, 57%) and used without further purification; ¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ = 8.08 (s, 1H), 8.04 – 7.98 (m, 2H), 7.52 – 7.32 (m, 5H), 7.09 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.92 – 6.85 (m, 2H), 6.63 – 6.57 (m, 1H), 5.23 (s, 2H). ¹³C-NMR

(75 MHz, Acetone) δ = 166.53, 155.94, 155.80, 136.49, 135.06, 134.91, 128.66, 128.11, 128.04, 126.27, 118.72, 115.94, 113.08, 112.64, 110.46. MS (ESI⁺): m/z 279.03 ([M+H]⁺).

3-(2-(4-(3,4-Dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl)vinyl)aniline (17): 4-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(3-nitrostyryl)thiazole (**14**, 0.958 g, 2.60 mmol, 1.00 eq) was dissolved in ethanol (10 mL) and aqueous hydrochloric acid (10 mL), and was then treated with tin chloride (1.90 g, 10.4 mmol, 4.00 eq). The mixture was heated at 80 °C until a clear solution had formed. After cooling to room temperature, ethanol was evaporated in vacuum and the remaining aqueous mixture was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄ and the solvent was evaporated under reduced pressure. **17** was obtained as a yellow solid (0.57 g, 66%) and used without further purification. ¹H NMR (250 MHz, DMSO) δ = 7.94 (s, 1H), 7.58 – 7.52 (m, 2H), 7.34 (s, 2H), 7.12 – 7.00 (m, 2H), 6.90 – 6.83 (m, 2H), 6.61 – 6.54 (m, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H). ¹³C-NMR (126 MHz, DMSO) δ = 165.92, 155.01, 148.95, 148.88, 135.95, 134.94, 129.41, 127.04, 120.53, 118.73, 115.42, 115.11, 112.36, 112.15, 111.88, 109.76, 55.60, 55.55. MS (ESI⁺): m/z 338.96 ([M+H]⁺).

3-(2-(4-(*tert*-Butyl)thiazol-2-yl)ethyl)aniline (18): 3-(2-(4-(*tert*-Butyl)thiazol-2-yl)vinyl)aniline (**15**, 163 mg, 0.631 mmol, 1.00 eq) was dissolved in ethanol (20 mL) and Pd(C) (loading 10%w/w, 6.71 g, 0.063 mmol, 0.100 eq) was added. The suspension was stirred at room temperature under H₂ atmosphere for 18 h. The mixture was then filtered through celite, the filtrate was dried over MgSO₄, and the solvent was evaporated under reduced pressure to obtain **18** as yellow solid (0.15 g, 94%). **18** was used without further purification. ¹H NMR (250 MHz, acetone) δ = 7.00 – 6.90 (m, 2H), 6.58 – 6.56 (m, 1H), 6.52 – 6.46 (m, 2H), 3.24 – 3.17 (m, 2H), 2.97 – 2.91 (m, 2H), 1.32 (s, 9H). ¹³C-NMR (75 MHz, acetone) δ = 168.75, 165.80, 148.42, 141.49, 128.90, 117.12, 114.45, 112.32, 109.41, 35.81, 34.73, 34.44. MS (ESI⁺): m/z 261.20 ([M+H]⁺).

