

# Selbstorganisierende Karten zur Erkennung von Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

**Janosch Achenbach**

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main (2014) (D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Thomas Prisner

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Jun. Prof. Dr. Ewgenij Proschak

Datum der Disputation:

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
Einleitung.....	8
Polypharmakologie – Verstehen und Vorhersagen.....	9
Molekulare Eigenschaften .....	9
Target-Ähnlichkeit .....	13
In silico Vorhersage von Polypharmakologie .....	14
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung .....	20
Polypharmakologie in der Onkologie.....	20
Polypharmakologie der Neuroleptika .....	22
Polypharmakologie in der Arachidonsäurekaskade .....	25
Drug Repositioning .....	42
Ergebnisse und Diskussion.....	49
Duale sEH/5-LO-Liganden.....	50
Paper I: Dual-Target Virtual Screening by Pharmacophore Elucidation and Molecular Shape Filtering. ....	51
Paper II: Exploring the Chemical Space of Multitarget Ligands Using Aligned Self- Organizing Maps. ....	54
Farnesoid X Rezeptor Agonisten.....	58
Paper III: Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity. ....	58
Paper IV: Identification of novel farnesoid X receptor modulators using a combined ligand- and structure-based virtual screening. ....	62
Zusammenfassung.....	65
Referenzen .....	70
Danksagung .....	87
Eidesstattliche Erklärung .....	88

Curriculum vitae .....	89
Publikationsliste .....	91
Publikationen.....	95

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
5-LO	5-Lipoxygenase
AA	Arachidonsäure
ABL	Abelson murine leukemia
AUDA	12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid
BCR	Breakpoint cluster region
BLAST	Basic local alignment search tool
BSEP	Bile salt export pump
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
CDCA	Chenodeoxycholinsäure
c-KIT	Tyrosinkinase KIT
clogP	Octanol-Wasser Koeffizient
CLP	Coactosin-like Protein
CML	Chronische Myeloische Leukämie
COX	Cyclooxygenase
CYP450	Cytochrom P450
Cys-LT	Cysteinyl-LT
DBD	DNS-Bindedomäne
DCA	Deoxycholinsäure
DHA	Docosahexaensäure
DHET	Dihydroxyeicosatriensäure
DPP	Dipeptidyl Peptidase
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EET	Epoxyeicosatriensäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FLAP	5-LO aktivierendes Protein
Flt-3	Fms-like Tyrosine Kinase 3
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HAD	Haloacide dehalogenase
HepG2	Heptacellular carcinoma
hERG	human Ether-a-go-go Related Gene
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraensäure
HTS	High Throughput Screening
LA	Linolsäure
LBD	Liganden-Bindedomäne
LCA	Lithocholinsäure
LDL	Low density lipoprotein

Abkürzung	Bedeutung
LOOH	Lipidperoxydation
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharid
LRH	Liver receptor homologue
LT	Leukotriene
LX	Lipoxine
MCEP	Monocyte chemotactic protein
MDDR	MDL Drug Data Report
MK	MAP Kinase
MM6	Mono Mac 6
MOE	Molecular Operating Environment
mRCC	Metastatic renal cell carcinoma
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
PDB	Protein Database
PDE	Phosphodiesterase
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDSP	Psychoactive Drug Screening Program
PG	Prostaglandin
PKA	Protein Kinase A
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PMNL	Polymorphonuclear leucocyte
pNET	Primitiv neuroektodermaler Tumor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RET	Rearranged during transfection
RMSD	Root mean square deviation
RXR	Retinoid X Rezeptor
SEA	Similarity Ensemble Approach
sEH	Soluble Epoxidhydrolase
SHP	Small heterodimer partner
SOM	Selbst-organisierende Karte
SOSA	Selective optimization of side activities
STD-NMR	Saturation transfer difference NMR
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
VCAM	Vesicular cell-adhasion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor $\alpha$
VLDL	Very low density lipoprotein
WOMBAT	World of Molecular Bioactivity

## Einleitung

Die Wirkstoffentwicklung der letzten Jahrzehnte wurde von dem „Ein Wirkstoff – eine Zielstruktur – eine Krankheit“ Paradigma geleitet. Diesem Prinzip liegt zu Grunde der Ansatz, dass man mit einem pharmakologischen Wirkstoff selektiv eine Zielstruktur im Körper adressiert um ein bestimmtes Krankheitsbild zu behandeln. Bei der Zielstruktur, im Folgenden als „Target“ (zu dt.: Ziel) bezeichnet, handelt es sich typischer Weise um Proteine, wie z. B. Enzyme, Ionenkanäle oder Rezeptoren.

Diesem Ansatz folgend lag der Fokus der Wirkstoffforschung auf der Identifizierung potenter Wirkstoffkandidaten, die eine selektive Wirkung auf ein wohldefiniertes Target aufweisen. Der Mangel an finanziellen Ressourcen und technischen Möglichkeiten führte dazu, dass diese Kandidaten neben ihrer biologischen Aktivität auf das untersuchte Target nur auf eine beschränkte Anzahl, meist phylogenetisch verwandte, Targets *in vitro* oder *in vivo* getestet wurden. Eine systematische Abdeckung eines breiten Spektrums biologischer Targets war nicht üblich. Diese Herangehensweise führte zwangsläufig zu einer unvollständigen Aufklärung des Wirkprofils der untersuchten Wirkstoffe und daraus resultierend zu einer beschränkten Auffassung von Wirkstoff-Selektivität. Gleichzeitig stieg in den 90er Jahren die Anzahl an Wirkstoffen, die auf Grund von schweren Nebenwirkungen nachträglich vom Markt genommen werden mussten. Diese Nebenwirkungen wurden unter anderem auf unerwünschte Interaktionen mit unvorhergesehenen bzw. unbeabsichtigten Targets, im Folgenden als „off-Target“ (dt.: Neben-Ziel) bezeichnet, zurückgeführt. Zu diesen spezifischen off-Targets gehören z.B. der Serotonin Rezeptor 5HT<sub>2B</sub><sup>1,2</sup>, der hERG-Kanal<sup>3</sup> oder auch der muskarinerge M<sub>2</sub>-Rezeptor<sup>4</sup>(ref), welche zu schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) führen können. Sowohl die Analyse der massiv steigenden Anzahl frei-zugänglicher Daten zu gemessenen, biologischen Aktivitäten potentieller Wirkstoffe, als auch die Ergebnisse klinischer Studien, bestätigen dieses unzureichende Verständnis der Wirkweise und Selektivität vieler pharmakologischer Wirkstoffe.

Eine Großzahl schwerer Erkrankungen, wie z.B. Krebs, psychische Störungen oder kardiovaskuläre Erkrankungen sind oftmals nicht durch einen einzelnen biologischen Defekt zu erklären, sondern erst das Zusammenspiel komplexer und meist vernetzter Fehlfunktionen ergeben das uns bekannte Krankheitsbild.<sup>5,6</sup> Es konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl bereits auf dem Markt befindlicher Wirkstoffe mit

mehreren Targets in pharmakologisch relevanten Konzentrationen interagieren, wohingegen selektive Wirkstoffe eher eine Ausnahme als die Regel bilden.<sup>7-10</sup> Diese Erkenntnisse können zum Verständnis möglicher Nebeneffekte beitragen und eröffnen gleichzeitig neue Wege in der Wirkstoffentwicklung. Zum einen lässt sich die Wirksamkeit vieler Wirkstoffe nun besser über ein solches „multi-Target“ Profil erklären, zum anderen können solche, oftmals als „dirty drugs“ (engl.: schmutzige Wirkstoffe) bezeichnete, promiskuitive Verbindungen als vielversprechender Startpunkt für gänzlich neue Indikationen dienen. Letzteres wird auch als „Drug Repositioning“ oder „Drug Repurposing“ bezeichnet.

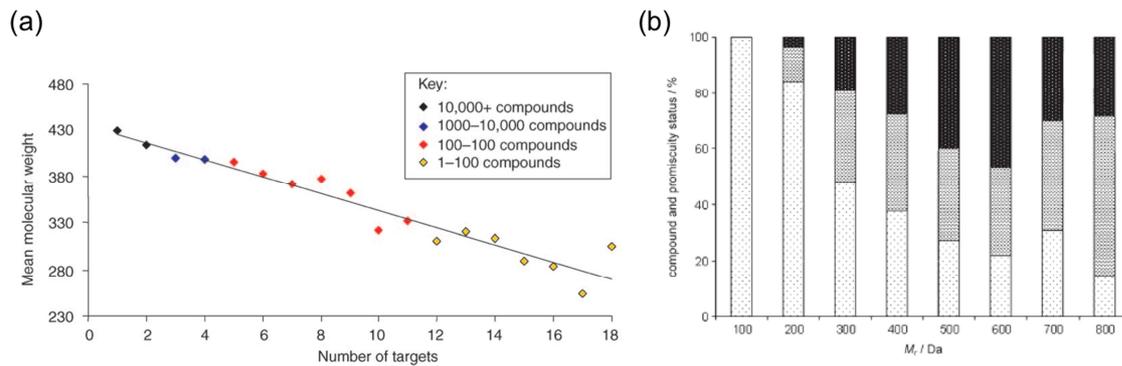
## **Polypharmakologie – Verstehen und Vorhersagen**

Das Verständnis von multitarget Wirkstoffen und den daraus resultierenden Bestrebungen zum rationalen Design neuer multitarget-Liganden wird durch den wachsenden Forschungsbereich der Polypharmakologie<sup>11</sup> untersucht. Sowohl das Verständnis der molekularen Grundlagen eines promiskuitiven Liganden als auch der strukturellen und funktionellen Zusammenhänge der beteiligten Targets ist für die gezielte Entwicklung eines multi-Target Wirkstoffes essentiell.

### **Molekulare Eigenschaften**

Die steigende Anzahl an HTS (High Throughput Screening) - und Safety-Panel Datensätzen ermöglicht eine systematische Analyse promiskuitiver Liganden. Durch die Korrelation von pharmakologischer Promiskuität mit den physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Liganden, wie Molekulargewicht, Lipophilie oder Ionisierungszustand, können Zusammenhänge abgeleitet und untersucht werden.

Hopkins et al. konnten anhand eines HTS-Datensatzes der Firma Pfizer mit über 75.000 Liganden zu 220 Targets eine Korrelation zwischen Promiskuität und Molekulargewicht nachweisen.<sup>12,13</sup> Sie konnten zeigen, dass die Promiskuität mit steigendem Molekulargewicht abnimmt (Abb. 1a).



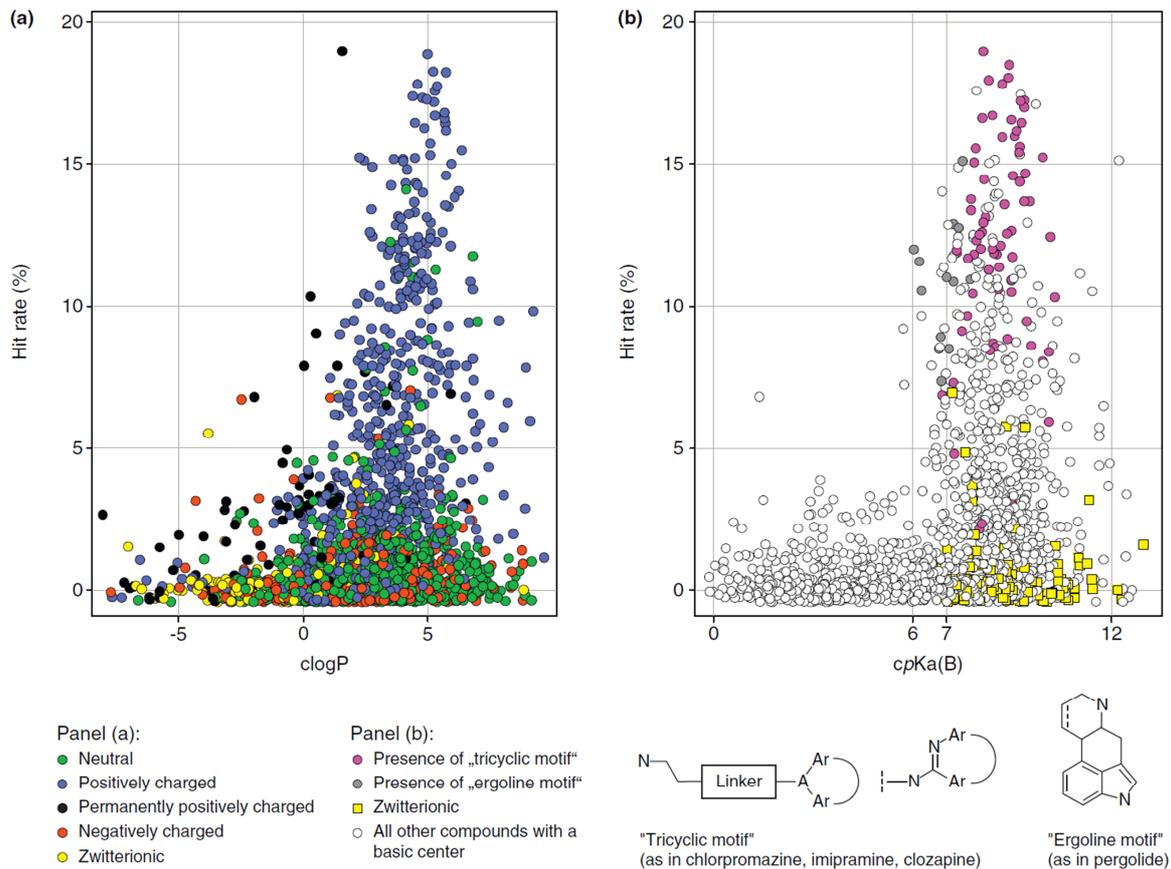
**Abb. 1:** a) Analyse des Pfizer Datensatzes - Korrelation zwischen durchschnittlichem Molekulargewicht und Anzahl bekannter Targets mit einer gemessenen Aktivität  $IC_{50} < 10 \mu M$ . b) Analyse des Roche Safety Panel Datensatzes - Korrelation zwischen Molekulargewicht und Promiskuität: schwarz = promiskuitive, grau = schwach promiskuitiv, weiß = selektive Verbindungen.

Weitere Studien, basierend auf Safety Panel Datensätzen von Novartis (Abb. 1b) und HTS Datensätzen von Roche, zeigen jedoch auch gegensätzliche Ergebnisse, nämlich dass die Promiskuität mit steigendem Molekulargewicht zunimmt.<sup>14-16</sup> Die Auswahl der untersuchten Datensätze scheint dabei einen starken Einfluss zu haben, weshalb eine abschließende und eindeutige Aussage über die Beziehung zwischen Promiskuität und Molekulargewicht bisher nicht erfolgen kann. Mestres et al. untersuchten daher den Zusammenhang zwischen Promiskuität und chemischer Komplexität. Dazu fragmentierten sie ca. 365.000 frei zugängliche Strukturen in silico nach fest definierten Regeln und klassifizierten die einzelnen Fragmente in Komplexitäts-Stufen. Diese Fragmente wurden dann in bekannten Liganden gesucht und ihre Zusammensetzung und Häufigkeit mit der Promiskuität der Liganden in Beziehung gesetzt. Diese Studie kommt zu dem Schluss, dass die durchschnittliche Promiskuität mit steigender Komplexität abnimmt.<sup>11</sup> Diese Annahme deckt sich mit der Hypothese von Hann et al., die besagt, dass die Wahrscheinlichkeit einer Protein-Ligand-Interaktion eines zufälligen Liganden drastisch mit der Komplexität des Liganden fällt. Des Weiteren wurden die Veränderungen zwischen Leitstrukturen und den daraus optimierten Kandidaten untersucht und dies führte zu dem Schluss, dass weniger komplexe Liganden für die Leitstruktur-Findung bevorzugt werden sollten.<sup>17</sup> Diese Erkenntnisse spiegeln sich in einem stetig wachsenden Trend der Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung wieder. Dabei verspricht man sich höhere Erfolgchancen in der Leitstruktur-Findung, in dem man zunächst Strukturen mit geringer Komplexität, also einem Molekulargewicht  $< 300$  Da sucht und als Startpunkt für neue, komplexere Leitstrukturkandidaten verwendet.<sup>18-20</sup> Promiskuität lässt sich

also durch das Molekulargewicht alleine kaum ausreichend erklären oder vorhersagen, jedoch scheint die Komplexität eines Liganden in einem Zusammenhang damit zu stehen.

Hopkins et al. konnten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen Lipophilie und Promiskuität von Liganden zeigen.<sup>13</sup> Dazu wurden die Daten eines „BioPrint full matrix“ Datensatzes<sup>21</sup> bestehend aus ca. 2500 Liganden mit Bindungsdaten zu diversen GPCRs, Enzymen, Ionenkanälen und Transportern analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die meisten Verbindungen, die mehr als zehn unterschiedliche Targets mit einer Affinität  $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$  binden, einen berechneten Oktanol-Wasser-Koeffizient (clogP) von über 2,5 - 3 besitzen. Nachfolgende Studien von Peters et al. ergänzten diese Erkenntnisse, durch die Aussage, dass der Ionisierungszustand der Liganden zusätzlich einen maßgeblichen Einfluss auf die Promiskuität zu haben scheint.<sup>16</sup> Sie konnten zeigen, dass ein großer Anteil der promiskuitiven Liganden nicht nur einen clogP-Wert  $> 3$  aufwies sondern sehr häufig auch zusätzlich eine positive Ladung bzw. einen  $pK_a[B] > 6$  unter physiologischen Bedingungen besaßen (Abb. 2). Des Weiteren konnten Sie in promiskuitiven Verbindungen bestimmte Strukturmerkmale, z.B. trizyklische Motive, wie in Chlorpromazin oder Clozapin oder tetrazyklische Ergolin-Motive, wie in Pergolid (Abb. 2b).

Einleitung:  
Polypharmakologie – Verstehen und Vorhersagen

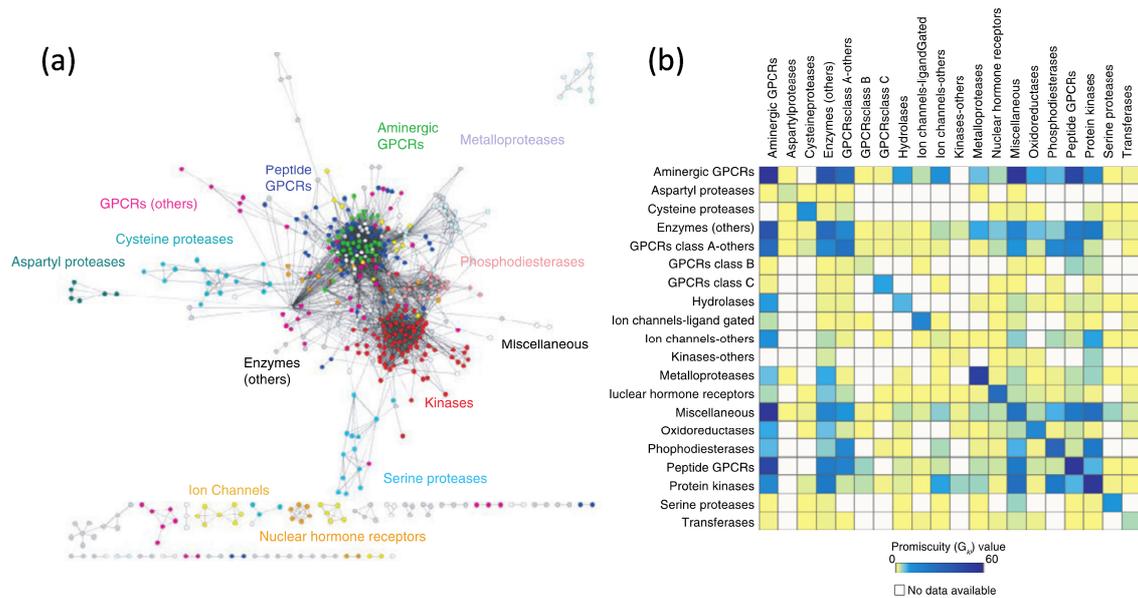


**Abb. 2:** Zusammenhang zwischen Hit Raten und molekularen Eigenschaften, bzw. strukturellen Motiven: a) Die Hit Rate steigt bei Molekülen mit einem  $\text{clogP} > 1$  und positiver Ladung deutlich an. b) Ebenfalls führt eine hohe Basizität von  $\text{cpKa}(\text{B}) > 6$  zu einem Anstieg der gemessenen Hit Rate. Bestimmte Strukturmerkmale, z.B. tricyclische Motive (typisch für aminerge Verbindungen) führen häufig zu promiskuitiven Verbindungen, wo hingegen Motive mit einer zusätzlichen negativen Ladung (z.B. Zwitterionen) eher selten in promiskuitiven Verbindungen zu finden sind.

Sie verweisen aber gleichermaßen darauf, dass diese Liganden häufig mit speziellen Targets, wie aminergen GPCRs, Ionenkanälen oder Opioid Rezeptoren interagieren, welche in solchen Safety Panel Datensätzen häufig überrepräsentiert sind. Die Ergebnisse sind aus diesem Grund kritisch zu betrachten.

## Target-Ähnlichkeit

Die Ursachen für Polypharmakologie liegen jedoch nicht nur in spezifischen physiochemischen Eigenschaften der Liganden, die Verwandtschaft und Ähnlichkeit der Targets spielt ebenfalls eine maßgebliche Rolle. Phylogenetisch verwandte Targets, die eine hohe Sequenzidentität aufweisen, stellen eine häufige Ursache für Polypharmakologie dar. Um Zusammenhänge zwischen Promiskuität und Target-Familien genauer zu untersuchen wurden von Mestres et al. so genannte Drug-Target-Netzwerke erstellt (Abb. 3a).<sup>10</sup>



**Abb. 3:** a) Humanes Drug-Target Netzwerk. Zwei Proteine wurden genau dann mit einer Kante verbunden, wenn sie mehr als ein gemeinsames Molekül binden (mit einem gemessenen Bindungsunterschied von maximal drei logarithmischen Einheiten). b) Grad der Promiskuität innerhalb und zwischen verschiedenen genetisch verwandten Proteinfamilien. Der Grad der Promiskuität wird durch das Verhältnis der Anzahl gemeinsam bindender Moleküle zur Gesamtanzahl gemessener Moleküle für jedes Target Paar repräsentiert und über alle Targets der jeweilig betrachteten Proteinfamilie aufsummiert.

Dazu wurden 480 Targets in die vier Target-Familien Enzyme (ausgenommen Kinasen), Ionen-Kanäle/Transporter, nukleäre Rezeptoren und GPCRs klassifiziert. Daraufhin wurden 802 Wirkstoffe den jeweiligen Target-Familien zugeordnet, wenn es eine experimentell bestätigte Interaktion zwischen einem Wirkstoff und einem Target der jeweiligen Familie gab. Für jede Familie wurden die Interaktionen in einem entsprechenden Drug-Target-Netzwerk dargestellt. Im Falle der Enzym-Familie kam man auf durchschnittlich 2,6 Interaktionen pro Wirkstoff, d.h. jeder Wirkstoff interagiert im Durchschnitt mit 2,6 Targets dieser Familie. Für die Ionenkanäle und nukleären Rezeptoren ergaben sich durchschnittlich 2,3 und 2,0 bekannte

Interaktionen pro Wirkstoff. Die Familie der GPCRs stach besonders hervor mit insgesamt 2646 Interaktionen zwischen 106 Targets und 396 Wirkstoffen, was im Durchschnitt 6,7 Interaktionen pro Wirkstoff entspricht. Dies spiegelt die hohe phylogenetische Verwandtschaft und sequentielle Ähnlichkeit dieser Target-Familie wieder. Paolini et al. gingen noch einen Schritt weiter, in dem sie ein solches Drug-Target-Netzwerk, unabhängig der Target-Familie, für 486 humane Proteine mit 3636 polypharmakologischen Interaktionen konstruierten.<sup>22</sup> Dieses Netzwerk macht deutlich, dass nicht nur Interaktionen zwischen phylogenetisch verwandten Targets auftreten, sondern auch über Target-Familien hinweg Interaktionen zu beobachten sind. Das Netzwerk skizziert die hohe Promiskuität von Liganden innerhalb einer Target-Familie, dargestellt durch räumliche Anhäufungen gleichfarbiger Knoten, aber es zeigt auch eine deutliche Vernetzung zwischen Anhäufungen verschiedener Familien, wie zum Beispiel zwischen aminergen und Peptid-GPCRs. Um die polypharmakologischen Interaktionen innerhalb und zwischen verschiedenen Gen-Familien zu quantifizieren und zusammenzufassen wurde eine Matrix konstruiert, welche farblich kodiert den Grad der Promiskuität zwischen den Gen-Familien zeigt (Abb. 3b). Hierbei ist neben der erhöhten Promiskuität innerhalb einer Gen-Familie (Diagonal der Matrix) auch eine erhöhte Promiskuität zwischen aminergen GPCRs, Peptid GPCRs und Protein Kinasen zu beobachten. Zusammenhänge zwischen biologischen Target-Familien zu identifizieren, basierend auf polypharmakologischen Interaktionen ihrer gemeinsamen Liganden, wird auch als „Chemogenomics“ bezeichnet und stellt einen neuen, vielversprechende Ansatz zum Verständnis von Polypharmakologie dar.

### **In silico Vorhersage von Polypharmakologie**

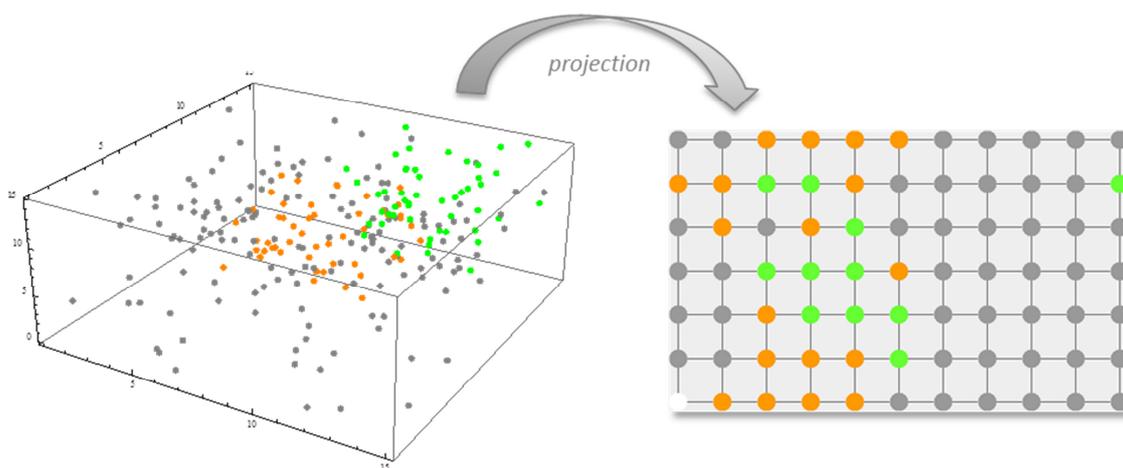
Diese chemischen und genomischen Zusammenhänge stellen die Basis für eine, rechnergestützte Vorhersage von Polypharmakologie dar. Die meisten Ansätze basieren, wie auch viele virtuelle Screening-Verfahren, auf der Annahme, dass ähnliche chemische Verbindungen auch eine ähnliche biologische Aktivität aufweisen.<sup>23</sup> Im Falle der Polypharmakologie sollte diese Annahme aber noch durch den Zusatz ergänzt werden, dass ähnliche Targets ebenfalls mit ähnlichen Verbindungen interagieren können. Der Begriff der „Ähnlichkeit“ hängt dabei, wie beim virtuellen Screening, stark von den verwendeten Methoden und betrachteten Targets ab. Im Gegensatz zum virtuellen Screening versucht man bei der Vorhersage von Polypharmakologie jedoch nicht die Methode auf ein bestimmtes Problem, bzw.

Target zu optimieren sondern die Entwicklung von robusten, möglichst allgemeingültigen Verfahren voranzutreiben. Dabei stellt die stetig wachsende Anzahl an verfügbaren Informationsquellen zu einem breiten Spektrum an Proteinen, Liganden und deren Affinitätsdaten die Grundlage für eine erfolgreiche Vorhersage dar. Umso präziser und gleichzeitig vielfältiger die zugrundeliegenden Daten sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit robuste Vorhersagemodelle auf Basis dieser Daten zu erhalten. Zu den umfangreichsten Datenbanken dieser Art gehören die ChEMBL<sup>24</sup> Datenbank mit mittlerweile über 1,3 Millionen Verbindungen und mit über 12 Millionen experimentell gemessenen Aktivitätsdaten und die DrugBank<sup>25,26</sup> Datenbank mit über 6800 auf dem Markt oder in experimentellen Studien befindlichen Verbindungen, ihrer Aktivitätsdaten und Target-Informationen. Betrachtet man den Umfang dieser Datengrundlage, wird deutlich, warum viele der bisher vorgestellten Verfahren zur Vorhersage von polypharmakologischen Zusammenhängen auf massivem Data-Mining und maschinellen Lernverfahren basieren.

Maschinelle Lernverfahren werden typischerweise in überwachte und unüberwachte Lernverfahren unterschieden. Gemeinsam haben annähernd alle Verfahren, dass man sie auf bekannten Daten zunächst trainieren muss, sprich das Modell auf diese anpassen, damit unbekannte, jedoch ähnliche Daten erfolgreich vorhergesagt werden können. Dieser Trainingsschritt stellt für Gewöhnlich einen fehleranfälligen Prozess dar und kann im schlimmsten Fall zu geringer Generalisierbarkeit oder gar zu einer Überanpassung des Modells führen. In diesem Fall spricht man auch von „auswendig lernen“ der Daten, was eine schlechte Vorhersageleistung mit sich führt. Zu den populärsten Vertretern der beiden Kategorien in der Chemieinformatik gehören der Bayes-Klassifikator und die selbstorganisierenden Karten. Der Bayes-Klassifikator, bzw. seine häufig verwendete und vereinfachte Variante der naive Bayes-Klassifikator basiert auf der Annahme, dass jede beschreibende Eigenschaft eines Datenpunktes ausschließlich von jenem Klassenattribut abhängig ist, zu dem es gehört. Bezogen auf die Vorhersage in der Chemieinformatik bedeutet dies, dass z.B. bestimmte Substrukturen oder Pharmakophore (Eigenschaften) eines Moleküls nur in Molekülen auftreten, die eine bestimmte Bioaktivität auf ein definiertes Target (Klassenattribut) besitzen. Im konkreten Fall hat die Gruppe um Nidi et al. einen naiven Bayes-Klassifikator auf Liganden von 965 Targets der World of Molecular Bioactivity (WOMBAT) Datenbank<sup>27</sup>

(ref) trainiert.<sup>28</sup> Zu diesem Zweck trainierten sie das Modell mit 85 % der WOMBAT Verbindungen, dargestellt durch zirkuläre Substruktur-Fingerprints und versuchten die Targets der übrigen 15% an Verbindungen zur Modellevaluierung vorherzusagen. Dabei konnten sie in 92 % der Fälle das korrekte Target und in 95 % der Fälle zumindest die Target-Familie korrekt bestimmen. Sie weiteten die Studie daraufhin auf Verbindungen der MDL Drug Data Report (MDDR) Datenbank (ref) aus und konnten für diese Verbindungen in 77 %, bzw. 79 % der Fälle das korrekte Target respektive die korrekte Target-Familie vorhersagen.