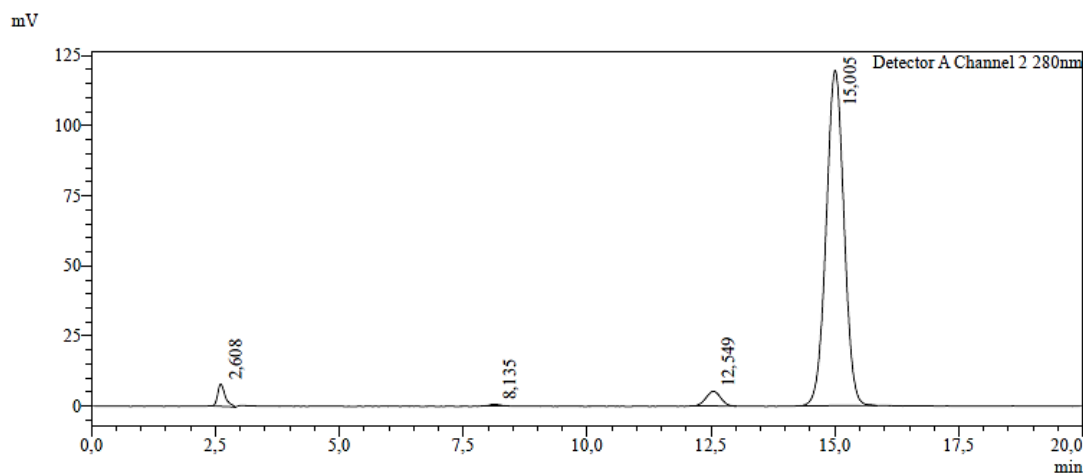
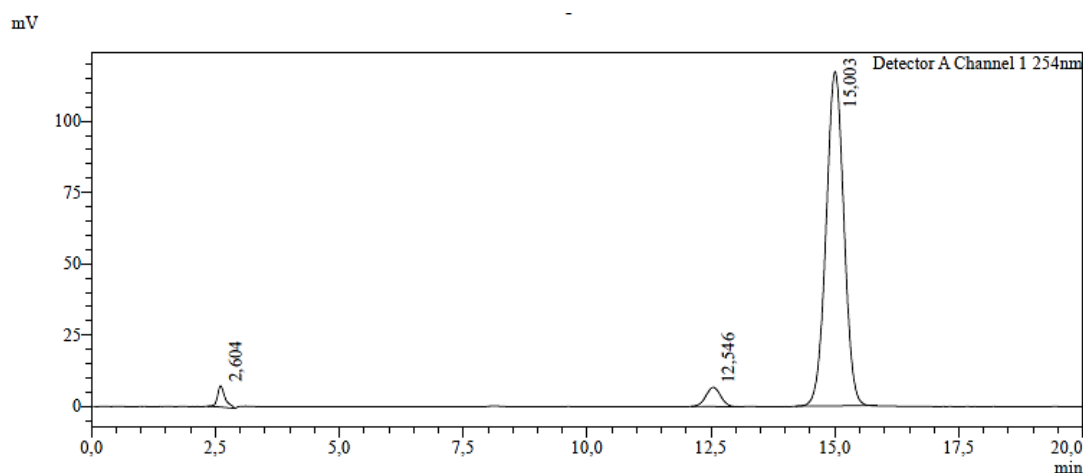
Ethyl 3-oxo-3-((3-(2-(4-phenylthiazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)propanoate (21): 3-Ethoxy-3-oxopropanoic acid (**19**, 71.2 mg, 0.539 mmol, 1.00 eq) was dissolved in chloroform (8 mL). EDC·HCl (124 mg, 0.647 mmol, 1.20 eq), 4-DMAP (98.8 mg, 0.809 mmol, 1.50 eq) and 3-(2-(4-phenylthiazol-2-yl)vinyl)aniline (**16**, 218 mg, 0.647 mmol, 1.20 eq) were added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 12 h. Hydrochloric acid (5%, 20 mL) was then added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:5) as mobile phase. **21** was obtained as a yellow solid (30 mg, 14%); ¹H-NMR (250 MHz, acetone) δ = 8.02 – 7.92 (m, 3H), 7.82 – 7.70 (m, 3H), 7.44 – 7.28 (m, 5H), 7.05 – 6.91 (m, 2H), 4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.46 (s, 2H), 1.23 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, acetone) δ = 177.93, 166.54, 164.41, 158.23, 140.44, 137.91, 135.43, 130.13, 129.62, 128.96, 127.25, 127.16, 125.08, 124.91, 120.61, 120.28, 115.22, 61.66, 44.46, 14.49. MS (ESI⁺): m/z 415.12 ([M+Na]⁺).

Ethyl 3-((3-(2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl)vinyl)phenyl)amino)-2,2-dimethyl-3-oxopropanoate (22): 3-Ethoxy-2,2-dimethyl-3-oxopropanoic acid (**20**, 0.22 g, 1.4 mmol, 1.0 eq) was dissolved in chloroform (40 mL). EDC·HCl (0.38 g, 2.0 mmol, 1.4 eq), 4-DMAP (0.26 g, 2.1 mmol, 1.5 eq) and 3-(2-(4-(3,4-dimethoxyphenyl)thiazol-2-yl)vinyl)aniline (**17**, 0.57 g, 1.7 mmol, 1.2 eq) were added. The reaction mixture was stirred at 70 °C for 16 h. Hydrochloric acid (5%, 20 mL) was then added, phases were separated, and the product was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvents were evaporated in vacuum. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:1) as mobile phase. **22** was obtained as a yellow solid (0.19 g, 28%); ¹H-NMR (250 MHz, DMSO) δ = 9.53 (s, 1H), 8.03 – 7.94 (m, 2H), 7.63 – 7.52 (m, 3H), 7.51 –

7.41 (m, 3H), 7.40 – 7.32 (m, 1H), 7.03 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.14 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 1.46 (s, 6H), 1.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO) $\delta = 173.13, 170.68, 162.76, 154.15, 148.87, 148.83, 139.34, 136.26, 134.47, 128.82, 126.87, 123.77, 123.49, 120.47, 120.17, 118.56, 113.60, 111.86, 109.60, 60.67, 55.56, 55.53, 50.73, 23.00, 13.96$. MS (ESI⁺): m/z 481.10 ([M+H]⁺).

Ethyl 3-((3-(2-(4-(*tert*-butyl)thiazol-2-yl)ethyl)phenyl)amino)-3-oxopropanoate (23): 3-Ethoxy-3-oxopropanoic acid (**19**, 57.0 mg, 0.431 mmol, 1.00 eq) was dissolved in chloroform (8 mL). EDC·HCl (100 mg, 0.517 mmol, 1.20 eq), 4-DMAP (79.0 mg, 0.647 mmol, 1.50 eq) and 3-(2-(4-(*tert*-butyl)thiazol-2-yl)ethyl)aniline (**18**, 175 mg, 0.520 mmol, 1.20 eq) were added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 16 h. Hydrochloric acid (5%, 20 mL) was then added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:3) as mobile phase. **23** was obtained as a yellow solid (41 mg, 25%); $^1\text{H NMR}$ (250 MHz, acetone) $\delta = 7.56$ (s, 1H), 7.50 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.22 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.45 (s, 2H), 3.31 – 3.21 (m, 2H), 3.13 – 3.02 (m, 2H), 1.31 (s, 9H), 1.24 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, acetone) $\delta = 168.28, 165.86, 163.66, 141.58, 139.13, 128.69, 123.87, 119.37, 117.16, 109.51, 60.68, 36.34, 35.58, 34.72, 34.44, 13.54$. MS (ESI⁺): m/z 375.26 ([M+H]⁺).