Ebenfalls weitverbreitet in der Chemieinformatik sind die selbstorganisierenden Karten (Abk.: SOM, engl: self-organizing map).<sup>29,30</sup> Sie basieren auf dem Prinzip, dass eine Menge von verbundenen Neuronen (ein Netz) dazu verwendet werden die Verteilung von Datenpunkten innerhalb des Eingaberaums zu approximieren. Dazu werden während des Trainings diese Datenpunkte stets einem ähnlichsten Neuronen des Netzes zugeordnet, woraufhin dieses Neuron dem neu zugeordneten Datenpunkt entsprechend angepasst wird. Diese iterative Anpassung hat zur Folge, dass das gesamte Netz im Laufe des Trainings, den Datenraum abbildet und konvergiert. Dies ermöglicht die Projektion von hoch-dimensionalen Eingabedaten, wie z.B. die Beschreibung von Molekülen durch Deskriptoren oder Fingerprints, auf eine niedrigere Dimension, die durch die einfachere Topologie, bzw. intrinsische Dimension des Neuronen-Netzes gegeben ist (Abb. 4).

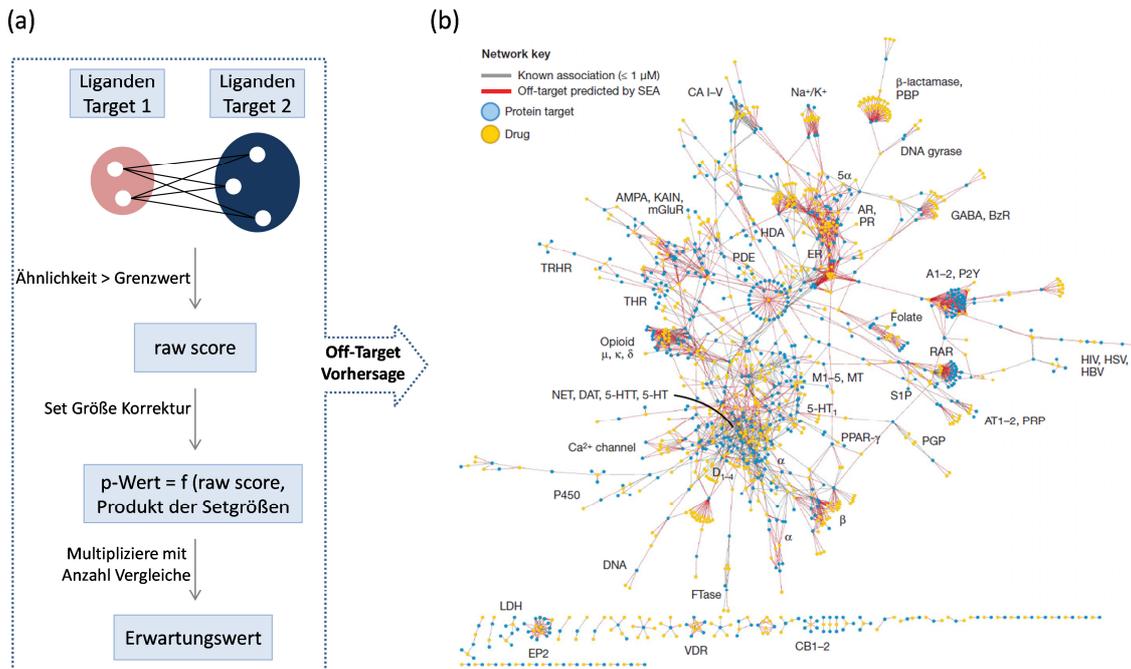


**Abb. 4:** Projektion von 3-dimensionalen Daten auf eine 2-dimensionale, selbstorganisierende Karte.

Eine Anwendung vom SOMs in einem polypharmakologischen Rahmen wurde unter anderem von Schneider et al. gezeigt.<sup>31</sup> Sie trainierten eine selbstorganisierende Karte auf einem Datensatz bestehend aus zugelassenen Wirkstoffen und

Leitstrukturen. Daraufhin projizierten sie Aspirin auf diese Karte und untersuchten die Wirkstoffe, die dem gleichen Neuron beim Training der Karte zugeordnet wurden. Unter den Targets dieser Wirkstoffe befand sich die Tyrosin Phosphatase 1B, welche als bis dahin unbekanntes Target für Aspirin verifiziert werden konnte. Noeske et al. nutzten ebenfalls selbstorganisierende Karten um neue Targets für bekannte Antagonisten des metabotropen Glutamat Rezeptors Subtyp 1 und 5 zu identifizieren.<sup>32</sup> Die trainierte SOM sagte weitere GPCRs, den Dopamin D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> Rezeptor, den muskarinischen Acetylcholin Rezeptor und den Histamin H<sub>1</sub> Rezeptor als mögliche Targets voraus, die anschließend experimentell mit IC<sub>50</sub> Werten im niedrig mikromolaren Bereich verifiziert werden konnten.

Eine Modell-unabhängige Methode zur Vorhersage von pharmakologischen Zusammenhängen verschiedener Targets, basierend auf ihren aktiven Liganden, stellt der von Keiser et al. entwickelte Similarity Ensemble Approach (SEA) dar.<sup>33</sup> Dieser Ansatz ist motiviert durch den empirischen Algorithmus BLAST<sup>34</sup> (Engl.: Basic Local Alignment Search Tool), der in der Bewertung von Sequenz-Alignments zum Einsatz kommt und Extremwertverteilungen zur Bewertung heranzieht. Dabei werden jedoch nicht die einzelnen Ähnlichkeiten zwischen aktiven Liganden der jeweiligen Targets untersucht, sondern die Ähnlichkeit aller bekannten, aktiven Liganden als Set verglichen. Letztlich wird ein Erwartungswert für die Ähnlichkeit dieser Sets im Vergleich zur Ähnlichkeit zu einem zufällig gewählten Liganden-Set berechnet und ausgegeben (Abb. 5a). Vorteil dieser rein statistischen Methode im Vergleich zu Lernverfahren liegt darin, dass keine verifizierten, inaktiven Liganden vorliegen müssen und der fehleranfällige Schritt des Modell-Trainings, in Bezug auf Generalisierbarkeit und Überanpassung, entfällt.



**Abb. 5:** a) Skizzierter Ablauf des Similarity Ensemble Approach (SEA). Zunächst werden alle paar-weisen Ähnlichkeiten zwischen den Liganden zweier Targets berechnet und Ähnlichkeiten oberhalb eines definierten Schwellenwertes werden zum Raw Score aufsummiert. Aus diesem Raw Score wird ein p-Wert ermittelt in Bezug auf einen erwarteten Score eines zufällig verglichenen Liganden Sets. Abschließend wird dieser Wert noch mit der Anzahl Vergleiche multipliziert und ergibt den finalen Erwartungswert. b) Drug-Target Netzwerk basierend auf dem SEA Ansatz mit einem Datensatz von 246 Targets und 65241 Liganden der MDDR Datenbank.

Keiser et al. nutzen diesen Ansatz um 246 Targets mit 65241 Liganden der MDDR Datenbank zu vergleichen. Diese Studie zeigte, dass jedes Target im Durchschnitt mit 5,8 weiteren Targets in Beziehung steht. Des Weiteren wurde der gleiche Datensatz zur Vorhersage von neuen Targets für über 3600 zugelassene Wirkstoffe und Leitstrukturen verwendet (Abb. 5b). Dabei konnte unter anderem für den Wirkstoff Methadon der muskarinische Acetylcholin-Rezeptor M3 vorhergesagt und experimentell validiert werden. Außerdem konnten für die Wirkstoffe Emetin und Loperamid neue Targets, der adrenerge  $\alpha_2$  Rezeptor und der Neurokinin NK2 Rezeptor, vorhergesagt und experimentell verifiziert werden<sup>35</sup>. Ein Großteil der vorhergesagten Targets gehörte jedoch zur gleichen Target-Familie, der aminergen GPCRs, wie die bereits bekannten „Haupt-Targets“ dieser Wirkstoffe. Eine Ausnahme davon stellte der HIV-1 Reverse Transkriptase Inhibitor Delavirdin dar, für den eine Bindung zum Histamin  $H_4$  Rezeptor nachgewiesen werden konnte.

Neben diesen ausschließlich Liganden-basierten Ansätzen gibt es auch Struktur-basierte Ansätze, wie der von Miletti und Vulpetti entwickelte Ansatz zum Vergleich von Bindetaschen.<sup>36</sup> Ihre Methode zur Vorhersage von möglichen Off-Targets

besteht aus zwei Schritten. Zunächst werden die zu vergleichenden Bindetaschen, bzw. ihre Form durch eine Anzahl von Deskriptoren beschrieben, abhängig von der Größe der Bindetasche. Die Deskriptoren jeder Bindetasche werden nun untereinander verglichen und ergeben eine Matrix an Ähnlichkeitswerten, die im Grunde Teilähnlichkeiten der betrachteten Bindetaschen beschreiben. Aus dieser Matrix wird anschließend ein Gesamt-Ähnlichkeitswert abgeleitet und im letzten Schritt werden die Teile der Bindetaschenform, die zu dem Gesamtwert geführt haben räumlich überlagert. Die Qualität dieser Überlagerung, beschrieben durch den RMSD wird dann für eine Verfeinerung des Gesamt-Ähnlichkeitswertes verwendet. Auf diese Art und Weise wurden zunächst polypharmakologische Profile für 17 Kinase Inhibitoren erstellt, wobei der Ansatz in der Lage war auch Off-Targets ( $K_d < 10 \mu\text{M}$ ) mit nur sehr geringer Sequenzidentität vorherzusagen. In einem nächsten Schritt wurden Off-Targets für 10 bekannte Wirkstoffe vorhergesagt, wobei die gesamte Protein Database (PDB) zum Vergleich herangezogen wurde. In dieser komplexeren Anwendung konnte der Ansatz basierend auf dem kokristallisierten Komplex von Levonorgestrel gebunden an den Progesteron Rezeptor auch den Androgen Rezeptor, den Mineralocorticoid Rezeptor, den Glucocorticoid Rezeptor und den Estrogen Rezeptor als weitere Targets identifizieren. Des Weiteren wurde für Sitagliptin, einem selektiven Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) Inhibitor, als weiteres, mögliches Target Seprase vorgeschlagen. Dieses Target wird neben DPP 8 und DPP9 ebenfalls häufig als Off-Target anderer DPP4 Inhibitoren beschrieben.

## **Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung**

Polypharmakologie stellt einen wichtigen Aspekt in der Wirkstoffentwicklung dar, da Liganden selten selektiv an ein einzelnes Target binden. Dies birgt jedoch nicht nur Gefahren, in Form von unerwünschten Nebeneffekten, sondern bietet auch Potential zur Behandlung komplexer Krankheitsbilder, die auf dem Zusammenspiel mehrerer Fehlfunktionen basieren. Die meist zufällig oder retrospektiv beobachteten polypharmakologischen Zusammenhänge können auch als Grundlage vielversprechender, neuer Ansätze in der Wirkstoffentwicklung dienen. Dazu sollen im Folgenden Fallbeispiele aus verschiedenen Indikationsgebieten aufgezeigt werden, in denen promiskuitive Wirkstoffe die bisherigen Therapeutika ablösen.

### **Polypharmakologie in der Onkologie**

Insbesondere im Bereich der Krebsforschung konnte gezeigt werden, dass viele Krebsarten durch die Störung bestimmter Signaltransduktionswege zustande kommen, die durch eine Kombination unterschiedlicher Gene ausgelöst wird. Folglich ist dabei eine Vielzahl vernetzter Proteine beteiligt, weshalb man im Falle von Krebs auch von „a disease of pathways“ (dt.: Erkrankung der Signalwege) spricht.<sup>37-40</sup> Dies verdeutlicht aber auch, weshalb eine Therapie basierend auf der Inhibition oder Modulation eines einzelnen Targets, sei es durch einen noch so selektiven Liganden, nur schwer zu dem erhofften Erfolg führen kann. Maßgeblich beteiligt an diesen Erkenntnissen war die Entwicklung von Imatinib (Gleevec®), ein von Novartis entwickelter Wirkstoff zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML).<sup>41,42</sup> Imatinib wurde ursprünglich als selektiver Ligand für die Tyrosinkinase Abl entwickelt und stellt einen der Vorreiter der sogenannten „targeted tumor therapy“ (dt.: gezielte Tumorbehandlung) dar, bei der ein Wirkstoff gezielt nur eine spezifische Tumor Art adressiert. Die Tyrosinkinase Abl ist Teil der BCR-Abl Translokation zwischen Chromosom 9 und 22, dessen Verschmelzung mit einem Teil des breakpoint cluster region (BCR) Gens in Zusammenhang mit der Entstehung der CML steht.<sup>43,44</sup> Die daraus resultierende chimäre Tyrosinkinase BCR-Abl führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung der Zellproliferation und anti-apoptotischer Signalwege.<sup>45</sup> Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Imatinib nicht nur, wie ursprünglich gedacht und entwickelt, die BCR-Abl sondern zusätzlich auch den Tyrosinkinase Rezeptor c-KIT und den PDGF Rezeptor (platelet-derived growth factor

receptor) inhibiert.<sup>46,47</sup> Da diese Kinasen ebenfalls in Zusammenhang mit dem gastrointestinalen Stromatumor (GIST) gebracht werden, wurde folglich der Einsatz von Imatinib auch auf diese Tumor Art erweitert.<sup>48</sup>

Zum einen ist es schwierig das relevante Target für einen spezifische Tumor überhaupt zu identifizieren und selektiv zu adressieren, zum anderen können einzelne Tumorarten heterogene Genotypen aufweisen, wie z.B. im Fall von NSCLC (non-small-cell lung cancer), die diese Therapieform massiv erschweren. Die Wirkstoffe Erlotinib und Gefitinib wurden als selektive EGFR (epidermal growth factor receptor) Inhibitoren zur Behandlung von NSCLC entwickelt. Es stellte sich jedoch erst spät heraus, dass Mutationen innerhalb der Kinase Domäne von EGFR einen Verlust der Aktivität der beiden Wirkstoffe zur Folge hatte und somit bei vielen Patienten keine Wirkung zeigte.<sup>49,50</sup> Ähnliche Mutations-Probleme wurden auch für Imatinib-resistente GIST-Arten beschrieben.<sup>51,52</sup> Es konnte gezeigt werden, dass es zu sekundären Resistenzen im Zuge der single-Target Krebstherapie kommen kann. Im Falle der Imatinib-resistenten CML wurde eine Überexpressionen der Tyrosinkinase Src im Folge der Imatinib-Behandlung beschrieben.<sup>53,54</sup> Des Weiteren hebt der Verlust der Aktivität des downstream liegenden Tumorsuppressorgens PTEN den positiven Effekt einer EGFR-basierten NSCLC Behandlung auf.<sup>55,56</sup>

Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass ein solcher single-Target Ansatz oftmals limitiert ist und dementsprechend nur zu einem eingeschränkten Erfolg führen kann. Gleichzeitig führten unter Anderem diese Erfahrungen zur Entwicklung der „zweiten Generation“ an Kinase Inhibitoren.<sup>44,57</sup> Diese Wirkstoffe wurden rational entworfen um simultan mehrere Targets zu adressieren. Dabei zielt man auf eine Kombination aus spezifischen Tumorzell-Targets und auf Targets assoziiert mit dem umliegenden Gewebe der Tumorzellen, um sowohl die Proliferation an sich zu stören als auch die pathologische Angiogenese zu verhindern. Ein bereits zugelassener Wirkstoff dieser Art stellt Sunitinib (Sutent) dar, der zur Behandlung des metastasierenden Nierenkarzinoms (mRCC), des Imatinib-resistenten GIST und von metastasierenden pankreatischen neuroendokrinen Tumoren (pNET) eingesetzt wird.<sup>58,59</sup> Sunitinib verhindert sowohl die Tumor Zellproliferation durch Inhibition der Signalwege von c-KIT, Flt-3 und RET, als auch die Tumor Angiogenese. Letzteres wird durch Inhibition der VEGF/VEGFR und PDGF/PDGFR Signalwege bewerkstelligt, die an der Regulation der Proliferation und Migration von Endothelzellen, bzw. an der Rekrutierung der Pericyten und Fibroblasten beteiligt sind.<sup>60,61</sup> Ähnliche Strategien wurden auch bei

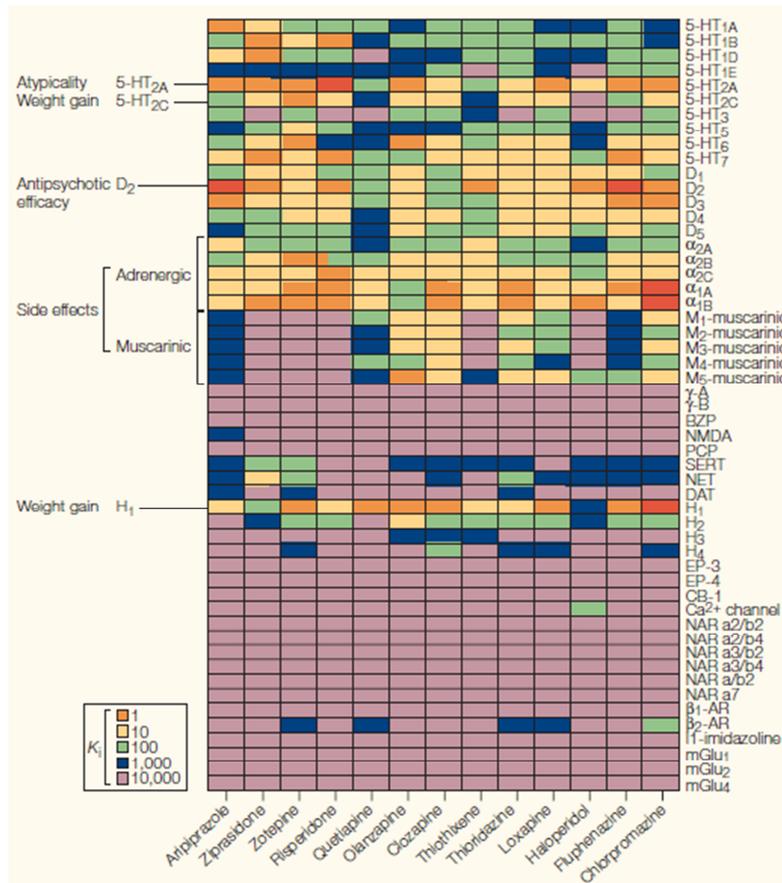
der Entwicklung von Sorafenib<sup>62,63</sup> und Pazopanib<sup>64-66</sup> verfolgt, die unter anderem die Rezeptoren VEGFR, PDGFR und c-Kit inhibieren und somit ebenfalls sowohl die Tumorzell-Proliferation, als auch die Angiogenese des umliegenden, tumorunterstützenden Gewebes stören.

Diese Entwicklungen in der Onkologie verdeutlichen, dass sich der Ansatz der „single-targeted therapy“ bereits im Umbruch befindet und sich in die Richtung der multi-Target Ansätze verschiebt.

### **Polypharmakologie der Neuroleptika**

Ein weiteres Gebiet, in dem Polypharmakologie eine wichtige Rolle spielt, ist der Einsatz von antipsychotischen Wirkstoffen zur Behandlung von psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie, Manien und therapieresistenten Psychosen. Eines der bekanntesten und zur Klasse der typischen Antipsychotika gehörende Beispiel stellt dabei Chlorpromazin<sup>67</sup> dar, das ursprünglich als sedativer Histamin-Rezeptor Antagonist entwickelt wurde. Seine antipsychotische Wirkung konnte später auf seine unter anderem hohe antagonistische Affinität zu Dopamin-Rezeptoren zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen zeigten aber ein noch viel breiteres Wirkspektrum. Betrachtet man die bis heute publizierten Affinitätsdaten von Chlorpromazin (und anderen auf dem Markt befindlichen Neuroleptika) in öffentlich zugänglichen Datenbanken, wie z. B. der Psychoactive Drug Screening Program (PDSP)  $K_i$  Datenbank (<http://pdsp.med.unc.edu/kidb.php>), so findet man submikromolare Affinitäten für Serotonin-Rezeptoren,  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren, muskarinerge Rezeptoren, Dopamin-Rezeptoren und Imidazolin-Rezeptoren. Ein vergleichbares Bild zeigt sich, wenn man Clozapin<sup>68</sup> betrachtet, ein prominentes Antipsychotikum der zweiten Generation (atypische Antipsychotika), das zwar einen schwächeren D<sub>2</sub>-Rezeptor Antagonismus aufweist, aber ebenfalls ein breites, promiskuitives Wirkprofil mit über 25 bekannten Targets besitzt (Abb. 6).

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung



**Abb. 6:** Rezeptorome Screening: Affinitätsdaten von Clozapine und weiteren Pyschopharmaka auf ein breites Spektrum an antipsychotisch relevanter Targets in Verbindung mit bekannten unerwünschten Nebeneffekten.

Betrachtet man diese therapeutisch relevanten Targets genauer, zeigt sich besonders innerhalb einiger Rezeptorklassen eine hohe Sequenzidentität, folglich auch eine mögliche strukturelle Ähnlichkeit, was wiederum eine Erklärung für die hohe Promiskuität sein könnte. Im Speziellen konnte dies für die aminergen GPCRs (G-Protein Coupled Receptors) gezeigt werden, die eine überdurchschnittlich hohe Promiskuität aufweisen und zu denen eine Vielzahl therapeutischer Targets bekannter Psychopharmaka zählen.<sup>13,69</sup> Des Weiteren wird auch im Bereich der psychischen Erkrankungen darüber spekuliert, dass die selektive Inhibition einzelner Targets zu kompensatorischen Veränderungen in parallelen, möglicherweise redundanten Signalwegen führen kann und somit ihre Wirkung auf das eigentliche Krankheitsbild verfehlen. Im Umkehrschluss kann die durchaus schwächere Inhibition mehrerer Targets in parallelen Signalwegen diesen kompensatorischen Effekt verhindern und somit im Endeffekt eine effektivere Therapieform darstellen.<sup>70</sup> Es konnte gezeigt werden, dass viele Targets zwar in unterschiedlichen Signalwegen

lokalisiert sind, jedoch erst das Zusammenspiel dieser Signalwege zu der eigentlichen Erkrankung und somit die promiskuitive Inhibition dieser verschiedenen Targets zu einer „funktionellen Selektivität“ führt.<sup>71,72</sup>

Auch im Bereich der Neuroleptika lässt sich festhalten, dass Polypharmakologie bereits ein essentieller Bestandteil der heutigen Medikation darstellt. Dabei darf jedoch die damit verbundene Gefahr auf negative, ungewünschte Nebenwirkungen nicht außer Acht gelassen werden. Weitere Untersuchungen dieser komplexen Zusammenhänge sind somit unabdingbar, um künftige Generationen an promiskuitiven Antipsychotika mit einem entsprechend gleichermaßen funktionell selektiven, wie auch sicheren, Wirkprofil zu entwickeln.

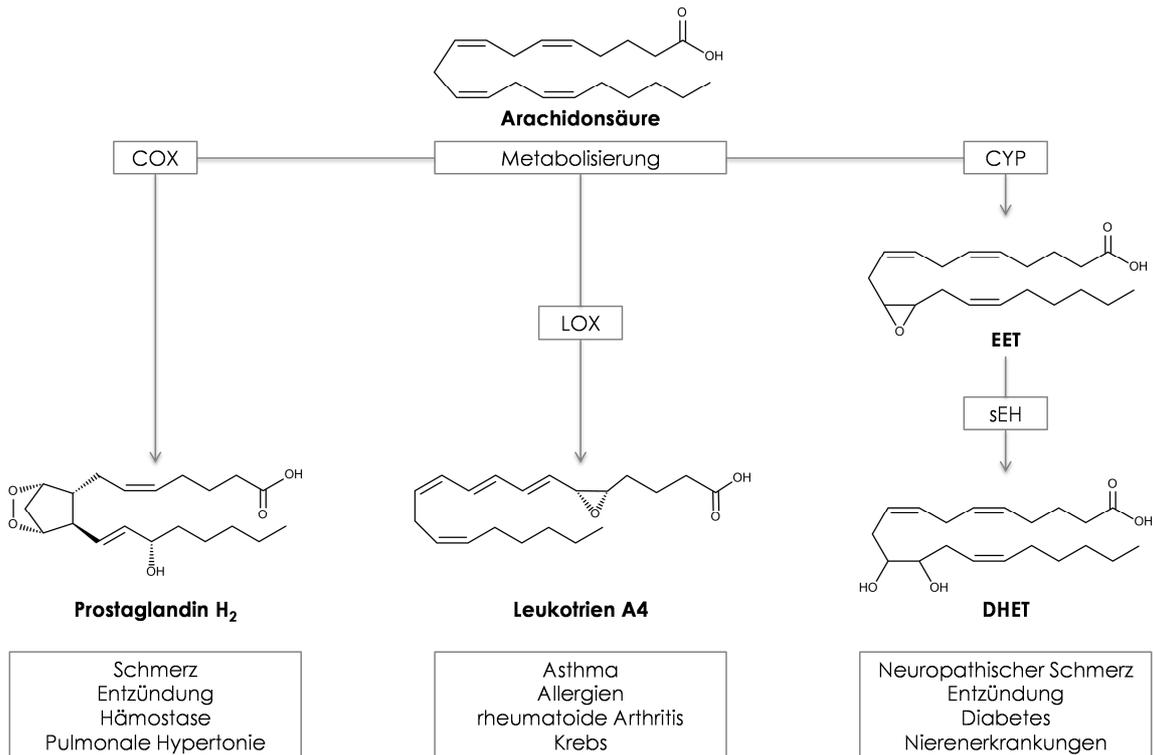
## **Polypharmakologie in der Arachidonsäurekaskade**

Im Folgenden werden die Einsatzmöglichkeiten von polypharmakologischen Wirkstoffen im Bereich der Arachidonsäurekaskade beschrieben. Dabei wird auf zwei Targets dieses Stoffwechselweges, die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) und die 5-Lipoxygenase (5-LO), detaillierter eingegangen, da diese u.a. im Fokus der hier zusammengefassten Arbeiten stehen.

### **Die Arachidonsäurekaskade**

Die Arachidonsäure (AA), eine vierfach ungesättigte Fettsäure, die als Bestandteil von Phospholipiden in der Zellmembran lokalisiert ist, stellt die Grundlage der Biosynthese einer Reihe von Eicosanoiden dar. Zunächst führt die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)<sup>73</sup> zur Freisetzung der AA, wo sie hauptsächlich durch drei verschiedene Signalwege, dem Cyclooxygenase (COX), Lipoxygenase (LOX) und Cytochrom P450 (CYP) Signalweg, metabolisiert wird.<sup>74</sup> Der COX-Signalweg wandelt AA zu Prostaglandinen um, welche in erster Linie pro-inflammatorische Mediatoren darstellen.<sup>75</sup> Dabei wird zunächst AA in das instabile Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) umgewandelt und in einem darauf folgenden Schritt in Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) überführt. PGH<sub>2</sub> kann daraufhin durch diverse Prostanoid Synthasen in verschiedene Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α und PGI<sub>2</sub>) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgewandelt werden.<sup>76</sup> Der LOX Signalweg hingegen wandelt AA sowohl in pro-inflammatorische Leukotriene (LT)<sup>77</sup> und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE)<sup>78</sup> als auch in die anti-inflammatorischen Lipoxine (LX)<sup>79</sup> um. Über den CYP Signalweg wird aus AA sowohl über CYP Hydrolasen die gefäßverengende 20-HETE erzeugt als auch über CYP Epoxygenasen die anti-inflammatorischen Epoxyeicosatriensäuren (EET).<sup>80</sup> Diese werden wiederum über die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) weiter zu ihren korrespondierenden Diolen, den Dihydroxyeicosatriensäuren (DHET), umgewandelt.<sup>81</sup> Auf die LT und DHET Biosynthese und die Rolle der darin involvierten 5-Lipoxygenase (5-LO), bzw. der löslichen Epoxidhydrolase wird in den nächsten Abschnitten detaillierter eingegangen.

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung



**Abb. 7:** Involvierte Targets, ihre Metaboliten und deren pharmakologischer Zusammenhang innerhalb Arachidonsäure Kaskade.

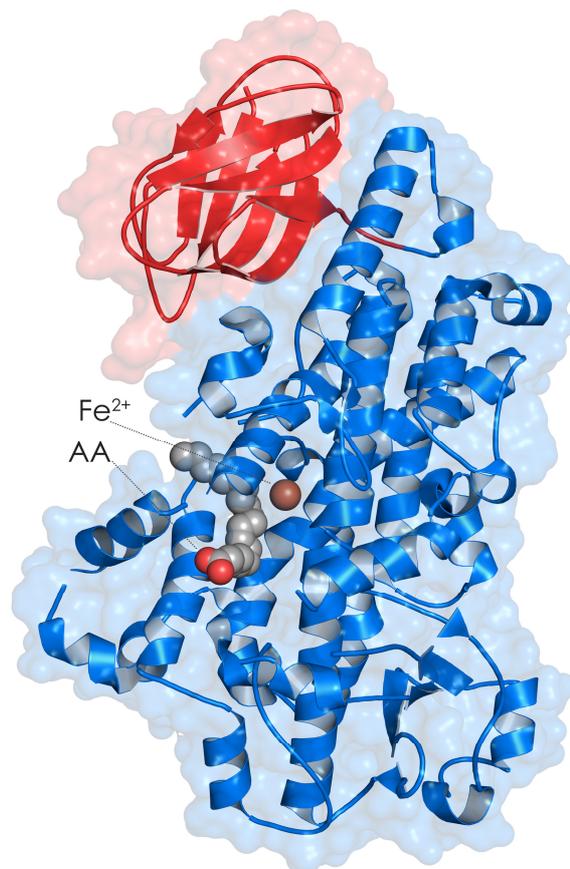
### 5-Lipoxygenase

Der LOX Signalweg basiert auf sechs verschiedenen Lipoxygenase Isoformen, der 5-, 8-, 12(S/R)- und 15(S/R)-Lipoxygenase, die jeweils Arachidonsäure in ihre korrespondierende Hydroxyperoxyeicosatetraensäure (HPETE) umwandeln.<sup>82</sup> Die am besten in Hinblick auf inflammatorische Prozesse untersuchte Isoform stellt die 5-Lipoxygenase dar.

#### Struktur

Die humane 5-LO besitzt ein Molekulargewicht von 78 kDa, setzt sich aus 673 Aminosäuren zusammen und besitzt zwei unterschiedliche Domänen (Abb. 7). Sie kann sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen.<sup>83</sup> N-terminal befindet sich die regulatorische, so genannte „C2-ähnliche“ Domäne (Aminosäure 1-120), die sowohl für die Calcium- als auch die Membran- und Phosphatidylcholin- (PC) Bindung verantwortlich ist.<sup>84</sup> Die Ca<sup>2+</sup>-Bindung erfolgt dabei über die Aminosäuren Asn-43, Asp-44 und Glu-46, die Membran- und PC-Bindung wiederum über drei Tryptophane (W13, W75 und W102).<sup>85,86</sup> Die C-terminale, katalytische Domäne (Aminosäuren 121-

673) besitzt im aktiven Zentrum ein Nicht-Hämeisen, das durch eine 2-His-1-Carboxylat Triade, bestehend aus zwei Histidinen (H372 und H550) und dem C-terminalen Isoleucin 673, koordiniert wird.<sup>87</sup> Dieses Eisen liegt im inaktiven Zustand der 5-LO zunächst als Eisen(II)-Ion vor und wird durch Lipidperoxidation (LOOH) zu Eisen(III) oxidiert. Erst dadurch ist die 5-LO katalytisch aktiv.<sup>88,89</sup> Sowohl N- als auch C-terminal befinden sich Kernlokalisierungssequenzen, die für die Translokation der cytosolischen 5-LO an die Kernmembran sorgen. In intakten Zellen wird der Import bzw. Export in den bzw. aus dem Zellkern über Phosphorylierung reguliert.<sup>90,91</sup>



**Abb. 8:** Kristallstruktur der humanen 5-Lipoxygenase mit gebundener Arachidonsäure im katalytischen Zentrum. (PDB code: 3v99). In blau die katalytische Domäne, in rot die C2-ähnliche Domäne.

#### Aktivierung und Regulation

Bisher sind drei unterschiedliche Phosphorylierungsstellen für die 5-LO bekannt. Ser-271 kann durch die MAP Kinase-activated protein Kinase 2 und 3 (MK2/3), Ser-663 durch die MAP Kinase ERK2 und Ser-523 durch die Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert werden (Abb. 8).<sup>89</sup> Diese verschiedenen Phosphorylierungsstellen können dabei abhängig vom betrachteten Zelltyp und der Art der Zellstimulation

unterschiedliche Effekte auf die 5-LO-Aktivität hervorrufen. Die MK2-Phosphorylierung wird durch Zellstress oder Cytokine verursacht und konnte *in vitro* in Monozyten (MM6), Granulozyten (PMNL) und B-Lymphocyten nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von AA *in vitro* weiter verstärkt werden. Die Phosphorylierung durch ERK2 konnte ebenfalls *in vitro* durch Stimulation mittels AA in MonoMac6 Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz zu der MK2/3 und ERK2 Phosphorylierungen, die beide zu einer Aktivierung der 5-LO und somit der LT Biosynthese führen, wird die katalytische 5-LO-Aktivität durch eine PKA vermittelte Phosphorylierung herunter reguliert. Des Weiteren führt sie zu einer verminderten Lokalisierung der 5-LO an die Kernmembran. Dieser Effekt kann durch exogenes Adenosin oder einen erhöhten Cyclischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegel hervorgerufen werden, das zu einer Aktivierung der PKA führt.<sup>92,93</sup>

Nicht nur Phosphorylierungen sondern auch Calcium und ATP führen zu einer Aktivierung der 5-LO. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  führt zu einer verstärkten PC oder Coactosin-like Protein (CLP) Bindung und einer erhöhten 5-LO-Aktivität.<sup>94</sup> In Phasentrennungs-Assays konnte die verstärkte Membranbindung durch Einfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  auf eine Erhöhung der Hydrophobizität zurückgeführt werden. ATP führt ebenfalls zu einer erhöhten 5-LO-Aktivität, welche allerdings durch eine stabilisierende Wirkung durch die ATP Bindung zustande kommt.<sup>95</sup>

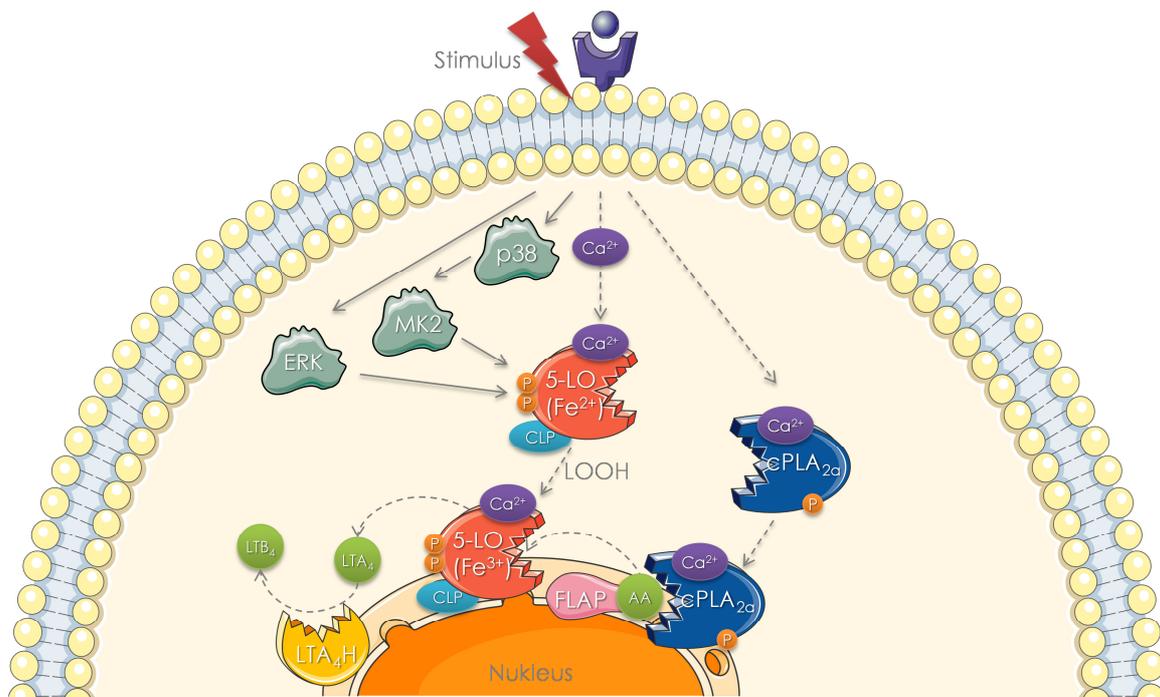


Abb. 9: Zelluläre Regulation der 5-Lipoxygenase.

### Physiologische Bedeutung

Die 5-LO wird hauptsächlich in verschiedenen Leukozyten, wie Neutrophilen, Macrophagen, Eosinophilen, Mastzellen, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Sie liegt im Zytosol vor und wird für ihre katalytische Funktion in die Kernmembran translokiert. Die 5-LO ist für die Synthese verschiedener Leukotriene verantwortlich, die eine wichtige Rolle in inflammatorischen Prozessen spielen. Die Leukotrien Biosynthese beginnt mit der Hydrolyse der AA durch cPLA<sub>2</sub> aus der Membran, welche anschließend an das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein (FLAP) bindet.<sup>96</sup> FLAP stellt die AA daraufhin der 5-LO zur Verfügung, die sie zum Zwischenprodukt 5-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5(S)-HPETE) umwandelt.<sup>97</sup> Die 5-HPETE wird im nächsten Schritt, ebenfalls durch die 5-LO, weiter zu 5-HETE oder zum instabilen Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) reduziert.<sup>98</sup> LTA<sub>4</sub> wird daraufhin entweder durch die LTA<sub>4</sub> Hydrolase zu dem korrespondierenden Diol Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)<sup>99</sup> oder durch die LTC<sub>4</sub> Synthase mittels Glutathion zum Cysteinyl-LT LTC<sub>4</sub><sup>100</sup> umgewandelt, was nachfolgend zu LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> weiter umgesetzt werden kann.<sup>101</sup> LTs sind Lipidmediatoren, deren Effekt über verschiedene GPCR's vermittelt wird.<sup>102</sup> Es sind drei Rezeptoren für die Cys-LTs (CysLT<sub>1</sub>, CysLT<sub>2</sub> und GPR17) und zwei Rezeptoren für LTB<sub>4</sub> (BLT<sub>1</sub> und BLT<sub>2</sub>) bisher bekannt.<sup>103-105</sup> LTB<sub>4</sub> ist an Immunreaktionen beteiligt und führt zu einer erhöhten Freisetzung von pro-inflammatorischen Cytokinen durch Lymphozyten und Makrophagen.<sup>106</sup> Es wirkt außerdem als chemotaktische Substanz, die zur Aktivierung von Leukozyten führt und die Migration und Aktivierung von Granulozyten und T-Zellen stimuliert.<sup>107</sup> Die Cys-LTs werden mit allergischen Reaktionen in Verbindung gebracht und können zu einer Bronchienverengung führen, ausgelöst durch Kontraktion der glatten Bronchialmuskulatur.<sup>108</sup> Des Weiteren führen sie zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und somit zur Ödem Bildung. Generell werden Leukotriene mit diversen inflammatorischen und allergischen Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, Asthma, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Schuppenflechte und allergischer Rhinitis, in Verbindung gebracht.<sup>109</sup>

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

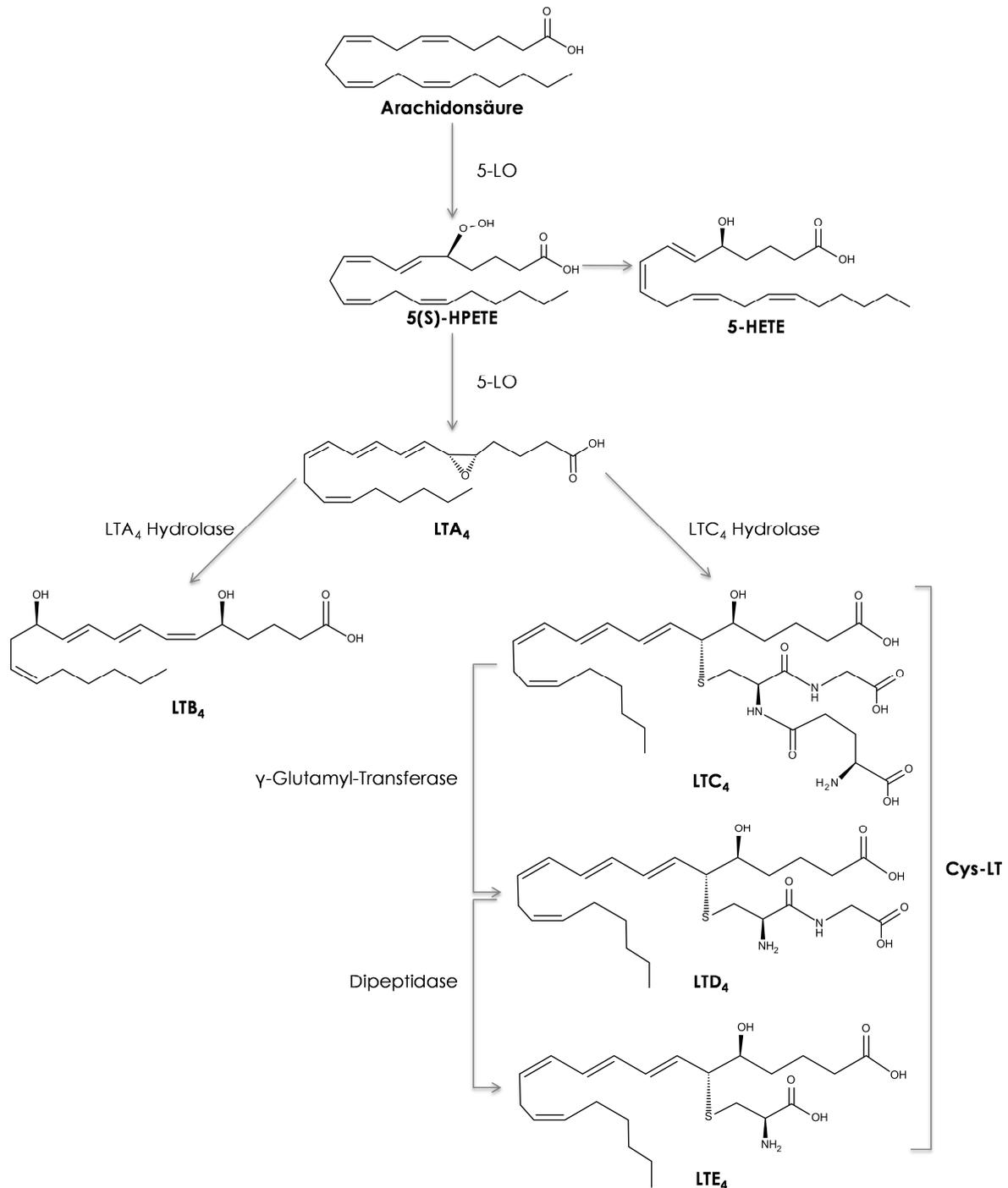


Abb. 10 5-Lipoxygenase vermittelte Leukotrien Biosynthese.

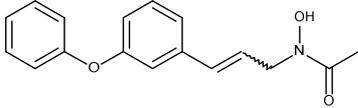
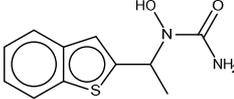
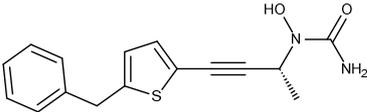
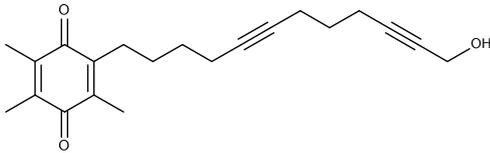
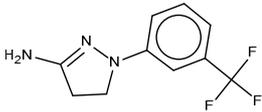
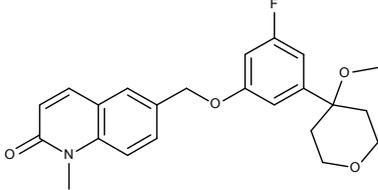
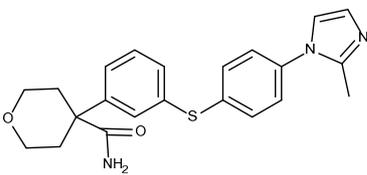
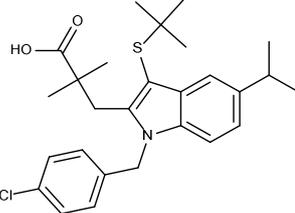
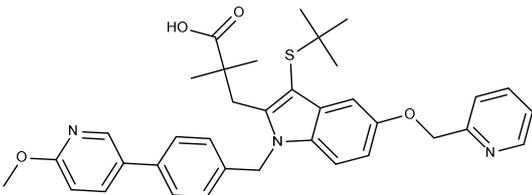
Bekannte 5-LO-Inhibitoren

Grundsätzlich werden 5-LO-Inhibitoren in vier verschiedene Kategorien eingeteilt: Eisen-Chelatoren, Redox-aktive Inhibitoren, Kompetitive(non-redox) Inhibitoren und FLAP Inhibitoren.<sup>110,111</sup>

Zu der Gruppe der Eisen-Chelatoren gehören die Hydroxamsäure und N-Hydroxyurea Derivate, wie BWA4C<sup>112</sup> und Zileuton.<sup>113</sup> Diese Inhibitoren chelatieren das Eisen im aktiven Zentrum der 5-LO und besitzen leicht reduktive Eigenschaften, was zu einer Inaktivierung der katalytischen Funktion der 5-LO führt. Zileuton ist oral verfügbar, aktiv in stimulierten Leukozyten und wurde in den USA zur chronischen Behandlung von Asthma zugelassen. Es konnten ebenfalls Effekte in anderen chronischen oder allergischen Erkrankungen, wie rheumatoide Arthritis oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gezeigt werden.<sup>114,115</sup> Jedoch besitzt Zileuton eine geringe Halbwertszeit von wenigen Stunden und wird mit Leberschäden in Verbindung gebracht.<sup>116,117</sup> Das strukturell verwandte ABT-761<sup>118</sup> zeigt hingegen eine deutlich höhere Halbwertszeit von 16h und eine höhere Potenz als Zileuton. Es befindet sich zur Zeit in klinischen Studien zur Behandlung von Arteriosklerose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen.

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

**Tabelle 1:** Bekannte 5-Lipoxygenase und FLAP Inhibitoren.

Name	Struktur	Typ
BWA4C		Eisen-Chelator
Zileuton		Eisen-Chelator
ABT-761		Eisen-Chelator
AA861		Redox
BW755C		Redox
ZD2138		Nicht-redox
CJ-13,610		Nicht-redox
MK886		FLAP
AM103		FLAP

Zu den redox-aktiven Inhibitoren gehören die pflanzlichen Flavonoide, Cumarine und verschiedene Polyphenole, aber auch die synthetischen Inhibitoren AA861 und BW755C.<sup>119</sup> Sie verfügen über reduktive Eigenschaften, wodurch sie das Eisen im aktiven Zentrum in seiner inaktiven Eisen(II)-Form halten und damit den katalytischen Kreislauf der 5-LO unterbrechen. Sie zeigen gute *in vitro* Eigenschaften, konnten jedoch in Bezug auf orale Verfügbarkeit, Selektivität und Interaktionen mit anderen biologischen Redox-Systemen im Körper nicht überzeugen.

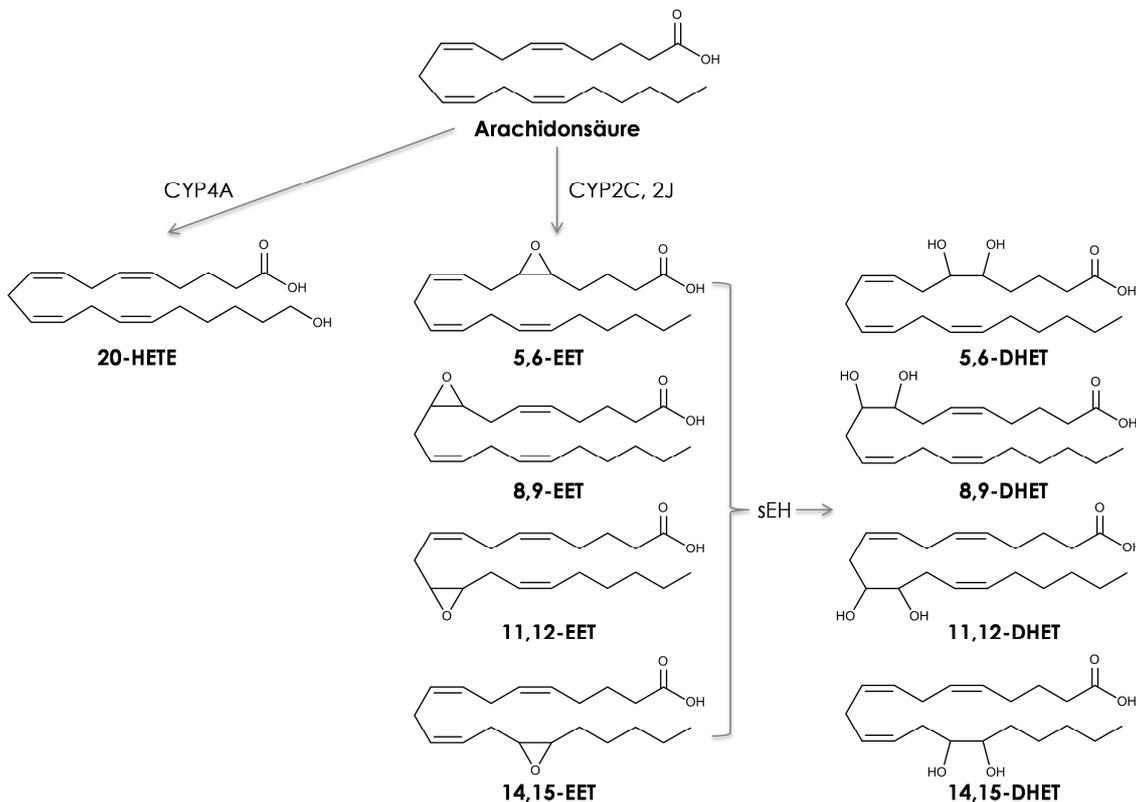
Die kompetitiven, oftmals auch als nicht-redox-aktiv bezeichneten Inhibitoren konkurrieren mit der AA oder LOOH um die Bindung an die 5-LO. Sie stellen eine strukturell diverse Klasse dar und es ist bis heute nicht klar, ob sie direkt an die Bindungsstelle der AA binden oder ob der inhibierende Effekt über allosterische Bindung zustande kommt. Die Verbindungen ZD2138<sup>120</sup> und CJ-13,610<sup>121</sup> gehören zu dieser Klasse an Inhibitoren und zeigen hohe Selektivität und Potenz im nanomolaren Bereich. Jedoch konnte für ZD2138 in aktivierten PMNL gezeigt werden, dass ihre Potenz durch hohe Peroxid-Spiegel und Phosphorylierungen der 5-LO durch MK2 oder ERK2 reduziert wird. Beides physiologische Bedingungen, die während inflammatorischen Prozessen auftreten.

Die Klasse der FLAP Inhibitoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie die 5-LO nicht direkt inhibieren sondern die Bereitstellung der AA durch Inhibition von FLAP einschränken. In Zell-basierten Assay Systemen zeigte der FLAP Inhibitor MK886<sup>122,123</sup> eine hohe Potenz, die jedoch in Vollblut Assay Systemen drastisch abnimmt. Dies wird zum einen auf die Plasma Protein Bindung, zum anderen auf konkurrierende Effekte mit AA oder anderen ungesättigten Fettsäuren zurückgeführt. Im Gegensatz dazu zeichnet sich einer der jüngsten FLAP Inhibitoren AM103<sup>124</sup> durch hohe Potenz und Selektivität mit vielversprechenden pharmakodynamischen Eigenschaften *in vivo* und hoher Effektivität in Tiermodellen zu akuten und chronischen Entzündungen aus.

### **Lösliche Epoxid Hydrolase**

Im CYP Signalweg wird AA über die die CYP Epoxygenasen CYP2C und CYP2J zu Epoxyeicosatriensäuren (EET) umgewandelt. EETs gehören zur den Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EDHF)<sup>125</sup>, die zu einer Hyperpolarisierung von glatten Muskelzellen und somit zu einer Gefäßerweiterung führen. Sie werden ebenfalls mit

anti-inflammatorischen und kardioprotektiven Effekten in Verbindung gebracht und werden primär in Endothelzellen synthetisiert.<sup>126,127</sup> Des Weiteren reduzieren sie die Plättchen-Aggregation und tragen damit zur vaskulären Homöostase bei. EETs werden im CYP Signalweg von der löslichen Epoxidhydrolase zu ihren korrespondierenden, jedoch nur noch schwach aktiven Diolen metabolisiert.<sup>128</sup> Neben der AA werden auch noch andere Fettsäuren, wie die  $\omega$ -6 Linolsäure (LA), die  $\omega$ -3  $\alpha$ -Linolsäure (ALA), die Eicosapentaensäure (EPA) oder Docosahexaensäure (DHA), über einen ähnlichen CYP-Signalweg oxidiert. Viele dieser Epoxid-Fettsäuren spielen eine Rolle in Schmerzprozessen, wobei dem Epoxid der DHA anti-hyperalgesische Effekte nachgewiesen werden konnten.<sup>129</sup> All diese Epoxid-Fettsäuren werden ebenfalls durch die sEH zu ihren korrespondierenden Diolen metabolisiert.

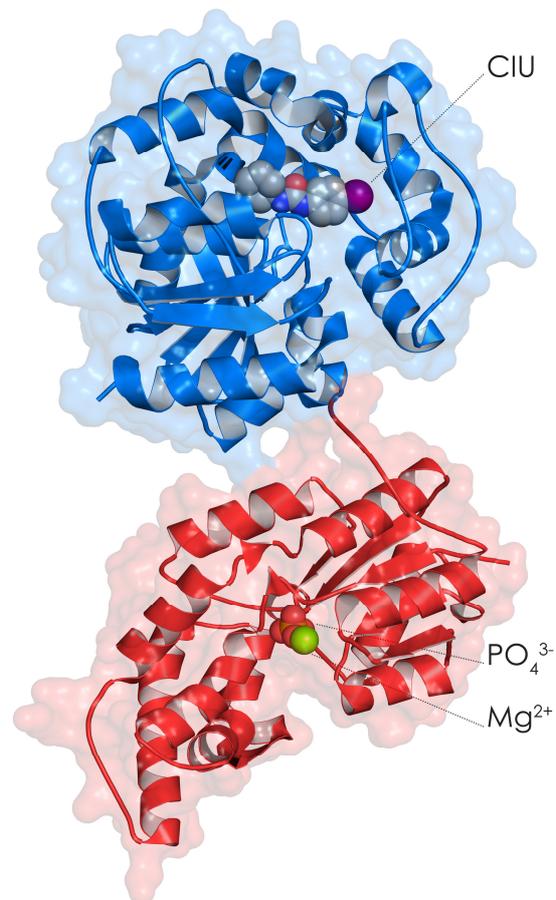


**Abb. 11:** CYP- und sEH-Teilzweig der Arachidonsäure Kaskade der in Zusammenhang mit der EET und DHET Biosynthese steht.

#### Struktur der sEH

Die sEH besitzt ein Molekulargewicht von 62 kDa und setzt sich aus 555 Aminosäuren zusammen (Abb. 8). Sie liegt als Homodimer sowohl im Zytosol als auch in Peroxisomen vor. Die sEH besitzt zwei funktionelle Domänen, die über einen Prolin-

reichen Linker verbunden sind. C-terminal befindet sich die Epoxid Hydrolase Domäne, in der vier regioisomere EETs (5,6-, 8,9-, 11,12- und 14,15-EET) zu ihren korrespondierenden Diolen (DHETs) umgewandelt werden.<sup>130</sup> Dieser katalytische Mechanismus basiert auf einer  $S_N2$ -Reaktion, in der das Epoxid zunächst durch Tyr381 und Tyr465 aktiviert wird und es simultan zu einem nukleophilen Angriff durch Asp333 kommt. Das entstehende Ester-Zwischenprodukt wird daraufhin über die katalytische Triade, bestehend aus Asp333, Asp495 und His523 hydrolysiert, wodurch das Diol entsteht und freigegeben wird.<sup>131</sup> N-terminal befindet sich die Phosphatase Domäne der sEH. Diese hydrolysiert diverse Phosphat Monoester, u.a. Isoprenoidphosphate und Phospholipide wie Lysophosphatidsäure (LPA).<sup>132</sup> Die Phosphatase Domäne gehört zur Gruppe der haloaciden Dehalogenasen (HADs), die sich durch eine hoch konservierte Sekundärstruktur, der Rossmann-Faltung, auszeichnen. Dieses Motiv besteht aus zusammengelagerten und alternierenden  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, die über vier Loops miteinander verbunden sind und die katalytische Domäne bilden. In Loop 1 befindet sich dabei meist ein Aspartat, das als Nukleophil eingesetzt wird. Im Fall der sEH-Phosphatase handelt es sich dabei um Asp9, das in einem ersten Schritt einen nukleophilen Angriff auf die Phosphoester Gruppe des Substrats ausführt. Im zweiten Schritt wird das entstandene Phosphoenzym Zwischenprodukt über ein durch Asp11 aktiviertes Wassermolekül hydrolysiert.<sup>133</sup>



**Abb. 12** Kristallstruktur der löslichen Epoxidhydrolase mit gebundenem Inhibitor CIU (PDB code: 1vj5). In blau die Hydrolase Domäne, in rot die Phosphatase Domäne.

### Physiologische Bedeutung

Es konnte gezeigt werden, dass EETs als parakrine und autokrine Mediatoren wirken, obwohl bis heute noch keine EET bindenden Rezeptoren identifiziert werden konnten.<sup>134</sup> EETs zeigen anti-inflammatorische Effekte im Endothelium, in dem sie TNF- $\alpha$  und IKK inhibieren und dadurch die NF- $\kappa$ B Aktivierung verringern.<sup>135</sup> In Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Entzündungsmodellen in Mäusen führte eine Inhibition der sEH zu einer Stabilisierung des Epoxid-Fettsäure-Spiegels im Blut und einer indirekt reduzierten 5-LO, COX-2 und VCAM-1 (engl.: vascular cell-adhesion molecule-1) Expression.<sup>136,137</sup> Weitere Tiermodelle konnten zeigen, dass die Zugabe von EETs oder die Inhibition der sEH ebenfalls zu anti-hyperalgesischen Effekten führt.<sup>138</sup> Dies ist von großem Interesse für die Behandlung von neuropathischen Schmerzen, in denen klassische NSAIDs oder Opiate nur geringe Wirkung oder schwere Nebenwirkungen zeigen.<sup>139</sup> Es wurden ebenfalls Blutdruck senkende Effekte nachgewiesen, weshalb sEH-Inhibition als mögliche Indikation für Hypertonie

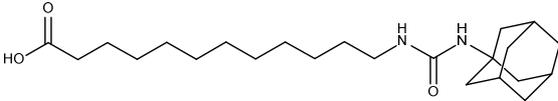
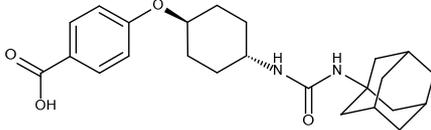
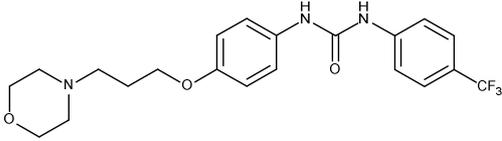
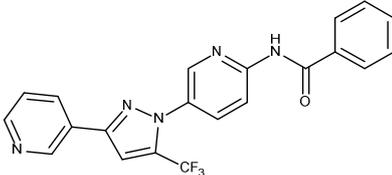
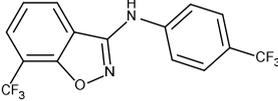
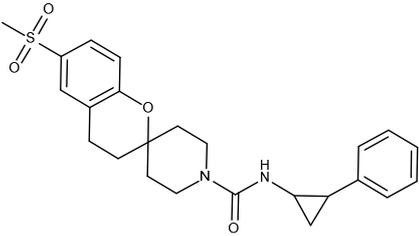
angesehen wird.<sup>140-143</sup> Die physiologische Bedeutung der sEH-Phosphatase Aktivität ist noch weitestgehend unbekannt, wobei es Hinweise auf eine Rolle in der Lipid Signaltransduktion gibt. Ebenfalls scheint sie in pathophysiologisch relevante Prozesse im Bereich Proliferation und Apoptose involviert zu sein. Jüngste Erkenntnisse deuten auch auf einen Einfluss auf die Cholesterin Regulation.<sup>144-146</sup>

#### Bekannte sEH-Inhibitoren

Die meisten bekannten sEH-Hydrolase Inhibitoren imitieren das Zwischenprodukt im Übergangszustand, welches während des katalytischen Prozesses entsteht.<sup>147</sup> Dazu besitzen eine Großzahl der bekannten Inhibitoren ein zentrales Pharmakophor bestehend aus einem Wasserstoffbrücken Donor und Akzeptor, das mit Tyr381, Tyr465 und Asp333 interagiert und somit die katalytische Triade blockiert. Dieses Motiv wird meist durch Harnstoffe oder Amide bereitgestellt. Aber auch Carbamate, Thioester, Thioharnstoffe und Amino-Heterozyklen sind schon als bioisosterer Ersatz beschrieben worden. Da sich die katalytische Triade relativ zentral in der Bindetasche befindet, entstehen links und rechts davon „Teiltaschen“, die so genannte Trp334 Nische und die größere Phe265 Tasche. Dabei kommen in der Trp334 Nische meist kleinere Substituenten, wie Phenyl, Hexyl, Adamantyl oder Zylohexyl, am zentralen Pharmakophor zum Einsatz.<sup>148</sup> Die andere Seite des Pharmakophors toleriert wiederum sehr viel größere Substituenten. Ein sehr prominentes Beispiel stellt dabei das 12-(3-adamantan-1-yl-ureido)dodecanoic acid (AUDA)<sup>149</sup> dar. Diese Verbindung ist zwar sehr potent, besitzt jedoch nur unzureichende pharmakokinetische Eigenschaften. Viele dieser auf Harnstoff basierenden Verbindungen sind jedoch nur schwer löslich. Diese Tatsache führte zur Entwicklung eines sekundären, bzw. tertiären polaren Pharmakophors, der sich typischerweise in einer Entfernung von ca. 7 Å, bzw. 17 Å zum primären Pharmakophor befindet. Des Weiteren wurden konformationelle Beschränkungen eingeführt um die Löslichkeit zu verbessern. Daraus resultierten Strukturen, wie z.B. t-AUCB, die Piperidin oder Cyclohexyl als Linker für den primären und sekundären Pharmakophor verwenden und dadurch die Struktur rigidisieren.<sup>150</sup> Ein weiteres Beispiel stellen Benzoxazol und Benzimidazol Verbindungen dar. Im Fall der Benzoxazol Verbindungen wird jedoch noch eine substituierte Amino-Gruppe benötigt, da der Stickstoff im Benzoxazol mit den Tyrosinen interagiert, jedoch erst die Amino-Gruppe die Interaktion mit Asp333 bereitstellen kann.<sup>151,152</sup>

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

Tabelle 2: Bekannte sEH-Inhibitoren.