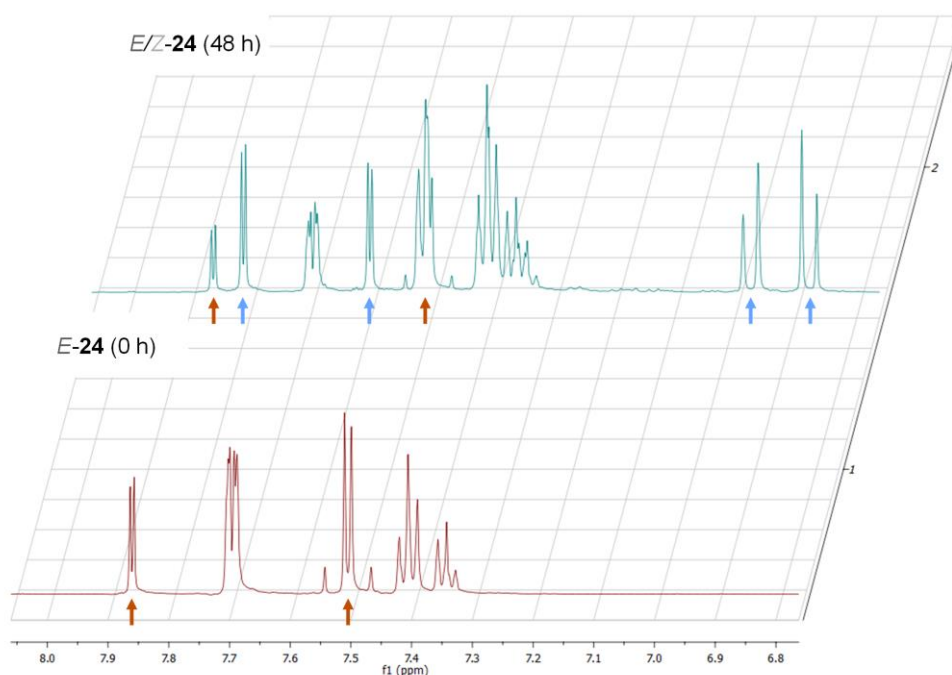
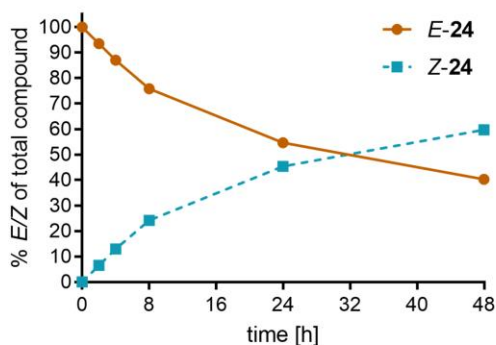
HPLC of **4** (Acetonitrile/H₂O (50:50) + 0.1 formic acid, isocratic for 20 min, 1 mL/min; UV 245 nm and 280 nm. RT 12.549 min: *Z*-**4** (4.4%); RT 15.005 min: *E*-**4** (93.1%)):



3.3 Evaluation of *E/Z*-isomerism using (*E*)-2-styrylthiazole as model compound

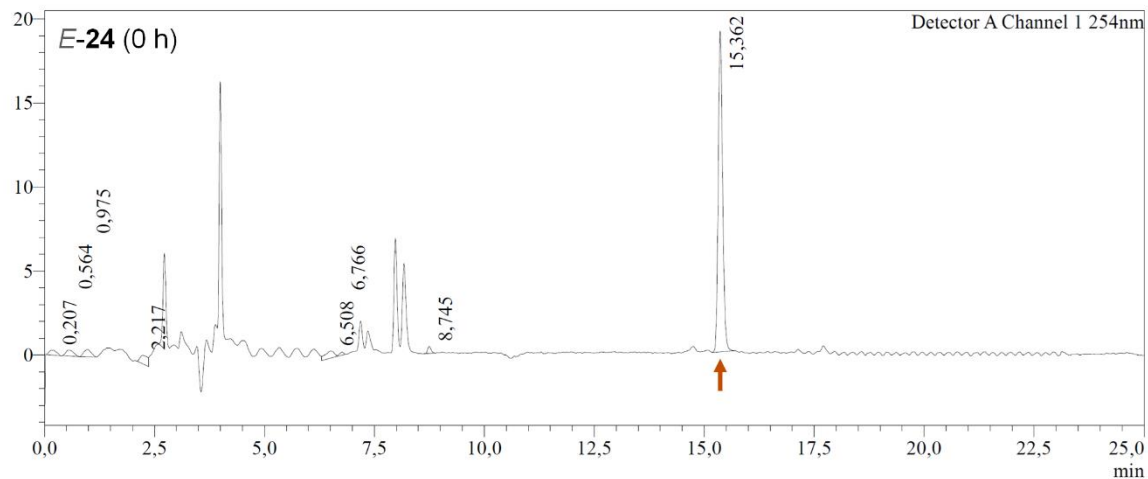
Synthesis of (*E*)-2-styrylthiazole (**24**): To a solution of (*E*)-styrylboronic acid (0.19 g, 1.3 mmol, 1.2 eq), 2-bromothiazole (0.18 g, 1.1 mmol, 1.0 eq) and sodium carbonate (0.35 g, 3.3 mmol, 3.0 eq) in dioxane/H₂O (4:1) was added Pd(PPh₃)₄ (0.13 g, 0.11 mmol, 0.10 eq). The reaction mixture was stirred at 100 °C for 6 h and then filtered through celite. The filtrate was dried over MgSO₄, and the solvent was evaporated in vacuum. H₂O (20 mL) and ethyl acetate (20 mL) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over MgSO₄, the solvents were evaporated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography using ethyl acetate/hexane (1:3) as mobile phase. **24** was obtained as a colorless solid (0.18 g, 90%); ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ = 7.86 (d, *J*=3.2, 1H), 7.71 – 7.68 (m, 3H), 7.53 (d, *J*=16.3, 1H), 7.48 (d, *J*=16.3, 1H), 7.42 – 7.39 (m, 2H), 7.36 – 7.32 (m, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ = 166.13, 143.67, 135.57, 133.70, 128.90, 128.88, 127.25, 121.39, 119.84. MS (ESI⁺): *m/z* 188.16 ([M+H]⁺).