Name	Struktur	Typ
AUDA		Harnstoff
t-AUCB		Harnstoff, rigidisiert
Arête Therapeutics <sup>153</sup>		Harnstoff, mit sekundärem und tertiärem Pharmakophor
Boehringer Ingelheim <sup>154</sup>		Pyrazolamid
Merk <sup>155</sup>		Amino- heteroaryl
Merk <sup>156</sup>		Spirozyklisch, sekundärer Harnstoff

### **Zusammenhang zwischen den verschiedenen Signalwegen**

Viele unterschiedliche Lipid Mediatoren, die während der Metabolisierung der AA in den verschiedenen Signalwegen entstehen, sind sowohl an der Entstehung als auch an der Auflösung entzündlicher Prozesse beteiligt. Es liegt deshalb nahe, dass es ein Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Mediatoren, bzw. Signalwegen geben muss, welches eine Regulation der gesamten Kaskade ermöglicht. Dieser regulatorische Zusammenhang wurde jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des COX-Signalweges sogenannte *shunting* Effekte (zu dt.: Verschiebungen) zur Folge hat, wodurch der AA Metabolismus in Richtung LOX-Signalweg verschoben wird.<sup>157</sup> Dieser Effekt wird auch in Zusammenhang mit dem sogenannten Aspirin-induzierten Asthma gesehen.<sup>158</sup> Umgekehrte Effekte wurden in LPS induzierten Mausmodellen nachgewiesen, bei denen eine 5-LO-Inhibition nicht nur die 5-HETE Produktbildung reduziert sondern auch eine gesenkte PGE<sub>2</sub> und TXB<sub>2</sub> Bildung, beides COX-Metaboliten, mit sich führte.<sup>136,137</sup> Des Weiteren konnten synergistische Effekte zwischen dem COX- und CYP-Signalweg gezeigt werden, in dem man durch Co-Inhibition der COX und der sEH zu einen additiven Effekt auf die Schmerzlinderung nachwies.<sup>159</sup> Dieser Effekt ist deshalb von besonderer Bedeutung, da die verwendeten NSAIDs und Coxibe in einer pharmakologisch unzureichenden Dosis verabreicht wurden, die ohne simultane sEH-Inhibition zu keinerlei Effekt geführt hätten. Es wird vermutet, dass die sEH-Inhibition zu einer Erhöhung der anti-inflammatorischen EETs führt und zusätzlich das COX-Expressionslevel reduziert, was bereits in Kombination mit einer geringen COX-Inhibition zu einem stark reduzierten PGE<sub>2</sub> Spiegel führt. Die Inhibition der sEH führte in LPS-induzierten Mausmodellen neben diesen Effekten ebenfalls zu reduzierten 5-HETE und 15-HETE Plasma Spiegeln im Vergleich zu einer LPS-induzierten Kontrolle. Diese Ergebnisse stehen jedoch in einem Widerspruch zu den Studien von Jung et. Al. bei denen eine sEH Inhibition in einem 5/6-Nephrectomie-Mausmodell zu einem Shunting-Effekt in Richtung der Lipoxygenasen und damit verbunden zu einer erhöhten 5-LO-Produktbildung führte.<sup>160</sup> All diese Effekte deuten auf eine bidirektionale Verknüpfung der verschiedenen AA-Signalwege hin und könnte somit eine Art Feedback-Regulation der gesamten AA-Kaskade darstellen.<sup>161</sup>

Diese starke Verknüpfung legt die Entwicklung dualer oder multipler Inhibitoren nahe, die gleich mehrere Enzyme der AA-Kaskade gleichzeitig adressieren. Dabei stellen die dualen COX-2/5-LO-Inhibitoren die am meisten untersuchten Vertreter

dar. Diese können ebenfalls in die 5-LO typischen Kategorien eingeteilt werden: redox-aktive Inhibitoren, Eisenchelatoren und nicht-redox/nicht-chelatierende Inhibitoren. Unter den redox-aktiven dualen Inhibitoren zählt die Verbindung S-2474<sup>162</sup> zu den vielversprechendsten Strukturen. Sie stellt ein di-tert-Butylphenol Derivat dar, das sich zurzeit in klinischen Phasen zu Behandlung für Arthritis befindet. Zu den Eisen chelierenden dualen Inhibitoren gehören diverse Celecoxib Derivate, bei denen z.B die Toluy-Gruppe des Celecoxib durch eine N-difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-on Gruppe ausgetauscht wurde.<sup>163</sup> Auch für Celecoxib konnte man bereits eine 5-LO-Inhibition (niedrig mikromolar in PMNL und Vollblut Assay Systemen) nachweisen.<sup>164</sup> Für den COX-1/2 Inhibitor Sulindac konnte ein gastrointestinal-schützender Effekt nachgewiesen werden, der auf die 5-LO-inhibierende Eigenschaft des Sulindac Metaboliten Sulindac Sulfid zurückgeführt werden konnte.<sup>165</sup> Licofelone stellt den prominentesten Vertreter der dualen COX/5-LO-Inhibitoren dar.<sup>166</sup> Es inhibiert neben COX-1 und COX-2 auch FLAP, weshalb es neben dem gastrointestinal schützenden Effekt durch die verringerte 5-LO-Produktbildung auch anti-thrombotische Eigenschaften durch die COX Inhibition aufweist. Licofelone kam bis in die klinische Phase III zur Behandlung von Osteoarthritis, dennoch wurde die Entwicklung letztendlich eingestellt. Neben den COX/LOX dualen Inhibitoren wurden jüngst auch duale COX/sEH- und 5-LO/sEH-Inhibitoren entwickelt. Einer der vielversprechendsten COX-2/sEH-Inhibitoren ist eine Fusion aus Celecoxib und t-AUCB Substrukturen, welche auf beiden Enzymen im mikromolaren, bzw. sub-mikromolaren Bereich aktiv ist.<sup>167</sup> Der Vorteil eines dualen COX/sEH-Inhibitors zur Behandlung von Schmerz und Entzündungen besteht neben den synergistischen Effekten darin, dass man die Nebeneffekte durch eine geringere COX-Hemmung mindert, aber zusätzlich den Spiegel der anti-inflammatorischen EETS durch Inhibition der sEH anhebt. Andererseits bildeten mit sEH-Inhibitoren behandelte Mäuse auch eine Albuminurie aus, was auf eine Verschiebung hin zum 5-LO-Signalweg zurückgeführt wird.<sup>160</sup> Somit könnte die Entwicklung dualer 5-LO/sEH-Inhibitoren sowohl zu effektiveren anti-inflammatorischen Wirkstoffen als auch zu sichereren Antihypertensiva führen. Meirer et al. folgten dazu ebenfalls einer Fusionsstrategie und entwickelten duale 5-LO/sEH-Inhibitoren basierend auf der Verbindung von Imidazo[1,2-a]pyridinen in Kombination mit Aryl-Harnstoff Strukturen.<sup>168</sup>

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

Tabelle 3: Bekannte duale Inhibitoren.

Name	Struktur	Typ
S-2474		COX/ 5-LO
		COX/ 5-LO
Sulindac sulfid		COX/ 5-LO
Licofelone		COX/ 5-LO (FLAP)
		COX/ sEH
		5-LO/ sEH

### **Drug Repositioning**

Drug Repositioning (oder Drug Repurposing) stellt eine weitere Möglichkeit dar, wie Polypharmakologie sinnvoll zum Einsatz kommen kann. Drug Repositioning beschäftigt sich mit der Wiederverwertung bereits auf dem Markt befindlicher Wirkstoffe oder Wirkstoffkandidaten für neue Indikationen. Viele Drug Repositioning Projekte folgen dabei dem „selective optimization of side activities“ (SOSA) Ansatz.<sup>169</sup> Dieser Ansatz besteht im Grunde aus zwei Schritten. Zunächst werden bekannte Wirkstoffe auf ihre Nebeneffekte hinsichtlich neuer Targets, bzw. damit verbundenen Indikationen untersucht und anschließend mittels gängiger Methoden zu einer neuen Leitstruktur optimiert. Der große Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass solche Wirkstoffe meist umfassend hinsichtlich toxikologischer Nebeneffekte untersucht wurden und bereits über gute pharmakokinetische Eigenschaften verfügen. Somit stellen solche Wirkstoffe ideale Leitstrukturen oder bereits potentielle Kandidaten für klinische Phasen dar, was ein immenses Ersparnis an Ressourcen und Zeit darstellt und die Entwicklung neuer Wirkstoffe deutlich beschleunigen kann. Zu den bekanntesten Vertretern an Wirkstoffen, die mittels Drug Repurposing entwickelt wurden, gehören z.B. Sildenafil<sup>170</sup> und Memantin<sup>171</sup>. Sildenafil wurde ursprünglich zur Behandlung von Bluthochdruck und Angina Pectoris entwickelt, zeigte jedoch während klinischen Studien vasodilatorische Eigenschaften. Daraufhin wurde dieser Nebeneffekt zur Hauptindikation weiter entwickelt, woraufhin Sildenafil als PDE5-Hemmer zur Behandlung erektiler Dysfunktion unter dem Namen Viagra® zugelassen wurde. Memantin hingegen stellt eine Weiterentwicklung des bereits auf dem Markt befindlichen Amantadin, einem Virostatikum bei Influenza-A, dar. Es wurde zunächst zur Behandlung des organischen Psychosyndroms, Hirnleistungsstörungen und der Parkinson-Krankheit und erst später in Folge einer Indikationserweiterung zur Behandlung der moderaten bis schweren Alzheimer-Demenz zugelassen. Ebenfalls im Bereich oraler Antidiabetika, bei der Entwicklung von Tolbutamid, kam der SOSA Ansatz zum Einsatz. Tolbutamid wird zur Behandlung von Typ-2-Diabetes eingesetzt.<sup>172</sup> Es gehört zur Klasse der Sulfonylharnstoffe und entstand aus der Entwicklung eines antimikrobiellen Sulfacarbamid, das während klinischer Studien hyperglykämische Krämpfe hervorrief.

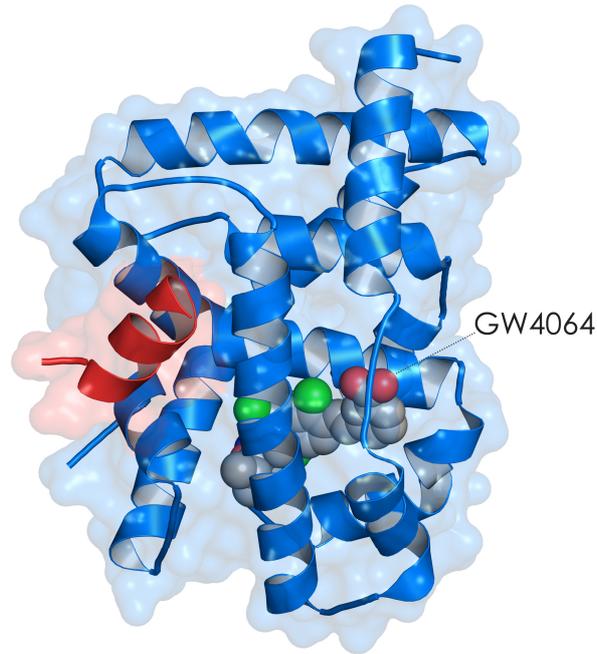
### **Farnesoid X Rezeptor**

Ein weiteres Target, welches mit Diabetes in Zusammenhang gebracht wird, ist der nukleäre Farnesoid X Rezeptor (FXR), ein potentielles Target zur Behandlung des

metabolischen Syndroms. Im Zuge dieser Arbeit wurden sowohl mit Hilfe von virtuellem Screening als auch über einen Drug Repurposing Ansatz neue FXR-modulierende Liganden identifiziert, weshalb im Folgenden näher auf Struktur und physiologische Bedeutung eingegangen wird.

### Struktur

Der FXR besitzt ein Molekulargewicht von ca. 57 kDa und setzt sich aus 486 Aminosäuren zusammen (Abb. 13). Er gehört zur Subfamilie 1, Gruppe H, Mitglied 4 der nukleären Rezeptoren. Der FXR ist nach dem gleichen Grundbauplan aufgebaut, wie die meisten nukleären Rezeptoren. N-terminal befindet sich zunächst eine Liganden-unabhängige activation function 1 (AF-1), gefolgt von der DNS-Bindedomäne (DBD). Die DBD ist über eine hinge-Region mit der Liganden-Bindedomäne (LBD) verbunden und wird C-terminal von der Liganden-abhängigen activation function 2 (AF-2) abgeschlossen. Ähnlich wie andere nukleäre Rezeptoren, befindet sich auch in der FXR-DBD ein Zinkfingermotiv, das an der DNA Bindung und Dimerisierung beteiligt ist. Der LBD und AF-2 Bereich ist ebenfalls an der Dimerisierung und zusätzlich an der Interaktion mit Koaktivatoren beteiligt.<sup>173</sup> Es existieren vier unterschiedliche humane FXR-Isoformen (FXR $\alpha$ 1 – FXR $\alpha$ 4), die durch unterschiedliche Promotoren und alternatives Splicing entstehen und deren physiologischer Unterschied bisher nicht bekannt ist.<sup>174</sup> Es existiert eine Vielzahl an FXR-Kristallstrukturen, sowohl ohne als auch mit gebundenem Liganden. Wie bei vielen Liganden-aktivierten nukleären Rezeptoren wird die Bindetasche durch die Helices 3, 5, 10 und 12 geformt. Nach erfolgter Liganden Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch sich Helix 12 in Richtung der Helices 3, 4 und 10 orientiert und dadurch die Interaktion mit den nötigen Koaktivatoren ermöglicht.<sup>175</sup> Ein deutlicher Unterschied zu anderen nukleären Rezeptoren zeigt sich jedoch im Bindemodus der steroidartigen Liganden, die in der FXR-LBD entgegengesetzt zu anderen LBD orientiert sind. Somit ragt die Carboxyl-Gruppe in Richtung des Bindetaschen Eingangs und geht dort eine essentielle Interaktion mit Arg331 ein.<sup>176</sup>



**Abb. 13:** Kristallstruktur von FXR mit gebundenem Inhibitor GW4064 (PDB code: 3DCT).

#### Physiologische Bedeutung

FXR wird vorrangig in der Leber, Nebenniere und im Darm, aber auch in Gefäßmuskelzellen und Immunzellen, wie Monozyten und Lymphozyten, exprimiert.<sup>177,178</sup> Der FXR gehört zu den Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren. Durch die Bindung eines Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, die wiederum dazu führt, dass gebundene Korepressoren dissoziieren und damit die Bindung für andere Proteine, sogenannten Koaktivatoren ermöglichen (Abb. 14). Erst dadurch kann der FXR als Heterodimer zusammen mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR) an Promotoren der DNS binden und darüber die Transkription der jeweiligen Gene aktivieren.<sup>174</sup> Als physiologischen Liganden konnten verschiedene Gallensäuren, wie Chenodeoxycholinsäure (CDCA), Deoxycholinsäure (DCA) und Litocholinsäure (LCA), identifiziert werden.<sup>179-181</sup> Zu den wichtigsten Targetgenen, also Genen, die durch FXR-Aktivierung reguliert werden, gehören verschiedene Gene des Gallensäure- und Fettsäurestoffwechsels. Darunter befindet sich auch der nukleäre Rezeptor small heterodimer partner (SHP). Dieser wird durch FXR-Aktivierung vermehrt exprimiert und führt zu einer Hemmung der Transkription verschiedener Gene, die mit dem Gallensäure- und Lipidstoffwechsel in Zusammenhang stehen.<sup>175</sup> Des Weiteren wird die Cholesterolhydroxylase CYP7A1 durch eine SHP vermittelte Inhibition des nukleären Rezeptors liver receptor homologue 1 (LRH-1) herunter

reguliert. CYP7A1 katalysiert die Gallensäure Synthese aus Cholesterol und stellt somit einen negativen Feedback-Mechanismus dar, um eine toxische Überproduktion von Gallensäuren zu verhindern. Eine FXR-Aktivierung führt auch zu einer erhöhten Expression der bile salt export pump (BSEP), die verschiedene Gallensäuren aus der Leber in die Gallenblase transportieren. Damit ist der FXR maßgeblich am Cholesterol- und Gallensäure Metabolismus und deren Homöostase beteiligt.<sup>182</sup> Außerdem konnte man einen Einfluss vom FXR sowohl auf die Insulin Sensitivität und Glucose Homöostase<sup>183,184</sup> als auch auf eine Reduktion des Triglycerid Plasma Spiegels nachweisen.<sup>185,186</sup> In Tiermodellen zur Untersuchung von Nierenschäden in diabetischer Nephropatie konnte gezeigt werden, dass ein FXR-knockout zu beschleunigten Nierenschäden führte, wohingegen die Zugabe des FXR-Agonisten INT-747 den Schaden verringerte.<sup>187</sup> In diabetischen Tiermodellen zeigten FXR-Agonisten protektive Effekte in der Niere und führten zu einer Linderung von Proteinurie und Glomerulosklerose. In FXR-defizienten Mäusen wurde eine spontane Lebertumorbildung festgestellt.<sup>188,189</sup> Hingegen konnte man durch FXR-Agonisten protektive und regenerative Effekte nachweisen, weshalb eine FXR-Aktivierung als mögliche Behandlung der nicht-alkoholischen Fettleber denkbar wäre. In Hinblick auf den Einfluss von FXR auf den Gallensäure-, Triglycerid und Fettsäurestoffwechsel ist ebenfalls eine Behandlung des metabolischen Syndroms, der Hypertriglyceridämie und Diabets mellitus Typ II durch FXR-Modulatoren denkbar.

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

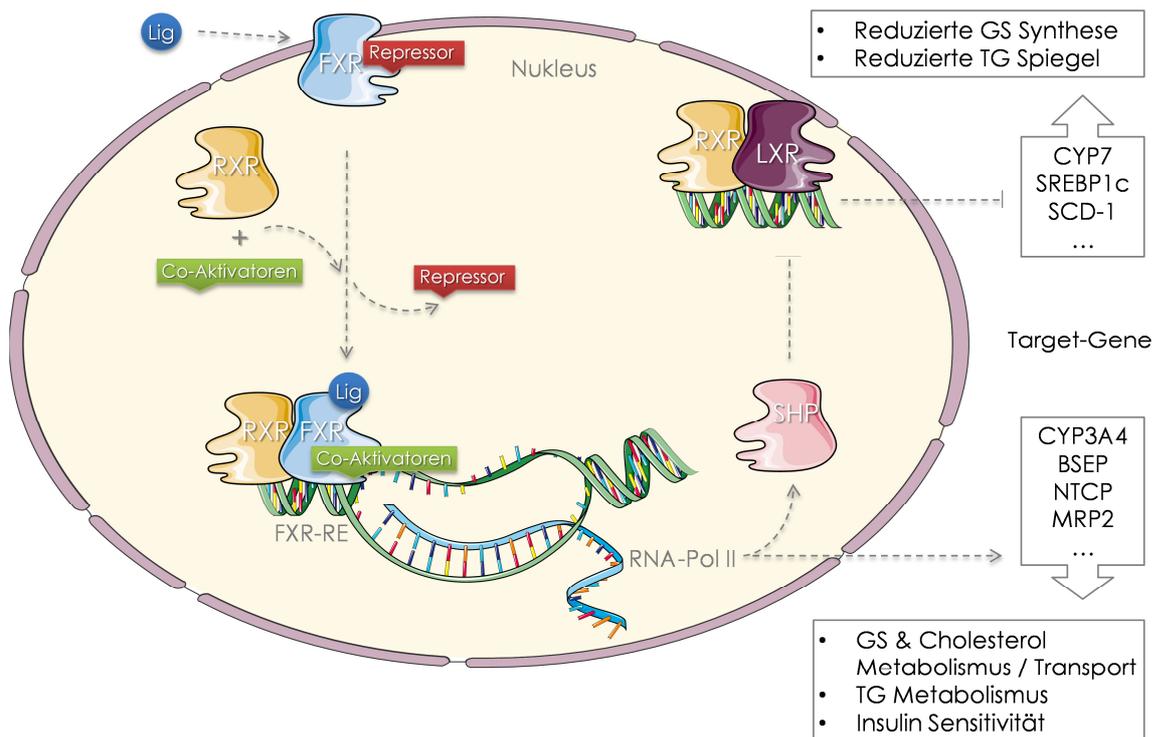


Abb. 14: Zelluläre Regulation des Farnesoid X Rezeptors und seiner Target-Gene.

### Bekannte Modulatoren

Die Beurteilung neuer FXR-Modulatoren ist stark abhängig vom verwendeten Assay System. Sowohl die Art der Bindung als auch die Stärke der Aktivierung in Bezug auf konformationelle Änderungen kann einen großen Einfluss auf die Anzahl und Art der durch FXR-aktivierten Gene haben. Dieser Zusammenhang zwischen partiellem und vollem Agonismus ist bis heute jedoch noch nicht eindeutig geklärt.<sup>190</sup>

Gallensäuren wurden als physiologische FXR-Liganden identifiziert, woraufhin die ersten Derivate als synthetische FXR-Agonisten folgten. Einer der potentesten Derivate stellt das 6 $\alpha$ -Ethyl-CDCA (INT-747) dar.<sup>191</sup> Die an der 6 $\alpha$  Position des CDCA eingeführte Ethylgruppe führt zu einer Steigerung der Affinität von EC<sub>50</sub> ~ 8  $\mu$ M auf EC<sub>50</sub> ~ 100 nM im Vergleich zu CDCA. Weitere Alkylierungen an anderen Positionen führten zu keiner Verbesserung der Aktivität oder gar einem kompletten Verlust der Aktivität. INT-747 stellt bisher die einzige Verbindung dar, die es in klinische Phase II Studien zur Behandlung von primärer biliärer Zirrhose und nicht-alkoholischer Fettleber geschafft hat. Auf Grund der bekannten, möglichen Nebeneffekte von steroidal Verbindungen wurden folglich nicht-steroidale FXR-Agonisten entwickelt. Zu den bekanntesten Strukturen gehören das Isoxazol GW4064 und dessen Derivate.<sup>192</sup> Es besitzt eine Affinität von EC<sub>50</sub> ~ 90 nM und im Vergleich zu CDCA eine

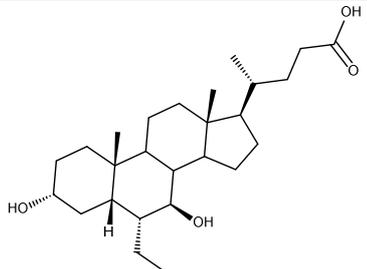
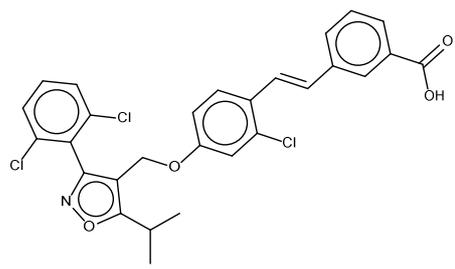
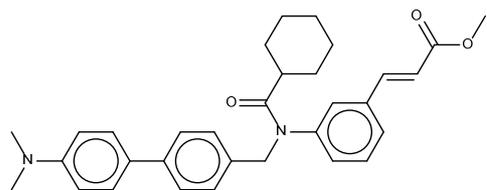
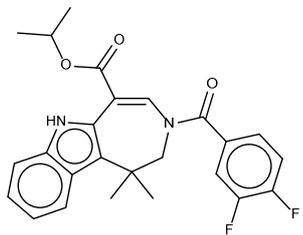
relative, maximale FXR-Aktivierung von 140 %. Auf Grund von geringer Bioverfügbarkeit und toxischen Effekten durch das Stilbengerüst schaffte es die Verbindung nie in klinische Phasen.<sup>193,194</sup> GW4064 wird heute jedoch sehr häufig als FXR-Vollagonist Referenzstruktur in Assaysystemen verwendet. Es wurden diverse Derivate dieser Struktur entwickelt, um die pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindung zu verbessern, die es bis in klinische Studien<sup>1</sup> zur Behandlung von nicht-alkoholischer Fettleber geschafft haben. Eine weitere intensiv untersuchte Substanzklasse stellen Fexaramin und seine Derivate dar.<sup>195</sup> Fexaramin besitzt eine Affinität von  $EC_{50} \sim 25$  nM und war der erste kokristallisierte, nicht-steroidale FXR-Ligand. Die Bindepose von Fexaramin unterscheidet sich deutlich von der Bindepose von z.B. GW4064 oder INT-747. Diese Tatsache führte zu der Erkenntnis, dass unterschiedliche Bindeposen zu unterschiedlichen Rezeptor Konformationen und daraus resultierend auch zu abweichenden Genexpressionprofilen führen. Einer der letzten, publizierten FXR-Modulatoren stellt FXR-450 (WAY-362450) der Firma Wyeth dar.<sup>196</sup> Er zeigte sowohl eine höhere Potenz als auch Effektivität mit einem  $EC_{50} \sim 4$  nM und einer FXR-Aktivierung von 149% im Vergleich zu CDCA. Die Derivate zeigten sowohl hohe FXR-Selektivität im Vergleich zu anderen nukleären Rezeptoren als auch eine gute orale Bioverfügbarkeit. In ersten Tierstudien zeigten Derivate in Mäusen einen reduzierten Serum-LDL Spiegel und in Primaten eine generelle Senkung diverser Lipide, wie very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL) und Triglyceriden.<sup>185</sup>

---

<sup>1</sup> <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01999101>

Einleitung:  
Bedeutung der Polypharmakologie in der Wirkstoffentwicklung

Tabelle 4: Bekannte FXR-Inhibitoren.

Name	Struktur	EC <sub>50</sub> (nM)
INT-747		8300
GW4064		90
Fexaramin		25
FXR-450		4

## Ergebnisse und Diskussion

Duale sEH/5-LO-Liganden:

Paper I:

Moser, D.; Wisniewska, J. M.; Hahn, S.; Achenbach, J.; Buscató, E.; Klingler, F.; Hofmann, B.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Dual-Target Virtual Screening by Pharmacophore Elucidation and Molecular Shape Filtering. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 155–158.

Paper II:

Achenbach, J.; Klingler, F.-M.; Blöcher, R.; Moser, D.; Häfner, A.-K.; Rödl, C. B.; Kretschmer, S.; Krüger, B.; Löhr, F.; Stark, H.; Hofmann, B.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Exploring the Chemical Space of Multitarget Ligands Using Aligned Self-Organizing Maps. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1169–1172.

Farnesoid X Rezeptor Agonisten:

Paper III:

Steri, R.; Achenbach, J.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Proschak, E. Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *83*, 1674–81.

Paper IV:

Achenbach, J.; Gabler, M.; Steri, R.; Schubert-Zsilavec, M.; Proschak, E. Identification of novel farnesoid X receptor modulators using a combined ligand- and structure-based virtual screening. *MedChemComm.* **2013**, *4*, 920.

## Duale sEH/5-LO-Liganden

Hintergrund:

Die Anzahl der jährlich neu zugelassenen Wirkstoffe sinkt stetig und lässt sich in vielen Fällen auf Toxizität oder eine zu geringe in vivo Wirksamkeit in vorangegangenen klinischen Studien zurückführen. Gleichzeitig deuten jüngste Ergebnisse aus der Systembiologie darauf hin, dass viele mögliche pharmakologische Targets Teil eines komplexen, funktionalen Netzwerkes darstellen.<sup>197–200</sup> Es konnte gezeigt werden, dass viele bereits zugelassene Wirkstoffe gerade deshalb so wirksam sind, weil sie mit mehreren Targets eines solchen Netzwerkes interagieren. Diese Erkenntnisse führten zur gezielten Entwicklung neuer polypharmakologischer, sogenannter multi-target Wirkstoffe. Die rationale Entwicklung solcher Wirkstoffe, die gezielt mehrere relevante Targets adressieren, ohne dabei mit möglichen off-Targets zu interagieren, stellt jedoch eine große Herausforderung dar. Morphy und Rankovic<sup>201</sup> stellen verschiedene Herangehensweisen vor, die allesamt auf der Kombination selektiver Liganden der einzelnen zu adressierenden Targets beruhen. Ein naheliegender Ansatz stellt dabei die Verbindung selektiver Liganden einzelner Targets über flexible oder spaltbare Linker dar. Solche Hybrid-Liganden können zwar in vitro eine hohe Wirksamkeit aufweisen, jedoch kann das durch die Kombination zweier Wirkstoffe einhergehende hohe Molekulargewicht zu ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und damit verbunden zu einer geringen in vivo Aktivität führen. Gleichermäßen lässt die hohe Komplexität solcher Verbindungen wenig Raum für die Optimierung von pharmakokinetischen oder pharmakodynamischen Eigenschaften. Eine Alternative zu diesem Ansatz stellt die Kombination oder gar Verschmelzung der relevanten Grundgerüste von selektiven Liganden einzelner Targets dar. In diesem Fall werden nur die aktiven Strukturelemente der einzelnen Liganden kombiniert, die im Idealfall gemeinsame Substrukturen, bzw. Pharmakophor-Elemente aufweisen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die entstehenden Verbindungen eine geringere Komplexität aufweisen, somit mehr Raum für weitere Optimierungen bieten und im besten Fall die für die jeweilige biologische Aktivität relevanten Substrukturen in sich vereinen.

Wie eingangs erwähnt, bietet sich das Konzept der multi-Target Wirkstoffe besonders bei jenen Targets an, die zu einem gemeinsamen, funktionalen Netzwerk gehören, dessen Störung mit einer bestimmten Indikation in Verbindung gebracht wird. Ein solches Beispiel stellen die 5-Lipoxygenase (5-LO) und die lösliche Epoxidhydrolase

(sEH) dar. Diese Enzyme sind Bestandteil zweier Signalwege, die in der übergeordneten Arachidonsäure (AA) Kaskade lokalisiert sind. Sie werden unter anderem mit Schmerz, entzündlichen und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht. In vivo konnte gezeigt werden, dass die simultane Inhibition des 5-LO als auch des sEH-Signalweges zu synergistischen Effekten bei der Behandlung von inflammatorischen Prozessen führen kann.<sup>161</sup> In Tiermodellen führte allerdings eine alleinige Inhibition der sEH zur Behandlung von Bluthochdruck zu Albuminurie.<sup>160</sup> Diese Nebeneffekte deuten auf eine Verschiebung innerhalb der AA Kaskade in Richtung des 5-LO-Signalweges hin. Somit könnte die Entwicklung dualer sEH/5-LO-Liganden sowohl zu wirksameren anti-inflammatorischen als auch zu sichereren antihypertensiven Wirkstoffen führen.<sup>202</sup>

In den folgenden Studien wurden zwei unterschiedliche, chemieinformatische Ansätze verfolgt, um gemeinsame Pharmakophore, bzw. relevante Substrukturen für die duale Inhibition der 5-LO und sEH zu identifizieren.

### **Paper I: Dual-Target Virtual Screening by Pharmacophore Elucidation and Molecular Shape Filtering.**

In dieser Studie sollten neue duale sEH/5-LO-Inhibitoren anhand gemeinsamer Pharmakophore von bekannten sEH- bzw. 5-LO-Liganden identifiziert werden. Dazu wurden zunächst eine große Anzahl unterschiedlicher Pharmakophor-Modelle basierend auf bekannten aktiven Liganden der jeweiligen Targets separat erzeugt. Diese Liganden wurden aus der ChEMBL Datenbank (Version 9) extrahiert, wobei ausschließlich Liganden mit einem gemessenen  $IC_{50} < 10 \mu M$  verwendet wurden. Dies führte zu 677 sEH- und 9145-LO-Liganden, aus denen nach einem Clustering-Schritt jeweils 50 chemisch diverse Liganden für die Generierung der Pharmakophor-Modelle verwendet wurden. Die Modelle wurden mit Hilfe der „Pharmacophore Elucidator“-Routine der Software Suite „Molecular Operating Environment“ (MOE) generiert, wobei drei verschiedene Konfigurationen verwendet wurden. Je nach Konfiguration wurden bei der Generierung entweder alle möglichen Pharmakophor-Typen gleich behandelt, oder aber Wasserstoffbrücken-Donoren und Akzeptoren oder aromatische Pharmakophor-Typen bevorzugt generiert. Dies sollte die Variabilität der generierten Modelle erhöhen. Auf diese Weise wurden 6764/1469

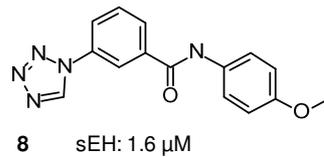
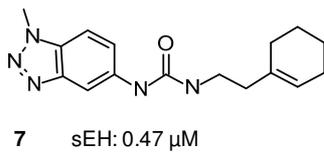
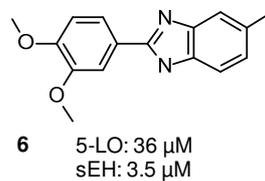
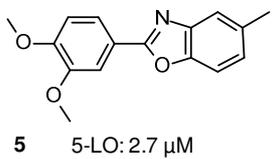
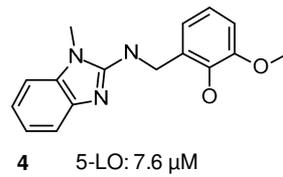
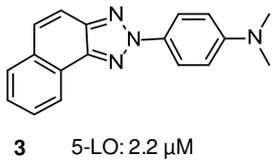
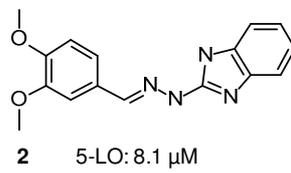
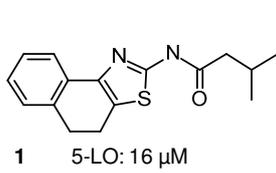
(sEH/5-LO), 33/118 und 6190/1362 Pharmakophor-Modelle für die jeweiligen Targets erzeugt.

Im nächsten Schritt wurden die jeweiligen Modelle der beiden Targets mit Hilfe eines Graphen-basierten Ansatzes räumlich überlagert. Ausschließlich Modelle mit einem Mindestmaß an Übereinstimmung hinsichtlich der verglichenen Pharmakophor-Typen und ihrer räumlichen Orientierung wurden im Folgenden betrachtet, was die Anzahl potentiell „dualer Modelle“ auf 129, 31 und 92 Modelle reduzierte. Diese Modelle sollten im Idealfall das minimale Pharmakophor für die biologische Aktivität auf beiden Targets in sich vereinen und wurden daher zur anschließenden Suche nach dualen Liganden verwendet. (Abb. 15b)

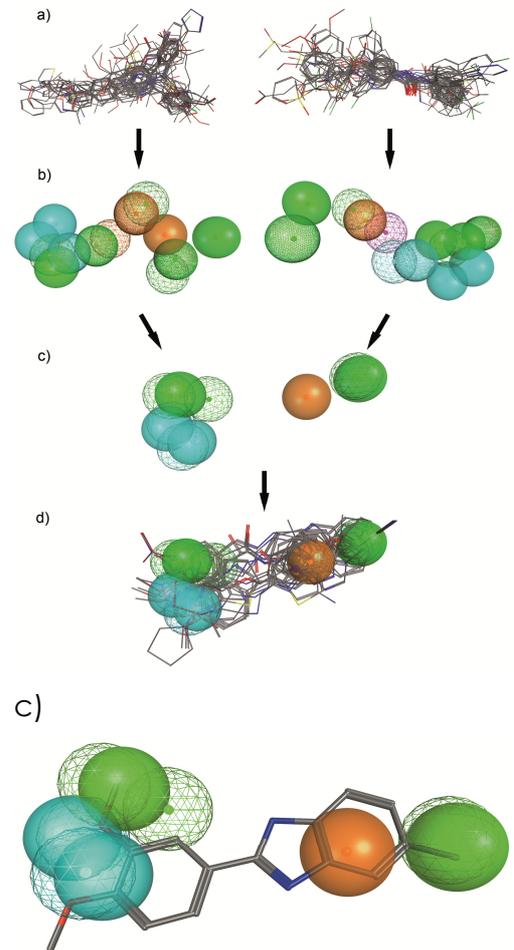
Zur Suche wurde die Asinex „merged fragments“ Molekülbibliothek verwendet, die zu diesem Zeitpunkt 37429 Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner 350 Da beinhaltete. Die Suche ergab 645 / 200 / 2071 Hits, aus denen nach anschließender Scaffold-Analyse und Shape-Filter mit Hilfe der Software ShaEP jeweils 40 potentielle duale Liganden ausgesucht wurden. Dabei wurde ersichtlich, dass die erste Pharmakophor-Konfiguration, welche alle Pharmakophor-Typen bei der Generierung gleichermaßen behandelte, zu sehr unspezifischen Modellen führte und somit auch die Suche mit diesen Modellen keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzeugte. Aus diesem Grund wurden ausschließlich aus den jeweils 40 Hits der zweiten und dritten Modell-Konfiguration letztendlich insgesamt 36 Moleküle manuell ausgewählt, bestellt und in vitro getestet.

Für neun der 36 Moleküle konnte ein  $IC_{50} < 50 \mu M$  für mindestens eines der beiden Targets gemessen werden (Abb. 15a). Verbindung **6** wirkte auf beiden Targets inhibierend mit einem  $IC_{50}$  von  $3,5 \mu M$  auf der sEH und  $36 \mu M$  auf der 5-LO. Betrachtet man diese neun Verbindungen genauer, wird deutlich, dass eine Inhibition der sEH nur dann gewährleistet wird, wenn der Ligand in unmittelbarer räumlicher Nähe ein Wasserstoffbrücken-Donor/Akzeptor Paar besitzt, wie z.B. die beiden Stickstoffatome im Falle des Benzimidazol-Gerüsts von Verbindung **6**. Tauscht man das Benzimidazol durch ein Benzoxazol-Gerüst aus, hat dies einen Verlust der Inhibition auf der sEH zur Folge. Obwohl diese grundlegende Eigenschaft durch die verwendeten Pharmakophor-Modelle nicht explizit berücksichtigt wurden (Abb. 15c), war die Kombination aus Pharmakophor-Suche und Shape-Filter geeignet, neue 5-LO-und sEH-Inhibitoren, bzw. einen dualen sEH/5-LO-Inhibitor zu identifizieren.

a)



b)



**Abb. 15** a) Gemessene  $\text{IC}_{50}$  Werte der identifizierten Verbindungen. b) skizzierter Ablauf des Pharmacophor-Alignment Algorithmus. c) Überlagerung der Pharmacophormodelle aus sEH und 5-LO die zur Identifikation der dualen Verbindung **6** führte.

## Paper II: Exploring the Chemical Space of Multitarget Ligands Using Aligned Self-Organizing Maps.

Die Suche nach dualen oder multitarget Liganden bedeutet aus chemieinformatischer Sicht jenen Teil des gesamten chemischen Raumes zu finden, in dem sich aktive Liganden aller betrachteten Targets befinden. Dieser gemeinsame Unterraum stellt unter Umständen nur einen Bruchteil des chemischen Raumes aller aktiven Liganden der individuellen Targets dar und wiederum einen noch viel geringeren Teil des gesamten, chemischen Raumes aller möglichen wirkstoffartigen Verbindungen (Abb. 16b-1). Um diesen vergleichsweise kleinen Unterraum zu identifizieren, wurde in dieser Studie eine chemieinformatische Methode entwickelt, um chemische Räume zu modellieren und vor allem zu vergleichen. Diese Methode, die sogenannte MultiSOM, basiert auf dem Prinzip, dass man mit Hilfe von selbstorganisierenden Karten (engl.: self-organizing map, SOM) beliebige, hochdimensionale Datenräume auf einer zweidimensionalen Karte abbilden kann. Zusätzlich besitzen SOMs die Eigenschaft, dass ähnliche Regionen des ursprünglichen Datenraumes auch in benachbarten Regionen, den sogenannten Neuronen, auf der Karte wiederzufinden sind.

Der chemische Raum eines Targets lässt sich anhand der chemischen Strukturen der aktiven Liganden definieren. Diese Liganden können durch chemische Deskriptoren oder sogenannte molekulare Fingerabdrücke in eine mathematische, meist hochdimensionierte Repräsentation überführt werden. Diese Beschreibung aller bekannten, aktiven Liganden eines Targets stellt somit einen hochdimensionalen Datenraum dar, der mit Hilfe einer SOM auf einer zweidimensionalen Karte abgebildet werden kann.

In dieser Studie dienten aktive Liganden von sEH und 5-LO ( $IC_{50} < 10 \mu M$ ), welche zuvor aus der ChEMBL Datenbank (Version 12) extrahiert wurden, als Beschreibung des chemischen, wirkstoffartigen Raumes von sEH- und 5-LO-Liganden. Wie eingangs beschrieben, wurde versucht, möglichst Verbindungen mit geringer chemischer Komplexität (Fragmente) zu identifizieren. Solche Fragmente bieten ausreichende Möglichkeiten für spätere Optimierungen von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften. Aus diesem Grund wurden die aktiven Liganden beider Targets zunächst in Substrukturen zerlegt. Dabei kam ein

Algorithmus zum Einsatz (Molecular Substructure Miner, MoSS), welcher nicht nur die häufigsten Substrukturen eines Sets aktiver Liganden identifizieren kann, sondern zusätzlich häufige Substrukturen eines als „inaktiv“ deklarierten Datensatzes heraus filtert. Wir nutzten alle in der DrugBank Datenbank hinterlegten, zugelassenen Wirkstoffe als inaktiven Datensatz. Dieser Datensatz diente als Hintergrundverteilung und sollte gewährleisten, dass die Datensätze an aktiven Substrukturen ausschließlich Substrukturen beinhalten, die besonders repräsentativ für den chemischen Raum des jeweiligen Targets sind. Dieser Ansatz lieferte 173 Substrukturen, die charakteristisch für sEH-Inhibitoren, bzw. 150 Substrukturen charakteristisch für 5-LO-Inhibitoren sind. Des Weiteren wurden 312 Substrukturen identifiziert, welche den gesamten chemischen, wirkstoffartigen Raum repräsentieren sollen.

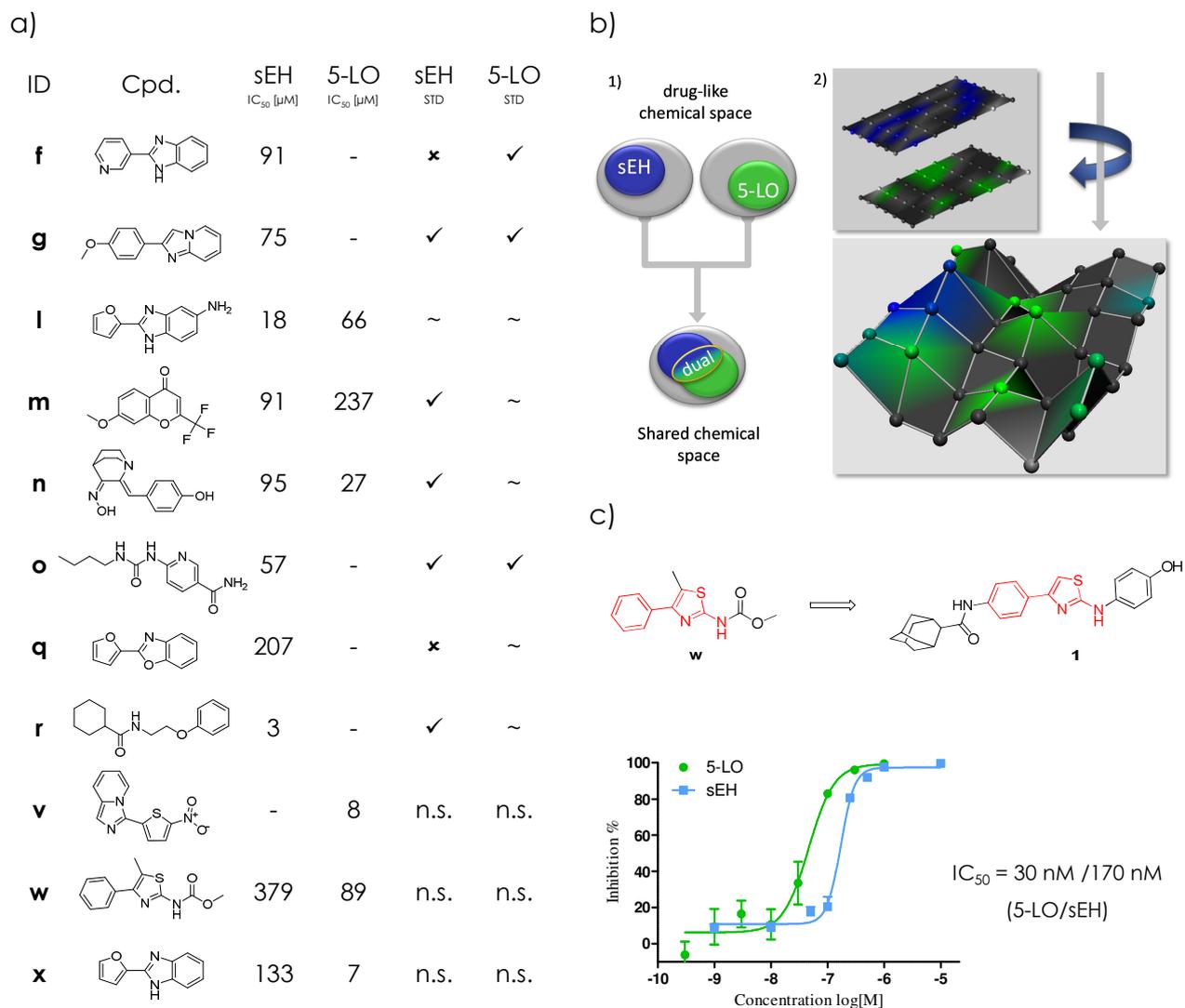
Anschließend wurden für beide Targets je eine individuelle SOM, basierend auf den Substrukturen der spezifischen, aktiven Liganden des jeweiligen Targets und den generellen Substrukturen der DrugBank, trainiert. Diese beiden SOMs stellen somit den chemischen Raum der aktiven Substrukturen eines Targets innerhalb des gesamten chemischen Raumes dar. Der MultiSOM Ansatz wurde entwickelt, um chemische Räume, die in Form einer SOM repräsentiert sind, vergleichen zu können und mögliche Gemeinsamkeiten zu identifizieren. Mit Hilfe dieses Ansatzes können zwei SOMs räumlich überlagert und dabei alle ihre Neuronen miteinander verglichen werden. Bei diesem Vergleich wird die Ähnlichkeit, z.B. die Euklidische Distanz oder der Tanimoto Ähnlichkeitskoeffizient zwischen zwei Neuronen an einer bestimmten Position der Karte berechnet. Dies geschieht für sämtliche Neuronen beider SOMs und die gemittelte Ähnlichkeit aller Neuronen beschreibt die Güte der Überlagerung. Die im Rahmen dieser Arbeit implementierte SOM verfügt über eine toroidale Topologie und besitzt somit keinen definierten Rand. Diese Eigenschaft ermöglicht es, die beiden zu vergleichenden SOMs zeilen- und reihenweise räumlich überlagert zu verschieben und somit die bestmögliche Überlagerung in Bezug auf die gemittelte Ähnlichkeit aller Neuronen zu ermitteln. Wurde die optimale Überlagerung gefunden, wird eine dritte SOM erzeugt und die Daten der beiden ursprünglichen und nun optimal überlagerten Karten auf diese MultiSOM übertragen. Zusätzlich wird dieser SOM eine dritte Dimension hinzugefügt, welche die Ähnlichkeit der verglichenen, ursprünglichen Neuronen beschreibt. Dadurch entsteht eine Art Landschaft, bei der höher liegende Neuronen beim ursprünglichen Vergleich eine hohe Ähnlichkeit besaßen und niedrig liegende Neuronen eine

entsprechend geringe Ähnlichkeit repräsentieren. Die Neuronen wurden entsprechend der Art der auf ihnen liegenden Substrukturen (aktiv / inaktiv) eingefärbt. Als Ergebnis erhält man eine Karte, auf der hochliegende Neuronen, welche als „aktiv“ eingefärbt wurden, potentielle duale Substrukturen beinhalten (Abb. 16b-2). Diese dualen Substrukturen kamen also entweder bereits in beiden aktiven Datensätzen vor oder waren sich sehr ähnlich, so dass sie auf einem gemeinsamen Neuron der MultiSOM zusammengelegt wurden.

Aus der MultiSOM, basierend auf den sEH- und 5-LO-Substrukturen, konnten wir auf diese Art und Weise insgesamt 229 potentiell „dual relevante“ Substrukturen identifizieren. Diese Substrukturen wurden daraufhin verwendet um mit Hilfe der MultiSOM ähnliche, käuflich erwerbliche Verbindungen in der Specs Datenbank zu suchen. Diese Datenbank wurde zunächst nach fragment-artigen Verbindungen vorgefiltert und beinhaltete danach 8417 Fragmente. Die Suche ergab 274 Fragmente, wovon 24 nach visueller Inspektion für die in vitro Testungen bestellt wurden.

Die Aktivität dieser 24 Fragmente sollte folglich auf zwei verschiedenen Targets validiert werden. Aus diesem Grund wurden zwei komplementäre in vitro Assay Ansätze verwendet. Zum einen wurden sämtliche Fragmente in STD-NMR Experimenten hinsichtlich ihrer Bindung und zum anderen mit Hilfe von funktionalen, biochemischen Assays hinsichtlich ihrer Inhibition untersucht. Für 11 der 24 Fragmente sollten anschließend  $IC_{50}$  Werte ermittelt werden, da sie sowohl im STD-NMR eine potentiell duale Bindung als auch im funktionalen Assay bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M mindestens 25 % Inhibition zeigten (Abb. 16a). Alle 11 Fragmente inhibieren mindestens eines der beiden Targets in niedrig mikromolaren Konzentrationen. Zusätzlich konnten 5 Fragmente (**f**, **m**, **n**, **w**, und **x**) identifiziert werden, die sowohl die sEH als auch die 5-LO inhibieren, wobei besonders Fragment **n** beide Targets in niedrig mikromolaren Konzentrationen inhibieren konnte. Diese Fragmente stellen nur Startpunkte für die Entwicklung neuer dualer sEH/5-LO-Inhibitoren dar und bedürfen weiterer Optimierungen. Um dieses Optimierungspotential zu überprüfen wurde eine Instituts-interne Moleküldatenbank nach Verbindungen durchsucht, welche die gefundenen Fragmente beinhalten. Als Ergebnis dieser Suche konnte Verbindung **1**, ein Derivat des Fragments **w** identifiziert werden (Abb. 16c). Verbindung **1** zeigte in beiden funktionalen Assays eine submikromolare Inhibition mit  $IC_{50}$  Werten von 0,17

$\mu\text{M}$  für die sEH und  $0,03 \mu\text{M}$  für die 5-LO (Abb. 16d). Sie stellt somit einen attraktiven Startpunkt als potentielle Leitstruktur dualer sEH/5-LO-Liganden dar.



**Abb. 16:** a) Übersicht der gemessenen  $IC_{50}$  Werte und Bindungsaktivitäten im STD-NMR. b) Schematische Darstellung des chemischen Raums der sEH- und 5-LO-Liganden, ihrer Überlagerung und Repräsentation dieses Prinzips per MultiSOM. c) Substruktursuche basierend auf Verbindung **w** und  $IC_{50}$  der Verbindung **1**.

## Farnesoid X Rezeptor Agonisten

Hintergrund:

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR) ist ein Liganden aktivierter Transkriptionsfaktor, der maßgeblich an der Regulation der Gallensäure-, Lipid- und Glukose-Homöostase beteiligt ist.<sup>174</sup> Der zugrundeliegende Mechanismus beruht unter anderem auf der FXR-vermittelten Hochregulation des small heterodimer partner (SHP) Transkriptionsfaktors, der wiederum die Expression einer Vielzahl von Genen reguliert, die mit der Glukoneogenese und dem Lipid Metabolismus in Verbindung stehen. Aus diesem Grund wird FXR als potentielles Target zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ II, der nichtalkoholischen Fettleberhepatitis oder des metabolischen Syndroms betrachtet.<sup>173</sup> Trotz des großen Interesses der Pharmaindustrie an diesem Target, konnte bisher, meist auf Grund von toxikologischen oder pharmakokinetischen Eigenschaften, kein Wirkstoff die Marktreife erreichen.<sup>190</sup>

In den im Folgenden beschriebenen Studien wurden zwei unterschiedliche Strategien zur Identifizierung neuer FXR-Modulatoren verfolgt. In einem Drug Repurposing Ansatz konnten mit Hilfe von selbstorganisierenden Karten (SOMs) bekannte, bereits zugelassene Wirkstoffe als neue FXR-Modulatoren identifiziert werden. In der zweiten Studie wurde eine Kombination aus Liganden- und Struktur-basiertem virtuellen Screening verwendet, um die Liganden-induzierte konformationelle Rezeptor-Flexibilität des FXR zu modellieren und somit neue FXR-Modulatoren zu finden.

### **Paper III: Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity.**

Der „selective optimization of side activities“ (SOSA) Ansatz basiert auf der Annahme, dass bereits zugelassene Wirkstoffe einen Startpunkt für gänzlich neue Indikationen darstellen können. Voraussetzung für diesen Ansatz ist, dass ein Wirkstoff ein Nebenwirkungsprofil aufweist, das für eine andere Indikationen eine mögliche Therapieform darstellt. Hat man solch einen Wirkstoff gefunden, kann man diese Nebeneffekte durch gezielte Optimierungen zum Haupteffekt umwandeln. Der größte Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der ursprüngliche Wirkstoff oftmals bereits intensiv hinsichtlich pharmakokinetischer oder toxikologischer Eigenschaften

untersucht wurde und somit im Idealfall unter geringen Risiken und Kosten zu einem neuen Wirkstoff weiterentwickelt werden kann.

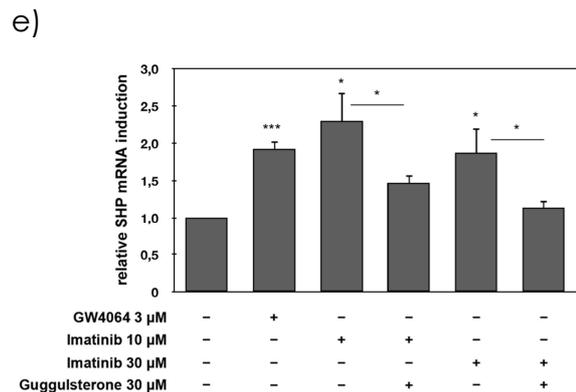
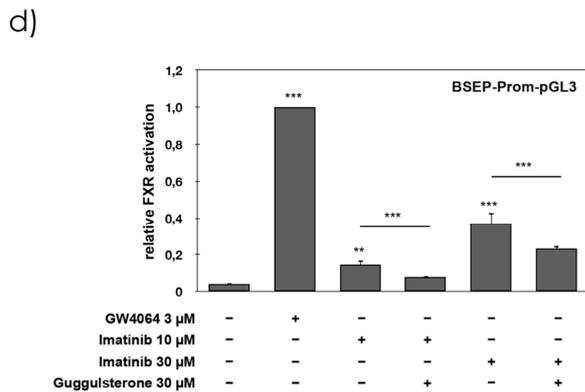
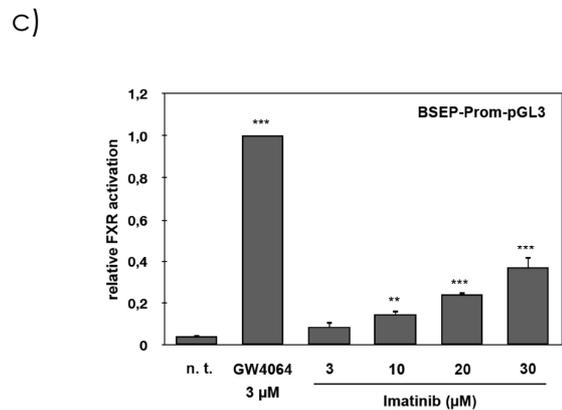
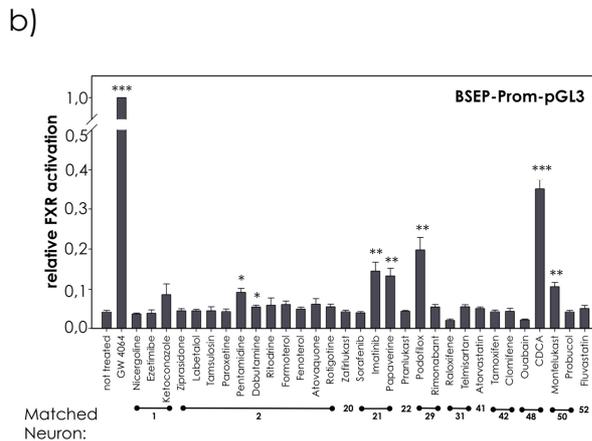
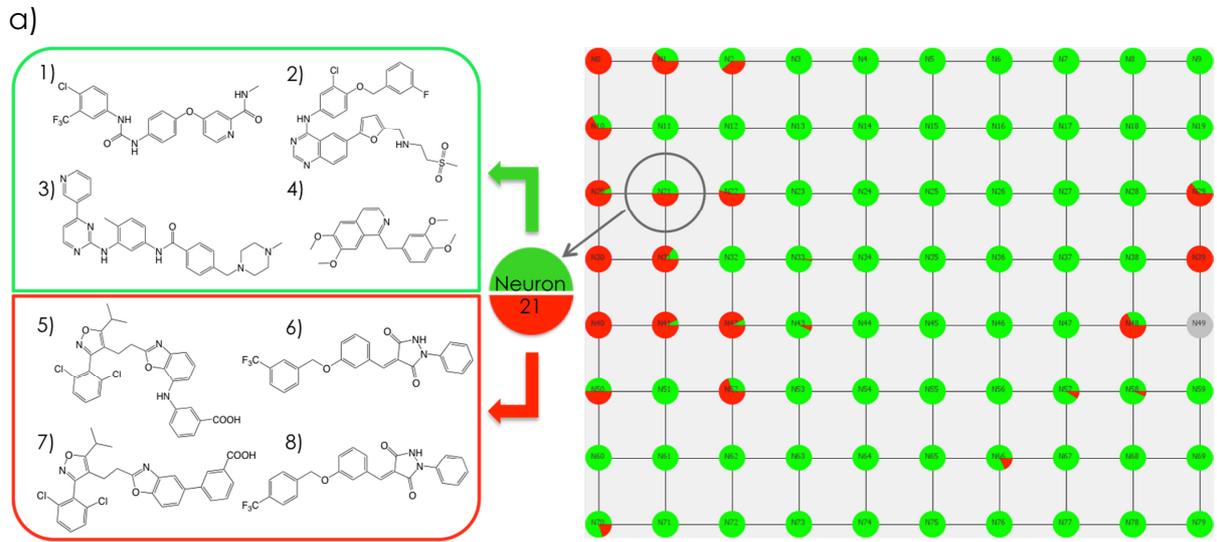
In der folgenden Studie sollten potentielle SOSA Startpunkte für neue FXR-Modulatoren aus einer Datenbank von bereits bekannten Wirkstoffen identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst 297 bekannte FXR-Agonisten mit einem  $EC_{50}$  von mindestens 1  $\mu\text{M}$  aus der ChEMBL Datenbank und 1280 zugelassene Wirkstoffe aus der DrugBank Datenbank extrahiert. Dieser Datensatz aus insgesamt 1577 Verbindungen wurde anschließend für das Training einer selbstorganisierenden Karte verwendet. Im darauffolgenden Schritt wurden sämtliche DrugBank Verbindungen herausgefiltert, die auf der trainierten SOM auf einem gemeinsamen Neuron mit FXR-Agonisten lokalisiert waren (Abb. 17a). Es mussten sich jedoch mindestens genauso viele bekannte FXR-Agonisten wie DrugBank Verbindungen auf diesem Neuron befinden. Solche Neuronen werden auch als Aktivitätsinseln bezeichnet, da sie eine Anhäufung von aktiven Verbindungen darstellen und somit einen Teil des chemischen Raumes dieses Targets repräsentieren.