24 was used to study light-dependent *E/Z*-isomerism of the styrylthiazole moiety in **1**, **2** and **4**. The UV absorption spectrum of **24** was determined and revealed a maximum absorption at λ = 308 nm. **24** was then irradiated with at λ = 310 nm and the *E/Z*-isomerism was monitored over 48 h by ¹H-NMR. Marked formation of the *Z*-isomer was observed over time:

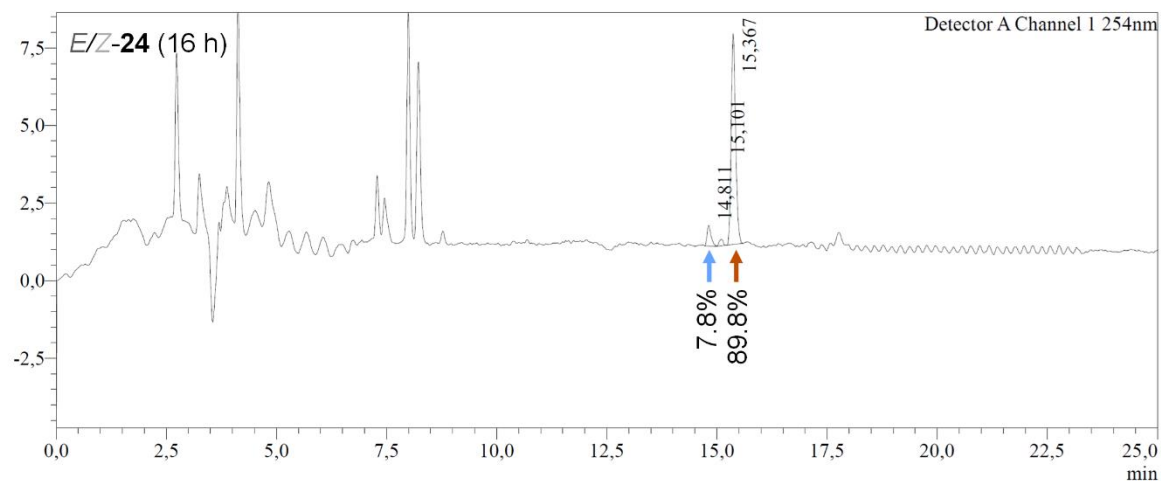


In contrast to light irradiation, the incubation conditions of the reporter gene assay (see 4.1) did not induce marked formation of the *Z*-isomer (incubation of *E*-**24** in assay medium at 37°C for 16 h followed by HPLC analysis) suggesting that isomerism in the assay had no significant impact on the biological results:

mV



mV



4 Methods for *in vitro* pharmacological characterization

4.1 Hybrid reporter gene assay for PPAR α : *Plasmids:* The Gal4-fusion receptor plasmid pFA-CMV-hPPAR α -LBD^[9] coding for the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the canonical isoform of the nuclear receptor has been reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) served for normalization of transfection efficiency and cell growth. *Assay procedure:* HEK293T cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 μ g/mL) at 37 °C and 5% CO₂. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (3·10⁴ cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega) and the corresponding Gal4-fusion nuclear receptor plasmid. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (14-16 h) incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. The hybrid assay was validated with reference agonist GW7647 which yielded an EC₅₀ value in agreement with literature.