Aus diesen gefilterten, zugelassenen Wirkstoffen wurden 31 Verbindungen auf Grund beschriebener Nebeneffekte, kommerzieller Verfügbarkeit und chemischer Diversität für weitere Untersuchungen ausgewählt. Diese Verbindungen wurden in einem FXR-Transaktivierungsassay untersucht, wobei ihre relative FXR-Aktivierung bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Referenzverbindung GW4064 in einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  verglichen wurde. Es konnte eine signifikante, relative FXR-Aktivierung für Pentamidin, Dobutamin, Imatinib, Papaverin, Podofilox, CDCA und Montelukast nachgewiesen werden (Abb. 17b). CDCA ist in den USA zur Behandlung von Gallensteinen zugelassen und ist bereits seit den neunziger Jahren als natürlicher FXR-Ligand bekannt. Der beobachtete Effekt von Podofilox konnte nicht eindeutig auf eine FXR-Aktivierung zurückgeführt werden, da sich im Transaktivierungsassay eine hohe Renilla-Luciferase Expression zeigte, welche zur Normalisierung der Assaydaten verwendet wurde. Die vielversprechendste Verbindung aus dem durchgeführten Screening, Imatinib, wurde anschließend genauer charakterisiert (Abb. 17c-d), während für die übrigen Verbindungen ausschließlich eine Literaturrecherche durchgeführt wurde. Hier wurde im Speziellen nach Hinweisen auf bereits beschriebene Effekte gesucht, die mit einer FXR-Aktivierung in Verbindung stehen könnten.

Papaverin ist ein unspezifischer Phosphodiesterase (PDE) Hemmer, der zur Behandlung von Erektionsstörungen oder als Spasmolytikum eingesetzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Papaverin und andere PDE Hemmer zu einer erhöhten Glukoneogenese und Glycogenolyse in Ratten Hepatocyten führte, was möglicherweise durch eine FXR-Aktivierung versucht werden könnte. Montelukast ist ein Leukotrienrezeptor CysLT1 Antagonist und zur Behandlung von Asthma bronchiale zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass Montelukast antiatherogene Effekte durch Reduktion des monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) Expressionslevel in Kaninchen zeigt, die unter einer atherogenen Diät standen. Eine MCP-1 spielt eine große Rolle in der Entstehung von Übergewicht, Diabetes und kardiovaskulären Erkrankungen. Des Weiteren führte es zu einer Verbesserung von Leberfibrose in cholestatischen Ratten. Diese Effekte könnten in direktem Zusammenhang mit einer FXR-Aktivierung durch Montelukast stehen.

Imatinib ist ein Tyrosinkinase Inhibitor, der zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) zugelassen ist. Eine Studie aus dem Jahr 2005 belegt, dass CML Patienten, die zusätzlich auch unter Typ 2 Diabetes litten, bei Behandlung mit Imatinib einen verringerten Blutzuckerspiegel aufwiesen. Im Zuge der Behandlung konnte die Insulin Dosis stetig verringert werden bis keinerlei Behandlung der Diabetes mehr nötig war. In adipösen Ratten konnte gezeigt werden, dass Imatinib zu einer erhöhten Insulin Sensitivität führt. In db/db Mäusen führte Imatinib zu einem Rückgang der Diabetes und in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer Minderung der Diabetes-assoziierten Atherosklerose. Eine erhöhte Insulin Sensitivität wurde ebenfalls in CML Patienten festgestellt, die mit Imatinib behandelt wurden, jedoch nicht an Diabetes erkrankt waren. Generell werden Tyrosinkinase Inhibitoren als mögliche Therapieform zur Behandlung von Diabetes diskutiert, obwohl der zugrundeliegende Mechanismus bis heute nicht geklärt ist. Der Plasmaspiegel von Imatinib in CML Patienten liegt bei ca. 4000 ng/ml. Dies entspricht annähernd der Konzentration von 10 µM, in der Imatinib im Transaktivierungsassay eine signifikante FXR-Aktivierung und eine mit GW4064 vergleichbare SHP mRNA Induktion in HepG2 Zellen zeigte (Abb. 17e). Des Weiteren konnten die durch Imatinib vermittelten Effekte in unseren Assay-Systemen durch die Zugabe von Guggulsterone, einem bekannten FXR-Antagonisten, reduziert werden. Dies ist somit ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei Imatinib um einen FXR-Agonisten handeln könnte. Imatinib stellt somit, trotz der

vergleichsweise geringen FXR-Aktivierung, einen vielversprechenden Startpunkt zur Leitstrukturoptimierung für neue FXR-Modulatoren dar.



**Abb. 17:** a) Trainiert SOM der FXR und DrugBank Moleküle und Belegung des Neurons 21. b) Relative FXR-Aktivierung aller bestellten Verbindungen im Vergleich zu GW4064. c) Konzentrationsabhängige relative FXR-Aktivierung durch Imatinib. d) Relative FXR-Aktivierung durch Imatinib und Reduktion der Aktivierung bei gleichzeitiger Zugabe von Guggulsterone. e) Relative SHP mRNA Induktion durch Imatinib und Reduktion des Effekts durch Zugabe von Guggulsterone.

#### **Paper IV: Identification of novel farnesoid X receptor modulators using a combined ligand- and structure-based virtual screening.**

Bis heute stellt INT-747 (6-ECDCA) den einzigen FXR-Agonisten dar, der sich in der klinischen Phase III zur Behandlung von primär biliärer Zirrhose befindet. Die Entwicklung zahlreicher FXR-Agonisten ist auf Grund toxikologischer oder unzureichender pharmakokinetischer Eigenschaften eingestellt worden. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass ein Vollagonismus, ähnlich wie bei einigen anderen Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren, zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. Im Falle des Estrogenrezeptors und dem Peroxisom Proliferator-aktivierten Rezeptors  $\gamma$  führte dieser Effekt dazu, dass selektive Modulatoren, bzw. Partial-Agonisten das bisherige Konzept der Vollagonisten ablösen. Das Ziel der im Folgenden dargestellten Studie ist, diesem Prinzip folgend, die Entwicklung neuer FXR-Partialagonisten.

Die Bindung eines Liganden an die FXR-Liganden-Bindedomäne führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und dadurch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors. Die Struktur und der Bindemodus des bindenden Liganden hat dabei eine direkte Auswirkung auf die Konformationsänderung des Rezeptors und darüber indirekt auch auf die Art und Anzahl der FXR-regulierten Gene. Der genaue Zusammenhang ist bisher jedoch noch nicht aufgeklärt. Auf Grund der Vielzahl an publizierten Kristallstrukturen von FXR mit gebundenen Agonisten wurde eine Strategie gewählt, welche eine Kombination aus Liganden- und Struktur-basierten Konsensus-Pharmakophormodellen mit anschließender Docking Analyse verbindet.

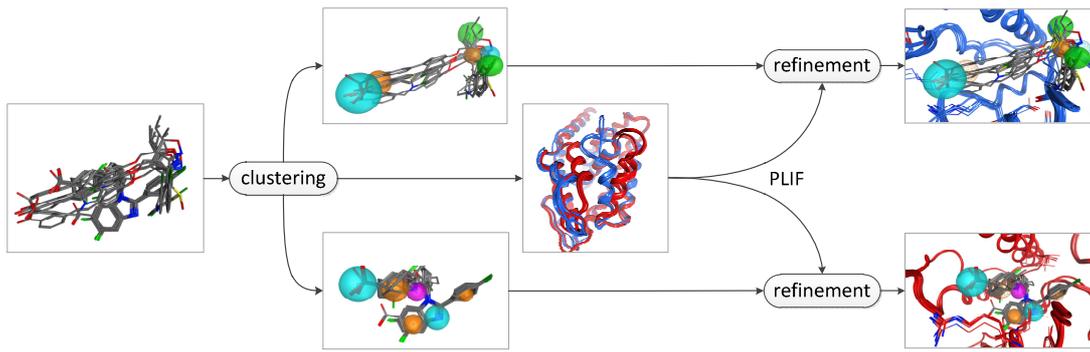
Der Screening Workflow besteht aus zwei aufeinander aufbauenden Schritten (Abb. 18a). Zunächst wurden die verfügbaren Kristallstrukturen anhand ihrer kokristallisierten Liganden geclustert und anschließend überlagert. Daraus entstanden zwei konformationell distinkte Cluster deren jeweilige Liganden verwendet wurden um ein Liganden-basiertes Konsensus-Pharmakophormodell zu konstruieren (Abb. 18b). Mit den resultierenden Pharmakophor-Modellen wurde anschließend die Asinex Datenbank (Version 2011) nach FXR-Agonisten durchsucht. Das Modell des ersten Cluster ergab dabei 2658, das zweite Modell 14022 Verbindungen. Im nächsten Schritt wurde anhand der geclusterten Kristallstrukturen jeweils ein Struktur-basiertes Konsensus-Pharmakophormodell konstruiert. Diese Modelle wurden mit den Liganden-basierten Modellen überlagert und kombiniert, wobei Pharmakophorpunkte, die in beiden Modellen identifiziert wurden als

erforderlich und alle übrigen Pharmakophorpunkte als optional deklariert wurden. Diese Kombinations-Pharmakophormodelle wurden für jeden Cluster erstellt und als Platzierungs-Methode in der anschließenden Docking Analyse der übrigen Verbindungen verwendet. Die Top 200 Verbindungen der beiden Docking-Läufe wurden analysiert und insgesamt 27 Verbindungen für die folgende in vitro Untersuchungen ausgewählt. Diese Verbindungen wurden zunächst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  in einem Transaktivierungsassay getestet. Vier der 27 Verbindungen zeigten dabei eine signifikante relative FXR-Aktivierung zwischen 10 % und 20 % im Vergleich zur Referenz-Verbindung GW4064. (Abb. 18c) Anschließend suchten wir nach Derivaten dieser Verbindung in der Asinex Datenbank um eine erste Struktur-Aktivitäts-Beziehung bestimmen zu können. Für Verbindung **2a** wurden 4 und für Verbindung **4a** weitere 11 Derivate gefunden. Die Derivate der Verbindung **2a** (Anthranilsäure Derivate) waren inaktiv beziehungsweise schwächer aktiv als der ursprüngliche Hit. Die Derivate von Verbindung **4a** waren bis auf Verbindung **4e**, **4f** und **4l** vergleichbar aktiv wie der ursprüngliche Hit. Sowohl **4e** als auch **4f** besitzen an der R<sub>3</sub> Position keinen Thiophenring. Dieser wurde durch ein 1,2-Dihydro-2-Oxo-Quinolin, bzw. einen Phenolring substituiert und deutet daraufhin, dass polare Gruppen an der R<sub>3</sub> Position nicht toleriert werden. Die restlichen Verbindungen, die eine relative Aktivierung von 10% oder mehr zeigten, wurden in verschiedenen Konzentrationen getestet um potentiell schwach bindende Verbindungen von partiellen Agonisten zu unterscheiden. Verbindung **4b** zeigte dabei eine maximale relative FXR-Aktivierung von 14 % mit einem EC<sub>50</sub> von 480 nM. (Abb. 17d)

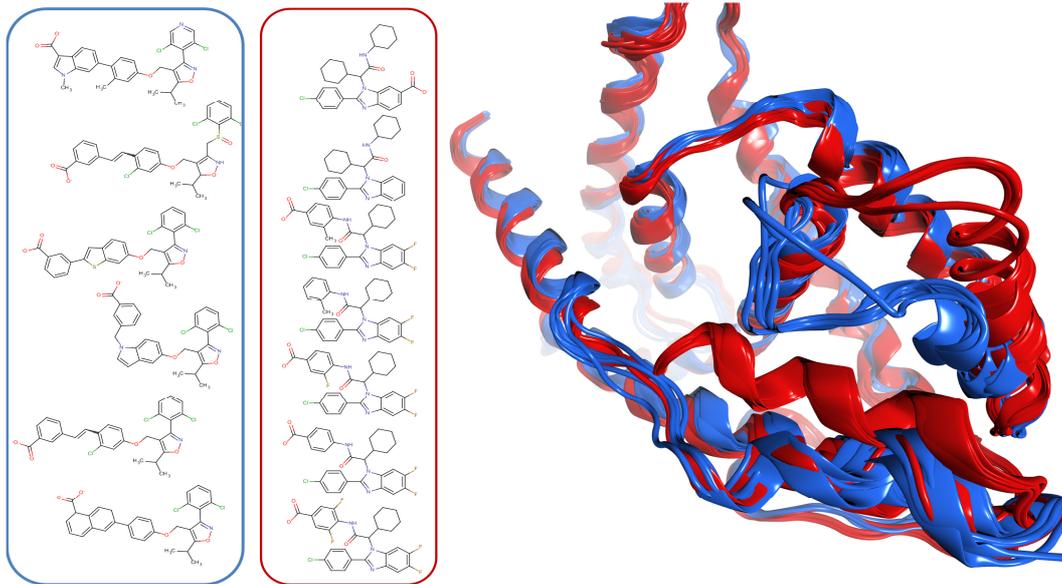
Die Kombination aus Liganden- und Struktur-basierten Pharmakophormodellen mit anschließender Docking Analyse führte zu 42 getesteten Verbindungen, von denen 12 FXR signifikant aktivieren konnten und darunter eine Verbindung (**4b**) als Partial-Agonist identifiziert wurde. Weitere Derivate dieser Verbindung werden zum aktuellen Zeitpunkt im Arbeitskreis Schubert-Zsilavec synthetisiert und charakterisiert.

Ergebnisse und Diskussion:  
Farnesoid X Rezeptor Agonisten

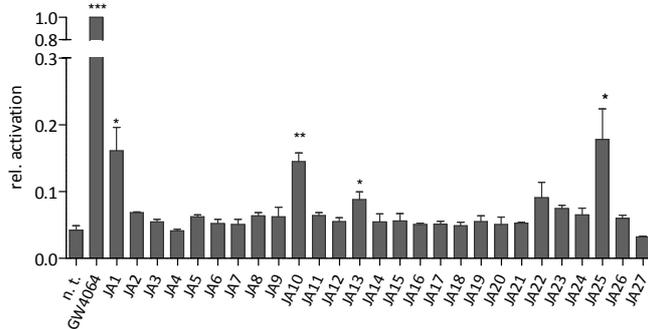
a)



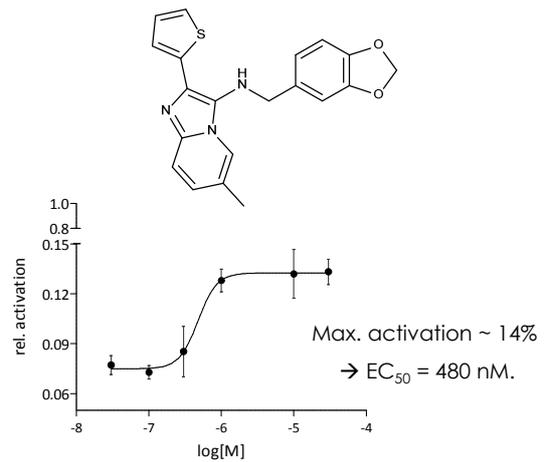
b)



c)



d)



**Abb. 18:** a) Schematische Darstellung der Liganden- und Strukturabhängigen Konstruktion der Pharmakophormodelle. b) Übersicht der aktiven Verbindungen der beiden Molekül Cluster und ihre jeweiligen induzierter FXR-Konformationen. c) Relative FXR-Aktivierung der gescreentten Verbindungen im Verhältnis zu GW4064. d) EC<sub>50</sub> Wert der Verbindung **4b**.

## Zusammenfassung

Polypharmakologie hat in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung in der pharmazeutischen Forschung gewonnen und könnte in Zukunft zu einem Umdenken in der Entwicklung neuer Wirkstoffe führen. Das wachsende Verständnis für biologische Zusammenhänge, im speziellen für die starke Vernetzung zwischen verschiedenen Signalwegen oder Gewebearten, und die daran beteiligten Proteine, könnten zu gänzlich neuen Strategien führen. Beispiele aus dem Bereich der Onkologie und der Entwicklung von Neuroleptika haben bereits gezeigt, dass eine Intervention an mehreren Stellen eines solchen komplexen Netzwerkes zu wirksameren und gleichzeitig sichereren Wirkstoffen führen kann. Erkenntnisse aus der Systembiologie und die retrospektive Analyse bereits zugelassener Wirkstoffe machen deutlich, dass viele erfolgreiche Wirkstoffe nur aufgrund ihres polypharmakologischen Wirkprofils so effektiv sind – wenngleich dies bei Ihrer Entwicklung oftmals nicht beabsichtigt war.

Das rationale Design sogenannter „multitarget Wirkstoffe“ stellt bis heute eine große Herausforderung dar. Aus Sicht eines medizinischen Chemikers bedeutet es die Verknüpfung zweier, auf unterschiedliche Targets aktiver, Liganden zu einem neuen Wirkstoff, ohne einen signifikanten Aktivitätsverlust auf die einzelnen Targets herbeizuführen. Ein naheliegender Ansatz zur Verbindung zweier Liganden ist die Verknüpfung der Moleküle über einen flexiblen Linker. Dieser Ansatz kann zwar *in vitro* zu sehr potenten Wirkstoffen führen, birgt jedoch pharmakokinetische Nachteile, bedingt durch das hohe Molekulargewicht, die sich oft *in vivo* zeigen. Die Schwierigkeit besteht also zum einen in der Aufrechterhaltung der individuellen Aktivität auf das jeweilige Target und zum anderen im Erreichen einer guten Balance zwischen Aktivität und Komplexität des Liganden. Damit soll ausreichend Raum für spätere Optimierung von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften gewährleistet werden.

Bisher wurden nur wenige Computer-gestützte Ansätze entwickelt um diese und ähnliche Fragestellungen zu bearbeiten. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer *in silico* Verfahren zur Identifizierung von multitarget Liganden ein Kernthema dieser Arbeit. Die Implementierung eines Fragment-basierten Ansatzes hält die Komplexität der Liganden möglichst gering und bietet genügend Raum für eine anschließende, multi-dimensionale Optimierung an zwei oder mehreren Targets.

In der ersten Studie wurde eine Pharmakophor-basierte Strategie verfolgt. Die Repräsentation eines Liganden durch ein Pharmakophormodell stellt eine abstrakte dreidimensionale Darstellung der für die biologische Aktivität relevanten Strukturmerkmale dar. Diese Abstraktion vereinfacht den Vergleich zweier Verbindungen und erlaubt gleichzeitig Spielraum für chemische Variabilität. Bei diesem Ansatz wurden Pharmakophormodelle, jeweils für eine Vielzahl aktiver Liganden zweier Targets, erzeugt und paarweise miteinander verglichen. Sobald zwei Pharmakophormodelle eine genügend große Anzahl an Pharmakophorpunkten in räumlich ähnlicher Orientierung teilen, stellt dieses gemeinsame Pharmakophor die Basis eines potentiellen multitarget Liganden dar. In der beschriebenen Studie wurde dieses Verfahren anhand von aktiven Liganden der löslichen Epoxid Hydrolase (sEH) und 5-Lipoxygenase (5-LO) evaluiert. Die auf dieser Grundlage identifizierten multitarget Pharmakophormodelle wurden zum anschließenden Screening einer Fragment-Datenbank verwendet und führten zu 9 aktiven Liganden für sEH und 5-LO. Diese Liganden besitzen chemische Grundgerüste (Scaffolds), die in der Literatur bisher noch nicht als aktive sEH- oder 5-LO-Liganden beschrieben wurden und somit eine ideale Grundlage für die Entwicklung neuer Wirkstoffe darstellen. Für eine der gefundenen Verbindungen, basierend auf einem Benzimidazol-Gerüst, wurden Aktivitäten im niedrig mikromolaren Bereich für beide Targets bestimmt. Diese Verbindung und weitere Derivate werden zu diesem Zeitpunkt weiter charakterisiert um eine erste Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufzustellen und die Eignung dieser Substanzklasse als potentielle Leitstruktur für neue, duale sEH/5-LO Liganden zu überprüfen.

Parallel dazu wurde eine Substruktur-basierte Strategie verfolgt um Rückschlüsse auf jene Strukturmerkmale zu ziehen, die für die Aktivität auf dem jeweiligen Target verantwortlich sein könnten. Dazu wurden in einem ersten Schritt alle aktiven Liganden zweier Targets auf ihre möglichst maximalen gemeinsamen Substrukturen reduziert. Für jedes Target wird damit ein Set von Substrukturen generiert, welches die für die Bindung an das jeweilige Target charakteristische Strukturmerkmale enthält. Diese Substrukturen, repräsentieren den chemischen Raum des jeweiligen Targets und stellen die Trainingsdaten für den entwickelten multiSOM Ansatz dar. Dieser Ansatz basiert auf dem automatisierten Vergleich von selbst-organisierenden Karten und hebt Gemeinsamkeiten zwischen diesen Substruktursets in einer leicht zu interpretierenden, visuellen Form hervor. Dies erlaubt die Identifizierung von

gemeinsamen Substrukturen aus beiden verwendeten Substruktursets, welche potentielle duale Strukturelemente darstellen.

Die Validierung dieses Ansatzes erfolgte erneut auf Basis bekannter 5-LO- und sEH-Liganden. Unter 24 ausgewählten Verbindungen konnten neun Fragmente identifiziert werden, die auf einem der beiden Targets und 5 Fragmente, die auf beiden Targets im niedrig mikromolaren Bereich inhibierend wirken. Einer dieser dualen Fragmente wurden anschließend als Basis für eine Substruktursuche in einer Inhouse Datenbank verwendet. Die daraus resultierende Verbindung, die einen Teil des ursprünglichen Fragments beinhaltet, wirkt sowohl auf sEH als auch 5-LO in nanomolaren Konzentrationen inhibierend. Auch diese Verbindung wird zu diesem Zeitpunkt weiter charakterisiert und stellt eine vielversprechende Basis als Leitstruktur neuer dualer sEH/5-LO-Liganden dar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorgestellten Methoden neue Möglichkeiten bieten, das rationale Design von multitarget Liganden zu unterstützen. Die Pharmakophor-basierte Methode kann besonders dann von Vorteil sein, wenn bereits Strukturinformationen für beide Targets bzw. die bioaktiven Konformationen der Liganden vorliegen. Für einen ausschließlichen Liganden-basierten Ansatz stellt die Verwendung der MultiSOM, und damit die Identifizierung gemeinsamer Strukturelemente der Liganden, die bessere Methode dar.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden Studien zur Identifizierung neuer Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) Partialagonisten beschrieben. Auch in diesem Fall wurden zwei unterschiedliche Strategien verfolgt. Da FXR eine starke strukturelle Anpassung abhängig vom gebundenen Liganden aufweist („induced fit“), sind rein strukturbasierte virtuelle Screening-Methoden nur eingeschränkt einsetzbar. Aus diesem Grund sollte zunächst ein Liganden-basierter Drug Repurposing Ansatz verfolgt werden, bei dem bereits zugelassene Wirkstoffe mit potentiell FXR-modulierenden Eigenschaften identifiziert werden sollten. Der Vorteil des Drug Repurposing besteht darin, dass die betrachteten Wirkstoffe bereits intensiv hinsichtlich Sicherheit und Bioverfügbarkeit untersucht wurden. Somit kann man sich bei der Entwicklung verstärkt auf die biologische Aktivität auf das neue Target konzentrieren.

Erneut wurden selbstorganisierende Karten (SOMs) verwendet, um zugelassene Wirkstoffe mit FXR-Aktivität zu identifizieren. Trainiert wurde die SOM auf einem

Datensatz bestehend aus bekannten FXR-Agonisten zum einen und der DrugBank Datenbank mit zugelassen Wirkstoffen zum anderen. Die Eigenschaft der SOM Verbindungen mit ähnlicher biologischer Aktivität in räumlicher Nähe auf der Karte zu clustern führte zu einer Anhäufung an bekannten FXR-Agonisten auf einigen wenigen Neuronen. Auf solchen sogenannten Aktivitätsinseln wurden zusätzlich auch zugelassene Wirkstoffe platziert, wenn ihre Ähnlichkeit zu den FXR-Agonisten ausreichend hoch war. Die auf den Aktivitätsinseln angesiedelten Wirkstoffe wurden anschließend bestellt und hinsichtlich ihrer FXR-Aktivität in einem Transaktivierungs-Assay untersucht. Unter den bestellten Verbindungen konnten sechs Liganden mit einer signifikanten relativen FXR-Aktivierung identifiziert werden. Weitere Hinweise auf eine mögliche FXR-Aktivierung der Verbindungen gaben in der Literatur beschriebene Nebeneffekte, die mit einer FXR-Aktivierung in Zusammenhang stehen könnten. Die potenteste Verbindung, der zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib, wurde zusätzlich in Bezug auf FXR-basierte SHP mRNA Induktion untersucht. In qPCR-Experimenten konnte dabei eine mit GW4064 vergleichbare Induktion in HepG2 Zellen gezeigt werden. Diese Ergebnisse untermauern die aus der Literatur gewonnene Vermutung, dass Imatinib FXR-modulierende Eigenschaften besitzt und somit eine interessante Grundlage für die Entwicklung neuer FXR-Partialagonisten darstellt. Zu diesem Zeitpunkt werden weitere Imatinib-Derivate synthetisiert und diese Struktur als mögliche Leitstruktur charakterisiert.

In einer zweiten Studie wurde eine Kombination aus Liganden- und Struktur-basierten Ansatz verfolgt. Dabei wurden sämtliche Struktur-Informationen aus publizierten FXR-Kristallstrukturen und den darin kokristallisierten Liganden gebündelt, um die Auswirkungen des zu Beginn erwähnten induced-fit Effekts zu minimieren. Auf Basis der ko-kristallisierten Liganden wurden zunächst zwei Konsensus-Pharmakophormodelle erstellt. Diese Modelle wurden in einem anschließenden Schritt jeweils mit einem Konsensus-Pharmakophormodell, das mit Hilfe von Protein-Ligand-Interaktions-Fingerprints (PLIF) aus den korrespondierenden Kristallstrukturen abgeleitet wurde, überlagert und kombiniert. Diese kombinierten Modelle vereinten sowohl Informationen der strukturellen Gemeinsamkeiten der Liganden als auch gemeinsame, relevante Interaktionspunkte zwischen Ligand und Rezeptor aus den Kristallstrukturen. Das Pharmakophor-Screening mit anschließender Docking Analyse führte zu 42 getesteten Verbindungen, von denen 12 Strukturen eine signifikante relative FXR-Aktivierung zeigten. Darunter konnte ein Partial-Agonist mit einem  $EC_{50}$

von 480 nM bei einer maximalen Aktivierung von ca. 14% im Vergleich zur Referenz GW4064 identifiziert werden. Auch diese Verbindung wird zum aktuellen Zeitpunkt weiter charakterisiert und könnte in Zukunft als Leitstruktur für neue FXR-Partialagonisten dienen.

In beiden Studien konnten neue FXR-Agonisten mit bisher noch nicht beschriebenen Scaffolds identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung bereits zugelassener Wirkstoffe für neue Indikationen eine attraktive Quelle für neue Leitstrukturen darstellen kann und im Zuge dessen bisher ungeklärte Nebeneffekte bekannter Wirkstoffe aufgeklärt werden können.

Abschließend lässt sich festhalten, dass selbstorganisierende Karten eine universelle Methode zur Erkennung und Analyse von polypharmakologischen Zusammenhängen darstellen. Des Weiteren lassen sich mit ihrer Hilfe chemische Räume repräsentieren und durch den in dieser Arbeit entwickelten MultiSOM-Ansatz direkt vergleichen. Dies ermöglicht auf intuitive und effiziente Weise die Identifizierung von überlappenden chemischen Räumen und somit möglicher polypharmakologischer Zusammenhänge.

## Referenzen

1. Rothman, R. B.; Baumann, M. H.; Savage, J. E.; Rauser, L.; McBride, A.; Hufeisen, S. J.; Roth, B. L. Evidence for Possible Involvement of 5-HT<sub>2B</sub> Receptors in the Cardiac Valvulopathy Associated With Fenfluramine and Other Serotonergic Medications. *Circulation* **2000**, *102*, 2836–2841.
2. Fitzgerald, L. W.; Burn, T. C.; Brown, B. S.; Patterson, J. P.; Corjay, M. H.; Valentine, P. A.; Sun, J. H.; Link, J. R.; Abbaszade, I.; Hollis, J. M.; et al. Possible Role of Valvular Serotonin 5-HT<sub>2B</sub> Receptors in the Cardiopathy Associated with Fenfluramine. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *57*, 75–81.
3. Redfern, W. S.; Carlsson, L.; Davis, A. S.; Lynch, W. G.; MacKenzie, I.; Palethorpe, S.; Siegl, P. K. S.; Strang, I.; Sullivan, A. T.; Wallis, R.; et al. Relationships between Preclinical Cardiac Electrophysiology, Clinical QT Interval Prolongation and Torsade de Pointes for a Broad Range of Drugs: Evidence for a Provisional Safety Margin in Drug Development. *Cardiovascular Research*, 2003, *58*, 32–45.
4. Hamon, J.; Whitebread, S.; Techer-Etienne, V.; Le Coq, H.; Azzaoui, K.; Urban, L. In Vitro Safety Pharmacology Profiling: What Else beyond hERG? *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 645–665.
5. Dipple, K. M.; McCabe, E. R. Modifier Genes Convert “Simple” Mendelian Disorders to Complex Traits. *Mol. Genet. Metab.* **2000**, *71*, 43–50.
6. Scriver, C. R.; Waters, P. J. Monogenic Traits Are Not Simple: Lessons from Phenylketonuria. *Trends in Genetics*, 1999, *15*, 267–272.
7. Ho, R. L.; Lieu, C. A. Systems Biology: An Evolving Approach in Drug Discovery and Development. *Drugs R. D.* **2008**, *9*, 203–216.
8. Kitano, H. A Robustness-Based Approach to Systems-Oriented Drug Design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 202–210.
9. Sams-Dodd, F. Target-Based Drug Discovery: Is Something Wrong? *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 139–147.
10. Vogt, I.; Mestres, J. Drug-Target Networks. *Mol. Inform.* **2010**, *29*, 10–14.
11. Jalencas, X.; Mestres, J. On the Origins of Drug Polypharmacology. *Medchemcomm* **2013**, *4*, 80.
12. Hopkins, A. L. Drug Discovery: Predicting Promiscuity. *Nature* **2009**, *462*, 167–168.
13. Hopkins, A. L.; Mason, J. S.; Overington, J. P. Can We Rationally Design Promiscuous Drugs? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 127–136.

14. Azzaoui, K.; Hamon, J.; Faller, B.; Whitebread, S.; Jacoby, E.; Bender, A.; Jenkins, J. L.; Urban, L. Modeling Promiscuity Based on in Vitro Safety Pharmacology Profiling Data. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 874–880.
15. Peters, J.-U.; Hert, J.; Bissantz, C.; Hillebrecht, A.; Gerebtzoff, G.; Bendels, S.; Tillier, F.; Migeon, J.; Fischer, H.; Guba, W.; et al. Can We Discover Pharmacological Promiscuity Early in the Drug Discovery Process? *Drug Discov. Today* **2012**, *17*, 325–335.
16. Peters, J.-U. Polypharmacology - Foe or Friend? *J. Med. Chem.* **2013**.
17. Hann, M. M.; Leach, A. R.; Harper, G. Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2001**, *41*, 856–864.
18. Congreve, M.; Chessari, G.; Tisi, D.; Woodhead, A. J. Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3661–3680.
19. Hajduk, P. J.; Greer, J. A Decade of Fragment-Based Drug Design: Strategic Advances and Lessons Learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 211–219.
20. Leach, A. R.; Hann, M. M. Molecular Complexity and Fragment-Based Drug Discovery: Ten Years on. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2011, *15*, 489–496.
21. Krejsa, C. M.; Horvath, D.; Rogalski, S. L.; Penzotti, J. E.; Mao, B.; Barbosa, F.; Migeon, J. C. Predicting ADME Properties and Side Effects: The BioPrint Approach. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2003**, *6*, 470–480.
22. Paolini, G. V.; Shapland, R. H. B.; van Hoorn, W. P.; Mason, J. S.; Hopkins, A. L. Global Mapping of Pharmacological Space. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 805–815.
23. Maggiora, G.; Vogt, M.; Stumpfe, D.; Bajorath, J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2013**.
24. Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, a P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B.; et al. ChEMBL: A Large-Scale Bioactivity Database for Drug Discovery. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D1100–7.
25. Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Shrivastava, S.; Hassanali, M.; Stothard, P.; Chang, Z.; Woolsey, J. DrugBank: A Comprehensive Resource for in Silico Drug Discovery and Exploration. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D668–72.
26. Knox, C.; Law, V.; Jewison, T.; Liu, P.; Ly, S.; Frolkis, A.; Pon, A.; Banco, K.; Mak, C.; Neveu, V.; et al. DrugBank 3.0: A Comprehensive Resource for “Omics” Research on Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D1035–41.

27. Olah, M.; Mracec, M.; Ostopovici, L.; Rad, R.; Bora, A.; Hadaruga, N.; Olah, I.; Banda, M.; Simon, Z.; Mracec, M.; et al. WOMBAT: World of Molecular Bioactivity. In *Chemoinformatics in Drug Discovery*; 2005; pp. 221–239.
28. Nidhi; Glick, M.; Davies, J. W.; Jenkins, J. L. Prediction of Biological Targets for Compounds Using Multiple-Category Bayesian Models Trained on Chemogenomics Databases. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 1124–1133.
29. Kohonen, T. Self-Organized Formation of Topologically Correct Feature Maps. *Biol. Cybern.* **1982**, *43*, 59–69.
30. Kohonen, T. Essentials of the Self-Organizing Map. *Neural Netw.* **2013**, *37*, 52–65.
31. Schneider, P.; Tanrikulu, Y.; Schneider, G. Self-Organizing Maps in Drug Discovery: Compound Library Design, Scaffold-Hopping, Repurposing. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 258–266.
32. Noeske, T.; Jirgensons, A.; Starchenkovs, I.; Renner, S.; Jaunzeme, I.; Trifanova, D.; Hechenberger, M.; Bauer, T.; Kauss, V.; Parsons, C. G.; et al. Virtual Screening for Selective Allosteric mGluR1 Antagonists and Structure-Activity Relationship Investigations for Coumarine Derivatives. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1763–1773.
33. Keiser, M. J.; Roth, B. L.; Armbruster, B. N.; Ernsberger, P.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. Relating Protein Pharmacology by Ligand Chemistry. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 197–206.
34. Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
35. Keiser, M. J.; Setola, V.; Irwin, J. J.; Laggner, C.; Abbas, A. I.; Hufeisen, S. J.; Jensen, N. H.; Kuijper, M. B.; Matos, R. C.; Tran, T. B.; et al. Predicting New Molecular Targets for Known Drugs. *Nature* **2009**, *462*, 175–181.
36. Milletti, F.; Vulpetti, A. Predicting Polypharmacology by Binding Site Similarity: From Kinases to the Protein Universe. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 1418–1431.
37. Jones, S.; Zhang, X.; Parsons, D. W.; Lin, J. C.-H.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Kamiyama, H.; Jimeno, A.; et al. Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science* **2008**, *321*, 1801–1806.
38. Parsons, D. W.; Jones, S.; Zhang, X.; Lin, J. C.-H.; Leary, R. J.; Angenendt, P.; Mankoo, P.; Carter, H.; Siu, I.-M.; Gallia, G. L.; et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* **2008**, *321*, 1807–1812.
39. McLendon, R.; Friedman, A.; Bigner, D.; Van Meir, E. G.; Brat, D. J.; M. Mastrogiannis, G.; Olson, J. J.; Mikkelsen, T.; Lehman, N.; Aldape, K.; et al. Comprehensive Genomic Characterization Defines Human Glioblastoma Genes and Core Pathways. *Nature*, 2008, *455*, 1061–1068.

40. Jones, D. Pathways to Cancer Therapy. *Nature reviews. Drug discovery*, 2008, 7, 875–876.
41. Capdeville, R.; Buchdunger, E.; Zimmermann, J.; Matter, A. Glivec (STI571, Imatinib), a Rationally Developed, Targeted Anticancer Drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 493–502.
42. Deininger, M.; Buchdunger, E.; Druker, B. J. The Development of Imatinib as a Therapeutic Agent for Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2005**, 105, 2640–2653.
43. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 172–183.
44. Weisberg, E.; Manley, P. W.; Cowan-Jacob, S. W.; Hochhaus, A.; Griffin, J. D. Second Generation Inhibitors of BCR-ABL for the Treatment of Imatinib-Resistant Chronic Myeloid Leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7, 345–356.
45. Pendergast, A. M.; Quilliam, L. A.; Cripe, L. D.; Bassing, C. H.; Dai, Z.; Li, N.; Batzer, A.; Rabun, K. M.; Der, C. J.; Schlessinger, J.; et al. BCR-ABL-Induced Oncogenesis Is Mediated by Direct Interaction with the SH2 Domain of the GRB-2 Adaptor Protein. *Cell* **1993**, 75, 175–185.
46. Duensing, A.; Medeiros, F.; McConarty, B.; Joseph, N. E.; Panigrahy, D.; Singer, S.; Fletcher, C. D. M.; Demetri, G. D.; Fletcher, J. A. Mechanisms of Oncogenic KIT Signal Transduction in Primary Gastrointestinal Stromal Tumors (GISTs). *Oncogene* **2004**, 23, 3999–4006.
47. Burger, H.; den Bakker, M. A.; Kros, J. M.; van Tol, H.; de Bruin, A. M.; Oosterhuis, W.; van den Ingh, H. F. G. M.; van der Harst, E.; de Schipper, H. P.; Wiemer, E. A. C.; et al. Activating Mutations in c-KIT and PDGFRalpha Are Exclusively Found in Gastrointestinal Stromal Tumors and Not in Other Tumors Overexpressing These Imatinib Mesylate Target Genes. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, 4, 1270–1274.
48. Lopes, L. F.; Bacchi, C. E. Imatinib Treatment for Gastrointestinal Stromal Tumour (GIST). *J. Cell. Mol. Med.* **2010**, 14, 42–50.
49. Pao, W.; Wang, T. Y.; Riely, G. J.; Miller, V. A.; Pan, Q.; Ladanyi, M.; Zakowski, M. F.; Heelan, R. T.; Kris, M. G.; Varmus, H. E. KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLoS Med.* **2005**, 2, 0057–0061.
50. Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib Is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med.* **2005**, 2, 0225–0235.
51. Antonescu, C. R.; Besmer, P.; Guo, T.; Arkun, K.; Hom, G.; Koryotowski, B.; Leversha, M. A.; Jeffrey, P. D.; Desantis, D.; Singer, S.; et al. Acquired Resistance to Imatinib in Gastrointestinal Stromal Tumor Occurs through Secondary Gene Mutation. *Clin. Cancer Res.* **2005**, 11, 4182–4190.

52. Mahadevan, D.; Cooke, L.; Riley, C.; Swart, R.; Simons, B.; Della Croce, K.; Wisner, L.; Iorio, M.; Shakalya, K.; Garewal, H.; et al. A Novel Tyrosine Kinase Switch Is a Mechanism of Imatinib Resistance in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Oncogene* **2007**, *26*, 3909–3919.
53. Quintás-Cardama, A.; Kantarjian, H. M.; Cortes, J. E. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Control* **2009**, *16*, 122–131.
54. Volpe, G.; Panuzzo, C.; Ulisciani, S.; Cilloni, D. Imatinib Resistance in CML. *Cancer Letters*, 2009, *274*, 1–9.
55. Bianco, R.; Shin, I.; Ritter, C. A.; Yakes, F. M.; Basso, A.; Rosen, N.; Tsurutani, J.; Dennis, P. A.; Mills, G. B.; Arteaga, C. L. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF Receptor-Expressing Tumor Cells Counteracts the Antitumor Action of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Oncogene* **2003**, *22*, 2812–2822.
56. Abounader, R. Interactions between PTEN and Receptor Tyrosine Kinase Pathways and Their Implications for Glioma Therapy. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2009**, *9*, 235–245.
57. Klebl, B. M.; Müller, G. Second-Generation Kinase Inhibitors. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, *9*, 975–993.
58. Chow, L. Q. M.; Eckhardt, S. G. Sunitinib: From Rational Design to Clinical Efficacy. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 884–896.
59. Rock, E. P.; Goodman, V.; Jiang, J. X.; Mahjoob, K.; Verbois, S. L.; Morse, D.; Dagher, R.; Justice, R.; Pazdur, R. Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Sunitinib Malate for the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumor and Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist* **2007**, *12*, 107–113.
60. Potapova, O.; Laird, A. D.; Nannini, M. A.; Barone, A.; Li, G.; Moss, K. G.; Cherrington, J. M.; Mendel, D. B. Contribution of Individual Targets to the Antitumor Efficacy of the Multitargeted Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor SU11248. *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 1280–1289.
61. Faivre, S.; Demetri, G.; Sargent, W.; Raymond, E. Molecular Basis for Sunitinib Efficacy and Future Clinical Development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 734–745.
62. Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R. A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. Discovery and Development of Sorafenib: A Multikinase Inhibitor for Treating Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 835–844.
63. Llovet, J. M.; Ricci, S.; Mazzaferro, V.; Hilgard, P.; Gane, E.; Blanc, J.-F.; de Oliveira, A. C.; Santoro, A.; Raoul, J.-L.; Forner, A.; et al. *Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma.*; 2008; Vol. 359, pp. 378–390.

64. Podar, K.; Tonon, G.; Sattler, M.; Tai, Y.-T.; Legouill, S.; Yasui, H.; Ishitsuka, K.; Kumar, S.; Kumar, R.; Pandite, L. N.; et al. The Small-Molecule VEGF Receptor Inhibitor Pazopanib (GW786034B) Targets Both Tumor and Endothelial Cells in Multiple Myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 19478–19483.
65. Hamberg, P.; Verweij, J.; Sleijfer, S. (Pre-)clinical Pharmacology and Activity of Pazopanib, a Novel Multikinase Angiogenesis Inhibitor. *Oncologist* **2010**, *15*, 539–547.
66. Sternberg, C. N.; Davis, I. D.; Mardiak, J.; Szczylik, C.; Lee, E.; Wagstaff, J.; Barrios, C. H.; Salman, P.; Gladkov, O. A.; Kavina, A.; et al. *Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial.*; 2010; Vol. 28, pp. 1061–1068.
67. Ban, T. A. Fifty Years Chlorpromazine: A Historical Perspective. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2007**, *3*, 495–500.
68. Wenthur, C. J.; Lindsley, C. W. Classics in Chemical Neuroscience: Clozapine. *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 1018–1025.
69. Gregori-Puigjané, E.; Mestres, J. A Ligand-Based Approach to Mining the Chemogenomic Space of Drugs. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11*, 669–676.
70. Roth, B. L.; Sheffler, D. J.; Kroeze, W. K. Magic Shotguns versus Magic Bullets: Selectively Non-Selective Drugs for Mood Disorders and Schizophrenia. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 353–359.
71. Urban, J. D.; Clarke, W. P.; von Zastrow, M.; Nichols, D. E.; Kobilka, B.; Weinstein, H.; Javitch, J. A.; Roth, B. L.; Christopoulos, A.; Sexton, P. M.; et al. Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *320*, 1–13.
72. Mailman, R. B.; Murthy, V. Third Generation Antipsychotic Drugs: Partial Agonism or Receptor Functional Selectivity? *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 488–501.
73. Burke, J. E.; Dennis, E. A. Phospholipase A2 Structure/function, Mechanism, and Signaling. *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, S237–S242.
74. Funk, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science* **2001**, *294*, 1871–1875.
75. Ricciotti, E.; FitzGerald, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 986–1000.
76. Bergström, S.; Carlson, L. A.; Weeks, J. R. The Prostaglandins: A Family of Biologically Active Lipids. *Pharmacol. Rev.* **1968**, *20*, 1–48.
77. Samuelsson, B. Leukotrienes: Mediators of Immediate Hypersensitivity Reactions and Inflammation. *Science* **1983**, *220*, 568–575.

78. Spokas, E. G.; Rokach, J.; Wong, P. Y. Leukotrienes, Lipoxins, and Hydroxyeicosatetraenoic Acids. *Methods Mol. Biol.* **1999**, *120*, 213–247.
79. McMahon, B.; Mitchell, S.; Brady, H. R.; Godson, C. Lipoxins: Revelations on Resolution. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 391–395.
80. Sarkis, A.; Lopez, B.; Roman, R. J. Role of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and Epoxyeicosatrienoic Acids in Hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2004**, *13*, 205–214.
81. Newman, J. W.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. Epoxide Hydrolases: Their Roles and Interactions with Lipid Metabolism. *Progress in Lipid Research*, 2005, *44*, 1–51.
82. Kuhn, H. Structural Basis for the Positional Specificity of Lipoxygenases. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 2000, *62*, 255–270.
83. Häfner,, A.-K.; Cernescu,, M.; Hofmann,, B.; Ermisch,, M.; Hörnig,, M.; Metzner,, J.; Schneider,, G.; Brutschy,, B.; Steinhilber,, D. Dimerization of Human 5-Lipoxygenase. *Biological Chemistry*, 2011, —.
84. Hammarberg, T.; Rådmark, O. 5-Lipoxygenase Binds Calcium. *Biochemistry* **1999**, *38*, 4441–4447.
85. Hörnig, C.; Albert, D.; Fischer, L.; Hörnig, M.; Rådmark, O.; Steinhilber, D.; Werz, O. 1-Oleoyl-2-Acetylglycerol Stimulates 5-Lipoxygenase Activity via a Putative (phospho)lipid Binding Site within the N-Terminal C2-like Domain. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26913–26921.
86. Michel, A. A. Y.; Steinhilber, D.; Werz, O. Development of a Method for Expression and Purification of the Regulatory C2-like Domain of Human 5-Lipoxygenase. *Protein Expr. Purif.* **2008**, *59*, 110–116.
87. Gilbert, N. C.; Bartlett, S. G.; Waight, M. T.; Neau, D. B.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R.; Newcomer, M. E. The Structure of Human 5-Lipoxygenase. *Science* **2011**, *331*, 217–219.
88. Rådmark, O. P. The Molecular Biology and Regulation of 5-Lipoxygenase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *161*, S11–S15.
89. Rådmark, O.; Samuelsson, B. 5-Lipoxygenase: Mechanisms of Regulation. *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, S40–5.
90. Flamand, N.; Luo, M.; Peters-Golden, M.; Brock, T. G. Phosphorylation of Serine 271 on 5-Lipoxygenase and Its Role in Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 306–313.
91. Boudreau, L. H.; Bertin, J.; Robichaud, P. P.; Laflamme, M.; Ouellette, R. J.; Flamand, N.; Surette, M. E. Novel 5-Lipoxygenase Isoforms Affect the Biosynthesis of 5-Lipoxygenase Products. *FASEB J.* **2011**, *25*, 1097–1105.

92. Gilbert, N. C.; Rui, Z.; Neau, D. B.; Waight, M. T.; Bartlett, S. G.; Boeglin, W. E.; Brash, A. R.; Newcomer, M. E. Conversion of Human 5-Lipoxygenase to a 15-Lipoxygenase by a Point Mutation to Mimic Phosphorylation at Serine-663. *FASEB J.* **2012**, *26*, 3222–3229.
93. Luo, M.; Jones, S. M.; Phare, S. M.; Coffey, M. J.; Peters-Golden, M.; Brock, T. G. Protein Kinase A Inhibits Leukotriene Synthesis by Phosphorylation of 5-Lipoxygenase on Serine 523. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 41512–41520.
94. Pande, A. H.; Moe, D.; Nemecek, K. N.; Qin, S.; Tan, S.; Tatulian, S. A. Modulation of Human 5-Lipoxygenase Activity by Membrane Lipids. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14653–14666.
95. Zhang, Y. Y.; Hammarberg, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B.; Ng, C. F.; Funk, C. D.; Loscalzo, J. Analysis of a Nucleotide-Binding Site of 5-Lipoxygenase by Affinity Labelling: Binding Characteristics and Amino Acid Sequences. *Biochem. J.* **2000**, *351 Pt 3*, 697–707.
96. Peters-Golden, M.; Brock, T. G. 5-Lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* **69**, 99–109.
97. Borgeat, P.; Hamberg, M.; Samuelsson, B. Transformation of Arachidonic Acid and Homo-Gamma-Linolenic Acid by Rabbit Polymorphonuclear Leukocytes. Monohydroxy Acids from Novel Lipoxygenases. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 7816–7820.
98. Rouzer, C. A.; Matsumoto, T.; Samuelsson, B. Single Protein from Human Leukocytes Possesses 5-Lipoxygenase and Leukotriene A4 Synthase Activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, *83*, 857–861.
99. Rådmark, O.; Shimizu, T.; Jörnvall, H.; Samuelsson, B. Leukotriene A4 Hydrolase in Human Leukocytes. Purification and Properties. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 12339–12345.
100. Lam, B. K.; Frank Austen, K. Leukotriene C4 Synthase: A Pivotal Enzyme in Cellular Biosynthesis of the Cysteinyl Leukotrienes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 511–520.
101. Haeggström, J. Z.; Funk, C. D. Lipoxygenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 5866–5898.
102. Peters-Golden, M.; Henderson, W. R. Leukotrienes. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *357*, 1841–1854.
103. Tager, A. M.; Luster, A. D. BLT1 and BLT2: The Leukotriene B4 Receptors. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003, *69*, 123–134.
104. Toda, A.; Yokomizo, T.; Shimizu, T. Leukotriene B4 Receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2002**, *68-69*, 575–585.

105. Evans, J. F. The Cysteinyl Leukotriene Receptors. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003, 69, 117–122.
106. Samuelsson, B.; Dahlén, S. E.; Lindgren, J. A.; Rouzer, C. A.; Serhan, C. N. Leukotrienes and Lipoxins: Structures, Biosynthesis, and Biological Effects. *Science* **1987**, 237, 1171–1176.
107. Ford-Hutchinson, A. W.; Bray, M. A.; Doig, M. V; Shipley, M. E.; Smith, M. J. Leukotriene B<sub>2</sub>, a Potent Chemokinetic and Aggregating Substance Released from Polymorphonuclear Leukocytes. *Nature* **1980**, 286, 264–265.
108. Hay, D. W. P.; Torphy, T. J.; Udem, B. J. Cysteinyl Leukotrienes in Asthma: Old Mediators up to New Tricks. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1995, 16, 304–309.
109. Lewis, R. A.; Austen, K. F.; Soberman, R. J. Leukotrienes and Other Products of the 5-Lipoxygenase Pathway. Biochemistry and Relation to Pathobiology in Human Diseases. *N. Engl. J. Med.* **1990**, 323, 645–655.
110. Werz, O.; Steinhilber, D. Therapeutic Options for 5-Lipoxygenase Inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2006**, 112, 701–718.
111. Pergola, C.; Werz, O. 5-Lipoxygenase Inhibitors: A Review of Recent Developments and Patents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, 20, 355–375.
112. Hawthorne, A. B.; Boughton-Smith, N. K.; Whittle, B. J.; Hawkey, C. J. Colorectal Leukotriene B<sub>4</sub> Synthesis in Vitro in Inflammatory Bowel Disease: Inhibition by the Selective 5-Lipoxygenase Inhibitor BWA4C. *Gut* **1992**, 33, 513–517.
113. Laursen, L. S.; Naesdal, J.; Bukhave, K.; Lauritsen, K.; Rask-Madsen, J. Selective 5-Lipoxygenase Inhibition in Ulcerative Colitis. *Lancet* **1990**, 335, 683–685.
114. Knapp, H. R. Reduced Allergen-Induced Nasal Congestion and Leukotriene Synthesis with an Orally Active 5-Lipoxygenase Inhibitor. *N. Engl. J. Med.* **1990**, 323, 1745–1748.
115. Weinblatt, M. E.; Kremer, J. M.; Coblyn, J. S.; Helfgott, S.; Maier, A. L.; Pettilo, G.; Henson, B.; Rubin, P.; Sperling, R. *Zileuton, a 5-Lipoxygenase Inhibitor in Rheumatoid Arthritis.*; 1992; Vol. 19, pp. 1537–1541.
116. Braeckman, R. A.; Granneman, G. R.; Locke, C. S.; Machinist, J. M.; Cavannaugh, J. H.; Awni, W. M. The Pharmacokinetics of Zileuton in Healthy Young and Elderly Volunteers. *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, 29 Suppl 2, 42–48.
117. Sorkness, C. A. The Use of 5-Lipoxygenase Inhibitors and Leukotriene Receptor Antagonists in the Treatment of Chronic Asthma. *Pharmacotherapy* **1997**, 17, 50S–54S.
118. Reid, J. J. ABT-761 (Abbott). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2001**, 2, 68–71.

119. Peskar, B. M.; Weiler, H.; Peskar, B. A. Effect of BW755C on Prostaglandin Synthesis in the Rat Stomach. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 1652–1653.
120. Kusner, E. J.; Buckner, C. K.; Dea, D. M.; DeHaas, C. J.; Marks, R. L.; Krell, R. D. The 5-Lipoxygenase Inhibitors ZD2138 and ZM230487 Are Potent and Selective Inhibitors of Several Antigen-Induced Guinea-Pig Pulmonary Responses. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *257*, 285–292.
121. Fischer, L.; Steinhilber, D.; Werz, O. Molecular Pharmacological Profile of the Nonredox-Type 5-Lipoxygenase Inhibitor CJ-13,610. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 861–868.
122. Rouzer, C. A.; Ford-Hutchinson, A. W.; Morton, H. E.; Gillard, J. W. MK886, a Potent and Specific Leukotriene Biosynthesis Inhibitor Blocks and Reverses the Membrane Association of 5-Lipoxygenase in Ionophore-Challenged Leukocytes. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1436–1442.
123. Gillard, J.; Ford-Hutchinson, A. W.; Chan, C.; Charleson, S.; Denis, D.; Foster, A.; Fortin, R.; Leger, S.; McFarlane, C. S.; Morton, H. L-663,536 (MK-886) (3-[1-(4-Chlorobenzyl)-3-T-Butyl-Thio-5-Isopropylindol-2-Yl]-2,2 - Dimethylpropanoic Acid), a Novel, Orally Active Leukotriene Biosynthesis Inhibitor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1989**, *67*, 456–464.
124. Hutchinson, J. H.; Li, Y.; Arruda, J. M.; Baccei, C.; Bain, G.; Chapman, C.; Correa, L.; Darlington, J.; King, C. D.; Lee, C.; et al. 5-Lipoxygenase-Activating Protein Inhibitors: Development of 3-[3-Tert-Butylsulfanyl-1-[4-(6-Methoxy-Pyridin-3-Yl)-Benzyl]-5-(pyridin-2-Ylmethoxy)-1H-Indol-2-Yl]-2,2-Dimethyl-Propionic Acid (AM103). *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5803–5815.
125. Campbell, W. B.; Gebremedhin, D.; Pratt, P. F.; Harder, D. R. Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ. Res.* **1996**, *78*, 415–423.
126. Fleming, I. DiscrEET Regulators of Homeostasis: Epoxyeicosatrienoic Acids, Cytochrome P450 Epoxygenases and Vascular Inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 448–452.
127. Gross, G. J.; Gauthier, K. M.; Moore, J.; Falck, J. R.; Hammock, B. D.; Campbell, W. B.; Nithipatikom, K. Effects of the Selective EET Antagonist, 14,15-EEZE, on Cardioprotection Produced by Exogenous or Endogenous EETs in the Canine Heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2008**, *294*, H2838–H2844.
128. Yu, Z.; Xu, F.; Huse, L. M.; Morisseau, C.; Draper, A. J.; Newman, J. W.; Parker, C.; Graham, L.; Engler, M. M.; Hammock, B. D.; et al. Soluble Epoxide Hydrolase Regulates Hydrolysis of Vasoactive Epoxyeicosatrienoic Acids. *Circ. Res.* **2000**, *87*, 992–998.
129. Morisseau, C.; Inceoglu, B.; Schmelzer, K.; Tsai, H.-J.; Jinks, S. L.; Hegedus, C. M.; Hammock, B. D. Naturally Occurring Monoepoxides of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Are Bioactive Antihyperalgesic Lipids. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 3481–3490.

130. Zeldin, D. C. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36059–36062.
131. Gomez, G. A.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. Human Soluble Epoxide Hydrolase: Structural Basis of Inhibition by 4-(3-Cyclohexylureido)-Carboxylic Acids. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 58–64.
132. Morisseau, C.; Schebb, N. H.; Dong, H.; Ulu, A.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Role of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Activity in the Metabolism of Lysophosphatidic Acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *419*, 796–800.
133. Cronin, A.; Homburg, S.; Dürk, H.; Richter, I.; Adamska, M.; Frère, F.; Arand, M. Insights into the Catalytic Mechanism of Human sEH Phosphatase by Site-Directed Mutagenesis and LC-MS/MS Analysis. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 627–640.
134. Spector, A. A. Arachidonic Acid Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway. *J. Lipid Res.* **2009**, *50 Suppl*, S52–6.
135. Node, K.; Huo, Y.; Ruan, X.; Yang, B.; Spiecker, M.; Ley, K.; Zeldin, D. C.; Liao, J. K. Anti-Inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science* **1999**, *285*, 1276–1279.
136. Schmelzer, K. R.; Kubala, L.; Newman, J. W.; Kim, I.-H.; Eiserich, J. P.; Hammock, B. D. Soluble Epoxide Hydrolase Is a Therapeutic Target for Acute Inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9772–9777.
137. Norwood, S.; Liao, J.; Hammock, B. D.; Yang, G.-Y. Epoxyeicosatrienoic Acids and Soluble Epoxide Hydrolase: Potential Therapeutic Targets for Inflammation and Its Induced Carcinogenesis. *Am. J. Transl. Res.* **2010**, *2*, 447–457.
138. Inceoglu, B.; Schmelzer, K. R.; Morisseau, C.; Jinks, S. L.; Hammock, B. D. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Reveals Novel Biological Functions of Epoxyeicosatrienoic Acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2007**, *82*, 42–49.
139. Christie, M. J. Cellular Neuroadaptations to Chronic Opioids: Tolerance, Withdrawal and Addiction. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *154*, 384–396.
140. Imig, J. D.; Zhao, X.; Capdevila, J. H.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Lowers Arterial Blood Pressure in Angiotensin II Hypertension. *Hypertension* **2002**, *39*, 690–694.
141. Imig, J. D.; Zhao, X.; Zaharis, C. Z.; Olearczyk, J. J.; Pollock, D. M.; Newman, J. W.; Kim, I.-H.; Watanabe, T.; Hammock, B. D. An Orally Active Epoxide Hydrolase Inhibitor Lowers Blood Pressure and Provides Renal Protection in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension* **2005**, *46*, 975–981.
142. Imig, J. D. Epoxides and Soluble Epoxide Hydrolase in Cardiovascular Physiology. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 101–130.