4.2 CysLT₁R antagonism assay: CysLT₁R antagonism of **1** and **4** at the concentrations 0.001 μ M, 0.01 μ M and 0.1 μ M was determined in a cell-based (CHO-K1 cells) Ca²⁺-flux assay on human CysLT₁R in competition with 0.1 nM leukotriene D4. All experiments were conducted in two independent repeats. The assay was conducted by Cerep (France - Celle L'Evescault, <https://www.eurofins.com>; assay reference number 1607) on a fee-for-service basis.

4.3 Determination of aqueous solubility: Aqueous solubility of compounds **1** and **4** was determined using Whatman Uniprep filters (Whatman plc, Maidstone, UK). 3 mg of each compound and 2 mL H₂O dest. were inserted into the Uniprep vessel and the mixture was shaken at 37 °C for 24 h. The mixture was then pressed through the Uniprep filter and the concentration of dissolved compound in filtrate was quantified by HPLC (Waters 600 Controller and Waters 2487 Dual Absorbance Detector equipped with a MultoHigh100 Phenyl 5 μ 240+4 mm column, CS-Chromatographie Service GmbH) using external calibration.

4.4 Determination of logP: LogP values of **1** and **4** were determined by HPLC analysis using a VWR Hitachi Chromaster System with DAD 5430. The HPLC column was a MultoHigh 100RP18 (4,6 mm I.D., 250 mm length, 5 μ particle size) from Chromatographie-Service GmbH (Langerwehe, Germany). A linear gradient was used with mobile phase A as 100% acetonitrile, and mobile phase B as 100% 10 mM ammonium acetate (adjusted to pH 7.4 with ammonium hydroxide and acetic acid). The gradient table was: 0 min/ 5% A, 2.0 min/ 5% A, 12.0 min/ 95% A, 20 min/ 95% A, 30 min/ 5% A, 35 min/ 5% A. Flow rate was 0.5 ml/min, and UV spectra were collected at 254 nm and 280 nm. The samples were dissolved in DMSO at 30 μ M and 50 μ L were injected.

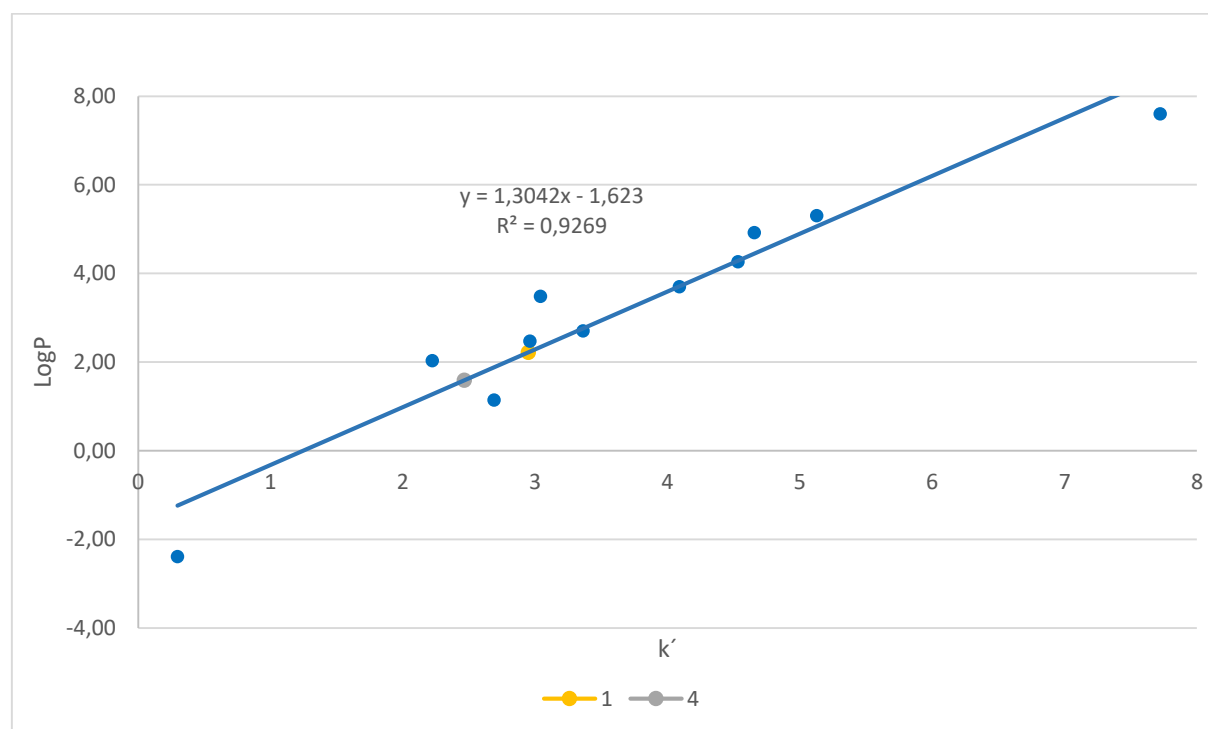
The HPLC capacity factor k' was determined according to:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

Where t_R is the retention time and t_0 the retention time of the unretained reference compound (thiourea). The logP was calibrated to k' by running 11 reference compounds (see below) and plotting k' versus literature logP values.^[10] All determinations were performed three times.

Reference compounds:

Compound	t_R [min.]	k'	logP (literature)	logP (calculated)	$\Delta\log P$
Thiourea	3,14				
Levodopa	0,929	0,295753715	-2,39	-1,24	-1,15
Chloramphenicol	8,441	2,688269639	1,14	1,88	-0,74
Furosemide	6,975	2,221178344	2,03	1,27	0,76
Phenytoin	9,289	2,958280255	2,47	2,24	0,23
Albendazol	10,551	3,360031847	2,70	2,76	-0,06
Propranolol	9,544	3,039596603	3,48	2,34	1,14
Amodiaquine	12,836	4,087845011	3,70	3,71	-0,01
Lovastatine	14,229	4,531422505	4,26	4,29	-0,03
Amitriptyline	14,616	4,654670913	4,92	4,45	0,47
Fenofibrate	16,096	5,125955414	5,30	5,06	0,24
Clofazimine	24,249	7,722717622	7,60	8,45	-0,85
1	9,251	2,946178344		2,22	
4	7,737	2,463906582		1,59	



5 Supplementary references

- [1] J. C. dos Santos, A. Bernardes, L. Giampietro, A. Ammazalorso, B. De Filippis, R. Amoroso, I. Polikarpov, *J. Struct. Biol.* **2015**, *191*, 332–340.
- [2] RDKit: Open-source cheminformatics, <http://www.rdkit.org> n.d.
- [3] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–12.
- [4] A. P. Bento, A. Gaulton, A. Hersey, L. J. Bellis, J. Chambers, M. Davies, F. A. Krüger, Y. Light, L. Mak, S. McGlinchey, et al., *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, D1083-90.
- [5] J. L. Durant, B. A. Leland, D. R. Henry, J. G. Nourse, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1273–1280.
- [6] H. L. Morgan, *J. Chem. Doc.* **1965**, *5*, 107–113.
- [7] R. E. Carhart, D. H. Smith, R. Venkataraghavan, *J. Chem. Inf. Model.* **1985**, *25*, 64–73.
- [8] D. Ballabio, F. Grisoni, R. Todeschini, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2018**, *174*, 33–44.
- [9] O. Rau, M. Wurglics, A. Paulke, J. Zitzkowski, N. Meindl, A. Bock, T. Dingermann, M. Abdel-Tawab, M. Schubert-Zsilavec, *Planta Med.* **2006**, *72*, 881–887.
- [10] S. Kim, P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He, B. A. Shoemaker, et al., *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1202–D1213.