143. Jiang, H.; Quilley, J.; Doumad, A. B.; Zhu, A. G.; Falck, J. R.; Hammock, B. D.; Stier, C. T.; Carroll, M. A. Increases in Plasma Trans-EETs and Blood Pressure Reduction in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2011**, *300*, H1990–6.
144. EnayetAllah, A. E.; Luria, A.; Luo, B.; Tsai, H.-J.; Sura, P.; Hammock, B. D.; Grant, D. F. Opposite Regulation of Cholesterol Levels by the Phosphatase and Hydrolase Domains of Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36592–36598.
145. Oguro, A.; Imaoka, S. Lysophosphatidic Acids Are New Substrates for the Phosphatase Domain of Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 505–512.
146. Hou, H.-H.; Hammock, B. D.; Su, K.-H.; Morisseau, C.; Kou, Y. R.; Imaoka, S.; Oguro, A.; Shyue, S.-K.; Zhao, J.-F.; Lee, T.-S. N-Terminal Domain of Soluble Epoxide Hydrolase Negatively Regulates the VEGF-Mediated Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Cardiovasc. Res.* **2012**, *93*, 120–129.
147. Ingraham, R. H.; Gless, R. D.; Lo, H. Y. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors and Their Potential for Treatment of Multiple Pathologic Conditions. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 587–603.
148. Shen, H. C.; Hammock, B. D. Discovery of Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase: A Target with Multiple Potential Therapeutic Indications. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1789–1808.
149. Dorrance, A. M.; Rupp, N.; Pollock, D. M.; Newman, J. W.; Hammock, B. D.; Imig, J. D. An Epoxide Hydrolase Inhibitor, 12-(3-Adamantan-1-Yl-Ureido)dodecanoic Acid (AUDA), Reduces Ischemic Cerebral Infarct Size in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2005**, *46*, 842–848.
150. Kim, I.-H.; Tsai, H.-J.; Nishi, K.; Kasagami, T.; Morisseau, C.; Hammock, B. D. 1,3-Disubstituted Ureas Functionalized with Ether Groups Are Potent Inhibitors of the Soluble Epoxide Hydrolase with Improved Pharmacokinetic Properties. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5217–5226.
151. Moser, D.; Wisniewska, J. M.; Hahn, S.; Achenbach, J.; Buscató, E.; Klingler, F.; Hofmann, B.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Dual-Target Virtual Screening by Pharmacophore Elucidation and Molecular Shape Filtering. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 120123151858001.
152. Moser, D.; Achenbach, J.; Klingler, F.-M.; Estel la, B.; Hahn, S.; Proschak, E. Evaluation of Structure-Derived Pharmacophore of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors by Virtual Screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6762–6765.
153. Anandan, S. K.; Webb, H. K.; Do, Z. N.; Gless, R. D. Unsymmetrical Non-Adamantyl N,N'-Diaryl Urea and Amide Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4259–4263.

154. Lo, H. Y.; Man, C. C.; Fleck, R. W.; Farrow, N. A.; Ingraham, R. H.; Kukulka, A.; Proudfoot, J. R.; Betageri, R.; Kirrane, T.; Patel, U.; et al. Substituted Pyrazoles as Novel sEH Antagonist: Investigation of Key Binding Interactions within the Catalytic Domain. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6379–6383.
155. Shen, H. C.; Ding, F. X.; Deng, Q.; Xu, S.; Tong, X.; Zhang, X.; Chen, Y.; Zhou, G.; Pai, L. Y.; Alonso-Galicia, M.; et al. A Strategy of Employing Aminoheterocycles as Amide Mimics to Identify Novel, Potent and Bioavailable Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5716–5721.
156. Shen, H. C.; Ding, F. X.; Wang, S.; Xu, S.; Chen, H. shen; Tong, X.; Tong, V.; Mitra, K.; Kumar, S.; Zhang, X.; et al. Discovery of Spirocyclic Secondary Amine-Derived Tertiary Ureas as Highly Potent, Selective and Bioavailable Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3398–3404.
157. Asako, H.; Kubes, P.; Wallace, J.; Gagarella, T.; Wolf, R. E.; Granger, D. N. Indomethacin-Induced Leukocyte Adhesion in Mesenteric Venules: Role of Lipoxygenase Products. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, G903–8.
158. Knapp, H. R.; Sladek, K.; Fitzgerald, G. A. Increased Excretion of Leukotriene E4 during Aspirin-Induced Asthma. *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 48–51.
159. Schmelzer, K. R.; Inceoglu, B.; Kubala, L.; Kim, I.-H.; Jinks, S. L.; Eiserich, J. P.; Hammock, B. D. Enhancement of Antinociception by Coadministration of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13646–13651.
160. Jung, O.; Jansen, F.; Mieth, A.; Barbosa-Sicard, E.; Pliquet, R. U.; Babelova, A.; Morisseau, C.; Hwang, S.-H.; Tsai, C.; Hammock, B. D.; et al. Inhibition of the Soluble Epoxide Hydrolase Promotes Albuminuria in Mice with Progressive Renal Disease. *PLoS One* **2010**, *5*, e11979.
161. Liu, J.-Y.; Yang, J.; Inceoglu, B.; Qiu, H.; Ulu, A.; Hwang, S.-H.; Chiamvimonvat, N.; Hammock, B. D. Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Enhances the Anti-Inflammatory Effects of Aspirin and 5-Lipoxygenase Activation Protein Inhibitor in a Murine Model. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 880–887.
162. Inagaki, M.; Tsuru, T.; Jyoyama, H.; Ono, T.; Yamada, K.; Kobayashi, M.; Hori, Y.; Arimura, A.; Yasui, K.; Ohno, K.; et al. Novel Antiarthritic Agents with 1,2-Isothiazolidine-1,1-Dioxide (gamma-Sultam) Skeleton: Cytokine Suppressive Dual Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2040–2048.
163. Chowdhury, M. A.; Abdellatif, K. R. A.; Dong, Y.; Das, D.; Suresh, M. R.; Knaus, E. E. Synthesis of Celecoxib Analogues Possessing a N-Difluoromethyl-1,2-Dihydropyrid-2-One 5-Lipoxygenase Pharmacophore: Biological Evaluation as Dual Inhibitors of Cyclooxygenases and 5-Lipoxygenase with Anti-Inflammatory Activity. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1525–1529.

164. Maier, T. J.; Tausch, L.; Hoernig, M.; Coste, O.; Schmidt, R.; Angioni, C.; Metzner, J.; Groesch, S.; Pergola, C.; Steinhilber, D.; et al. Celecoxib Inhibits 5-Lipoxygenase. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *76*, 862–872.
165. Steinbrink, S. D.; Pergola, C.; Bühring, U.; George, S.; Metzner, J.; Fischer, A. S.; Häfner, A.-K.; Wisniewska, J. M.; Geisslinger, G.; Werz, O.; et al. Sulindac Sulfide Suppresses 5-Lipoxygenase at Clinically Relevant Concentrations. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 797–806.
166. Rotondo, S.; Dell'Elba, G.; Krauze-Brzósko, K.; Manarini, S.; Martelli, N.; Pecce, R.; Evangelista, V.; Cerletti, C. Licofelone, a Dual Lipoxygenase-Cyclooxygenase Inhibitor, Downregulates Polymorphonuclear Leukocyte and Platelet Function. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *453*, 131–139.
167. Hwang, S. H.; Wagner, K. M.; Morisseau, C.; Liu, J.-Y.; Dong, H.; Weckler, A. T.; Hammock, B. D. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Urea-Containing Pyrazoles as Dual Inhibitors of Cyclooxygenase-2 and Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3037–3050.
168. Meirer, K.; Rödl, C. B.; Wisniewska, J. M.; George, S.; Häfner, A.-K.; Buscató, E. la; Klingler, F.-M.; Hahn, S.; Berressem, D.; Wittmann, S. K.; et al. Synthesis and Structure Activity Relationship Studies of Novel Dual Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase and 5-Lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **2013**.
169. Wermuth, C. G. Selective Optimization of Side Activities: The SOSA Approach. *Drug Discovery Today*, 2006, *11*, 160–164.
170. Ghofrani, H. A.; Osterloh, I. H.; Grimminger, F. Sildenafil: From Angina to Erectile Dysfunction to Pulmonary Hypertension and Beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 689–702.
171. Reisberg, B.; Doody, R.; Stöffler, A.; Schmitt, F.; Ferris, S.; Möbius, H. J. *Memantine in Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease.*; 2003; Vol. 348, pp. 1333–1341.
172. Meyer, U.; Schuhmann, A.; Friedrich, C. [Chance and Calculated Development! The History of Oral Antidiabetics]. *Pharm. Unserer Zeit* **2002**, *31*, 242–250.
173. Fiorucci, S.; Mencarelli, a.; Distrutti, E.; Palladino, G.; Cipriani, S. Targeting Farnesoid-X-Receptor: From Medicinal Chemistry to Disease Treatment. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 139–159.
174. Lefebvre, P.; Cariou, B.; Lien, F. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. ...* **2009**, 147–191.
175. Pellicciari, R.; Costantino, G.; Fiorucci, S. Farnesoid X Receptor: From Structure to Potential Clinical Applications. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5383–5403.

176. Costantino, G.; Macchiarulo, A.; Entrena-Guadix, A.; Camaioni, E.; Pellicciari, R. Binding Mode of  $\delta$ ECDC, a Potent Bile Acid Agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1865–1868.
177. Huber, R. M.; Murphy, K.; Miao, B.; Link, J. R.; Cunningham, M. R.; Rugar, M. J.; Gunyuzlu, P. L.; Haws, T. F.; Kassam, A.; Powell, F.; et al. Generation of Multiple Farnesoid-X-Receptor Isoforms through the Use of Alternative Promoters. *Gene* **2002**, *290*, 35–43.
178. Schote, A. B.; Turner, J. D.; Schiltz, J.; Muller, C. P. Nuclear Receptors in Human Immune Cells: Expression and Correlations. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1436–1445.
179. Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. Identification of a Nuclear Receptor for Bile Acids. *Science* **1999**, *284*, 1362–1365.
180. Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Kliewer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; et al. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* **1999**, *284*, 1365–1368.
181. Wang, H.; Chen, J.; Hollister, K.; Sowers, L. C.; Forman, B. M. Endogenous Bile Acids Are Ligands for the Nuclear Receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* **1999**, *3*, 543–553.
182. Zollner, G.; Trauner, M. Nuclear Receptors as Therapeutic Targets in Cholestatic Liver Diseases. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *156*, 7–27.
183. Watanabe, M.; Horai, Y.; Houten, S. M.; Morimoto, K.; Sugizaki, T.; Arita, E.; Mataka, C.; Sato, H.; Tanigawara, Y.; Schoonjans, K.; et al. Lowering Bile Acid Pool Size with a Synthetic Farnesoid X Receptor (FXR) Agonist Induces Obesity and Diabetes through Reduced Energy Expenditure. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26913–26920.
184. Ge, X.; Yin, L.; Ma, H.; Li, T.; Chiang, J. Y. L.; Zhang, Y. Aldo-Keto Reductase 1B7 Is a Target Gene of FXR and Regulates Lipid and Glucose Homeostasis. *J. Lipid Res.* **2011**, *52*, 1561–1568.
185. Lundquist, J. T.; Harnish, D. C.; Kim, C. Y.; Mehlmann, J. F.; Unwalla, R. J.; Phipps, K. M.; Crawley, M. L.; Commons, T.; Green, D. M.; Xu, W.; et al. Improvement of Physicochemical Properties of the Tetrahydroazepinoindole Series of Farnesoid X Receptor (FXR) Agonists: Beneficial Modulation of Lipids in Primates. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1774–1787.
186. Richter, H. G. F.; Benson, G. M.; Blum, D.; Chaput, E.; Feng, S.; Gardes, C.; Grether, U.; Hartman, P.; Kuhn, B.; Martin, R. E.; et al. Discovery of Novel and Orally Active FXR Agonists for the Potential Treatment of Dyslipidemia & Diabetes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 191–194.
187. Wang, X. X.; Jiang, T.; Shen, Y.; Caldas, Y.; Miyazaki-Anzai, S.; Santamaria, H.; Urbanek, C.; Solis, N.; Scherzer, P.; Lewis, L.; et al. Diabetic Nephropathy Is

- Accelerated by Farnesoid X Receptor Deficiency and Inhibited by Farnesoid X Receptor Activation in a Type 1 Diabetes Model. *Diabetes* **2010**, *59*, 2916–2927.
188. Lindor, K. D. Farnesoid X Receptor Agonists for Primary Biliary Cirrhosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2011**, *27*, 285–288.
189. Yang, F.; Huang, X.; Yi, T.; Yen, Y.; Moore, D. D.; Huang, W. Spontaneous Development of Liver Tumors in the Absence of the Bile Acid Receptor Farnesoid X Receptor. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 863–867.
190. Merk, D.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M. Medicinal Chemistry of Farnesoid X Receptor Ligands: From Agonists and Antagonists to Modulators. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1015–1036.
191. Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P. R.; Morelli, A.; Parks, D. J.; Willson, T. M. 6 $\alpha$ -Ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDCA), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3569–3572.
192. 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.; et al. Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2971–2974.
193. Chiang, P.; Thompson, D. C.; Ghosh, S.; Heitmeier, M. R. A Formulation-Enabled Preclinical Efficacy Assessment of a Farnesoid X Receptor Agonist, GW4064, in Hamsters and Cynomolgus Monkeys. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 4722–4733.
194. Howarth, D. L.; Law, S. H. W.; Law, J. M.; Mondon, J. a; Kullman, S. W.; Hinton, D. E. Exposure to the Synthetic FXR Agonist GW4064 Causes Alterations in Gene Expression and Sublethal Hepatotoxicity in Eleutheroembryo Medaka (*Oryzias Latipes*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2010**, *243*, 111–121.
195. Nicolaou, K. C.; Evans, R. M.; Roecker, A. J.; Hughes, R.; Downes, M.; Pfefferkorn, J. A. Discovery and Optimization of Non-Steroidal FXR Agonists from Natural Product-like Libraries. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 908–920.
196. Flatt, B.; Martin, R.; Wang, T.; Mahaney, P.; Murphy, B.; Gu, X.; Foster, P.; Li, J.; Pircher, P.; Petrowski, M.; et al. Discovery of XL335 (WAY-362450), a Highly Potent, Selective, and Orally Active Agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 904–907.
197. Morphy, R.; Rankovic, Z. Fragments, Network Biology and Designing Multiple Ligands. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 156–160.
198. Yildirim, M. a; Goh, K.-I.; Cusick, M. E.; Barabási, A.-L.; Vidal, M. Drug-Target Network. *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1119–1126.
199. Pujol, A.; Mosca, R.; Farrés, J.; Aloy, P. Unveiling the Role of Network and Systems Biology in Drug Discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 115–123.

200. Hopkins, A. L. Network Pharmacology: The next Paradigm in Drug Discovery. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 682–690.
201. Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6523–6543.
202. Meirer, K.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Inhibitors of the Arachidonic Acid Cascade: Interfering with Multiple Pathways. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2013**.

## Danksagung

Ich danke Jun.-Prof. Eugen Proschak für die Möglichkeit als einer seiner ersten Doktoranden diese Arbeit anzufertigen. Darüberhinaus bedanke ich mich für das tolle Arbeitsklima und die vielen Erfahrungen, die ich aus dieser Zeit mitnehmen konnte (sowohl in professioneller als auch privater Hinsicht).

Prof. Dieter Steinhilber danke ich für die Betreuung meiner Arbeit und die stets produktiven Anregungen in den Arbeitskreiseminaren.

Dem gesamten Arbeitskreisen Proschak, Steinhilber und Schubert-Zsilavec danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die gute Zeit und die unzähligen, „schwer-philosophischen“ Kaffeepausen.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern Doris und Raimund, die mich wie selbstverständlich über all die Jahre (mit viel Geduld) unterstützt und ermutigt haben. Ohne diese Unterstützung wäre der lange Weg zur Promotion gar nicht möglich gewesen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die vorliegende Dissertation wurde selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Alle Stellen die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung nicht vorgelegt worden.

Frankfurt am Main, den .....

.....

(Janosch Achenbach)

## Curriculum vitae

# Janosch Achenbach

## Dipl. Bioinformatiker

Birthday: 12.06.1984

Place of Birth: Frankfurt am Main,  
Germany

Marital Status: Unmarried



## Professional

---

11/2013 – present     **BASF, Ludwigshafen, Germany**  
Group for computational chemistry & biology  
Computational Chemist

## Education

---

11/2009 – 11/2013     **Goethe University Frankfurt, Germany**  
**PhD in Computational Chemistry and Drug Design**  
Institute of Pharmaceutical Chemistry,  
Jun. Prof. Dr. Eugen Proschak

Thesis: „Recognition of Polypharmacology using Self-organizing Maps“.

10/2004 – 07/2009     **Goethe University Frankfurt, Germany**  
**Diplom in Bioinformatics, final grade: 1.5**  
Institute for Organic Chemistry and Chemical Biology,  
Prof. Dr. Gisbert Schneider

Thesis: „Entwicklung eines korrelations-basierten Deskriptors zum Virtuellen Screening von Protein-Liganden“.  
Final grade: 1.0

06/2003     **Ziehenschule (Europaschule) Frankfurt, Germany**  
Abitur, Final grade: 2.3  
Majors: Biology und Social Studies.

## Research Experience

---

- 11/2009 – 11/2013 **Research & Teaching Assistant**  
 Institute of Pharmaceutical Chemistry, Jun. Prof. Dr. Eugen Proschak  
 Supervision of master and diploma students, teaching of computer-aided drug design, edit and review of international publications.
- 01/2013 – 11/2013 **Translational Research Innovation Pharma (TRIP) Scholarship**  
 Implementation of an Off-Target prediction Web-Tool
- 10/2011 – 12/2012 **Merz Pharmaceuticals Scholarship**
- 01/2011 – 09/2011 **FIRST Scholarship**  
 Frankfurt International Research Graduate School on Translational Biomedicine
- Molecular Modeling and Chemoinformatics:**
- Development of a multi-layer self-organizing maps approach for the identification of novel multi-target ligands.
  - Extensive use of the KNIME pipelining tool for virtual screening, molecular docking, QSAR and data mining.
  - Ligand- and target-based virtual screening.
  - Repositioning of active ingredients using *in silico* approaches.
  - Implementation and use of machine learning techniques (SVM, random forest, SOM) for virtual screening and *in vitro* assay evaluation.
- Lab experience:**
- Development of fluorescence-based *in vitro* enzyme activity assays.
  - Saturation-Transfer-Difference (STD) – NMR spectrometry

## Personal Details

---

IT-Skills	General: Linux, Max OS X, Windows, Office. Scientific: Java, Python, R, Bash, SQL, MOE, Schrodinger Pymol, RDKit and CDK.
Languages	German, native speaker English, fluent French, basic speaking and writing
Private Interests	Sport (racing) cycling, climbing/hiking, jogging, literature.

## Publikationsliste

1. Janosch Achenbach, Franca-Maria Klingler, René Blöcher, Daniel Moser, Ann-Kathrin Häfner, Carmen Rödl, Björn Krüger, Frank Löhr, Holger Stark, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber, Ewgenij Proschak, Exploring the chemical space of multi-target ligands using aligned self-organizing maps, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**.

Beitrag zur Arbeit:

- Entwicklung des zu Grunde liegenden Algorithmus zur Überlagerung von selbstorganisierenden Karten für die Visualisierung und Exploration des chemischen Raums von multi-Target Liganden.
  - Implementierung und prospektive Anwendung des Algorithmus als virtuelles Screening Werkzeug zur Identifikation neuer, dualer Inhibitoren für die 5-Lipoxygenase und löslichen Epoxid Hydrolase.
  - In vitro Testung der identifizierten Verbindungen auf ihre inhibitorische Aktivität auf 5-LO und sEH.
    - Durchführung des HPLC-basierten 5-LO-Aktivitätsassays.
    - Durchführung fluoreszenz-basierten sEH-Aktivitätsassays.
    - Vorbereitung und Auswertung der STD-NMR 5-LO/sEH-Bindungsassays.
2. Weber, J.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E. VAMMPIRE: a matched molecular pairs database for structure-based drug design and optimization. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 5203–7.

Beitrag zur Arbeit:

- Betreuung der Diplomarbeit von Frau Julia Weber.
  - Beteiligung an der konzeptionellen Entwicklung und Ausarbeitung der Algorithmen, der Datenbankstruktur und des Web-Interface.
3. Janosch Achenbach, Matthias Gabler, Ramona Steri, Manfred Schubert-Zsilavec, and Ewgenij Proschak, Identification of novel farnesoid X receptor modulators using a combined ligand- and structure-based virtual screening, *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 920-924.

Beitrag zur Arbeit:

- Entwicklung einer virtuellen Screening Strategie zur Modellierung der konformationellen Flexibilität des Farnesoid X Rezeptors.
  - Kombination aus Struktur- und Liganden-basierten Pharmakophor-Screenings mit angeschlossenem Docking.
- Durchführung des virtuellen Screenings zur Identifikation neuer FXR-Agonisten.

4. Paulke, A.; Kremer, C.; Wunder, C.; Achenbach, J.; Djahanschiri, B.; Elias, A.; Stefan Schwed, J.; Hübner, H.; Gmeiner, P.; Proschak, E.; Toennes, S. W.; Stark, H., *Argyreia nervosa* (Burm. f.): Receptor profiling of lysergic acid amide and other potential psychedelic LSD-like compounds by computational and binding assay approaches. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, 1–6.

Beitrag zur Arbeit:

- Entwicklung eines Interpolations-basierten, in silico Modells zur Vorhersage von psychedelischer (LSD-ähnlichen) Aktivität.
- Anwendung des Modells zur Vorhersage der möglichen Target-Proteine (Receptorome-Screening) von Lysergsäureamid und Derivaten, die aus der *Argyreia nervosa* extrahiert wurden.

5. Daniel Moser, Janosch Achenbach, Franca-Maria Klingler, Estel·la Buscató, Steffen Hahn, and Ewgenij Proschak, Evaluation of structure-derived pharmacophore of soluble epoxide hydrolase inhibitors by virtual screening, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 6762-6765.

Beitrag zur Arbeit:

- Entwicklung eines struktur-basierten 3D-Pharmakophor-Modells zur Identifizierung neuer Inhibitoren der löslichen Epoxid Hydrolase (sEH).
- Virtuelles Screening mit dem entwickelten Modell und Auswahl möglicher Inhibitoren
- In vitro Testung der bestellten Verbindungen in einem fluoreszenz-basierten Inhibitions-Assay.

6. Ramona Steri & Janosch Achenbach, Dieter Steinhilber, Manfred Schubert-Zsilavec, and Ewgenij Proschak, Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity, *Biochem Pharmacol.*, **2012**, 83 (12), 1674-81.

Beitrag zur Arbeit:

- Entwicklung eines Drug-Repurposing-Modells mit Hilfe von selbst-organisierenden Karten.
  - Identifikation von Aktivitätsinseln mit einer Anhäufung von FXR-Agonisten und Extraktion ähnlicher Verbindungen mit potentieller FXR-Aktivität.
- Anwendung des Modells zur Vorhersage potentieller FXR-Aktivität von bereits auf dem Markt befindlicher Wirkstoffen.

7. Daniel Moser, Joanna M. Wisniewska, Steffen Hahn, Janosch Achenbach, Estel·la Buscató, Franca-Maria Klingler, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber and Ewgenij Proschak, Dual-target virtual screening by pharmacophore elucidation and molecular shape filtering, *ACS Med. Chem. Lett*, **2012**, 3, 155–158.

Beitrag zur Arbeit:

- Betreuung der Diplomarbeit von Herrn Daniel Moser.
- Beteiligung an der konzeptionellen Entwicklung und Implementierung eines Algorithmus, bzw. Workflows zur Identifizierung potentieller Pharmakophor-Modelle für multi-Target Liganden.
  - Entwicklung des Pharmakophor-Überlagerungsprozesses.
- In vitro Testung der identifizierten Verbindungen auf ihre inhibitorische Aktivität auf 5-LO und sEH.
  - Durchführung des HPLC-basierten 5-LO-Aktivitätsassays.
  - Durchführung fluoreszenz-basierten sEH-Aktivitätsassays.

8. Janosch Achenbach, Pekka Tiikkainen, Lutz Franke and Ewgenij Proschak, Computational tools for polypharmacology and repurposing, *Future Med. Chem.*, **2011**, 3, 961-968.

Beitrag zur Arbeit:

- Literatur-Recherche, Ausarbeitung und Anfertigung verschiedener Kapitel des Reviews.

9. Steffen Hahn & Janosch Achenbach, Estel·la Buscató, Franca-Maria Klingler, Mirjam Schroeder, Karin Meirer, Martina Hieke, Jan Heering, Eduardo Barbosa-Sicard, Frank Loehr, Ingrid Fleming, Volker Doetsch, Manfred Schubert-Zsilavecz, Dieter Steinhilber, Ewgenij Proschak, Complementary Screening Techniques Yielded Fragments that Inhibit the Phosphatase Activity of Soluble Epoxide Hydrolase, *ChemMedChem*, **2011**, 6, 2146–2149.

Beitrag zur Arbeit:

- Planung und Durchführung des molekularen Dockings zur Identifizierung neuer Inhibitoren der Phosphatase-Aktivität der löslichen Epoxid Hydrolase.
- In vitro Testung der in silico Hits auf ihre sEH-Phosphatase Inhibition in einem fluoreszenz-basierten Aktivitäts-Assay.

10. Joanna M Wisniewska, Carmen B Rödl, Astrid S Kahnt, Sandra Ulrich, Yusuf Tanrikulu, Janosch Achenbach, Florian Rörsch, Sabine Grösch, Gisbert Schneider, Jindrich Cinatl, Ewgenij Proschak, Dieter Steinhilber, Bettina Hofmann, Molecular characterization of EP6-A novel imidazo[1,2-a]pyridine based direct 5-lipoxygenase inhibitor, *Biochem Pharmacol.*, **2011**, 83, 228-240.

Beitrag zur Arbeit:

## Publikationsliste

- Durchführung des molekularen Dockings der Verbindung EP-6 in ein Homologie-Modell der 5-Lipoxygenase.

## Publikationen

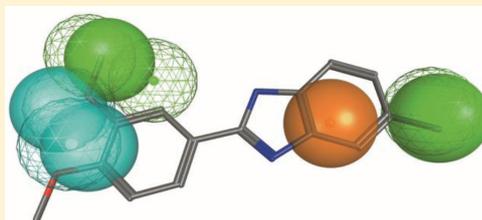
## Dual-Target Virtual Screening by Pharmacophore Elucidation and Molecular Shape Filtering

Daniel Moser, Joanna M. Wisniewska, Steffen Hahn, Janosch Achenbach, Estel·la Buscató, Franca-Maria Klingler, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber, and Ewgenij Proschak\*

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Johann Wolfgang Goethe University, Max-von-Laue-Strasse 9, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** Dual-target inhibitors gained increased attention in the past years. A novel *in silico* approach was employed for the discovery of dual 5-lipoxygenase/soluble epoxide hydrolase inhibitors. The ligand-based approach uses excessive pharmacophore elucidation and pharmacophore alignment in conjunction with shape-based scoring. The virtual screening results were verified *in vitro*, leading to nine novel inhibitors including a dual-target compound.



**KEYWORDS:** computational chemistry, drug design, virtual screening, pharmaceutical chemistry

Numerous approved drugs interact with macromolecules besides their main target,<sup>1</sup> which may contribute to overall efficacy or rather cause side effects (off-targets). Dual- or multitarget ligands have gained increased attention due to improved efficacy<sup>2</sup> and less side effects. Rational design of small molecules, which are able to interact with multiple targets involved in a disease pattern while leaving the off-targets untouched, is one of the challenging tasks.<sup>3</sup> Synthetic linking of two selective molecules has been an established approach to find novel dual ligands.<sup>4</sup> Although these hybrids yield high potency and can be used as tool compounds, they often exhibit increased molecular weight and leave little space for optimization of pharmacological and pharmacodynamic properties. A rational approach to find dual or multitarget leads has not been established yet, although the design of a common pharmacophore seems to be a straightforward way to deal with this task. A structure-based application by Wei et al.<sup>5</sup> demonstrates that a dual pharmacophore can be derived from two X-ray structures of the targets of interest. In this study, we present a generalized strategy for the generation of common pharmacophore models even in the absence of structural target information and an application for the design of dual ligands of 5-lipoxygenase (5-LO) and soluble epoxide hydrolase (sEH).

We started from the assumption that two targets share a common interaction pattern, although not necessarily at the same spatial distance. The latter circumstance makes the direct elucidation of the common pharmacophore from a combined set of active ligands of both targets unfeasible. Therefore, we developed a new approach for the *in silico* discovery of dual-target ligands using aligned pharmacophore models combined with shape-based scoring. The basic idea of this approach is the generation of a large number of “selective” pharmacophore models for each target and subsequent comparison of them

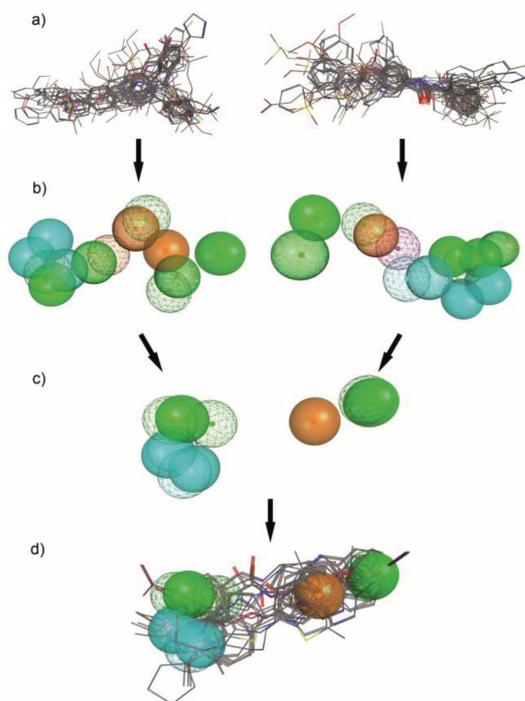
(Figure 1). Two pharmacophore models are considered to be equal if they exhibit a similar interaction pattern but not necessarily at exactly the same distance. These two pharmacophore models are used for screening, and the shape of chemical compounds hitting both pharmacophore models is compared with the shape of active ligands to ensure that the screening hits are able to fit in the binding pocket.

Starting with two sets of known active compounds for each target, a number of different pharmacophore models are generated using the pharmacophore elucidator routine included in the MOE<sup>6</sup> software. The elucidator tries to enumerate all models that are matched by at least a given percentage of the molecules. Because the pharmacophore elucidation is very time-consuming, it may be necessary to apply a clustering algorithm in advance and to pick only the most active molecules of each cluster. Afterward, the pharmacophore models are subjected to pairwise alignment using a graph-based approach. First, an association graph is generated, followed by a clique detection<sup>7</sup> and their alignment using the Kabsch algorithm<sup>8,9</sup> (see the Supporting Information). Because a compound may be able to bind to different targets in different conformations, the algorithm aligns pairs of pharmacophore models sharing the same features, which are not necessarily at exactly the same spatial distance. Using the aligned models, a pharmacophore search (using MOE) on a multiconformation database is performed to find compounds matching both models. The potentially “dual” ligands are scored by a shape-based comparison with the known active molecules using

**Received:** December 5, 2011

**Accepted:** January 17, 2012

**Published:** January 17, 2012



**Figure 1.** Virtual screening process. On the basis of multiple conformations of known ligands for both targets (a), a number of different pharmacophore models are generated (b). To find models sharing the same features at a similar spatial distance, pairwise alignments are computed (c). Using the aligned models, a pharmacophore search for molecules matching both models is performed (d). The potential “dual” compounds are scored by a shape-based comparison with the known active ligands (not shown). Different models are drawn in solid, as mesh, and as wireframe. The colors represent different pharmacophore features: green, hydrophobic; orange, aromatic; blue, H-bond acceptor; and purple, H-bond donor.

ShaEP.<sup>10</sup> ShaEP maximizes the volume overlap between two molecules, which is required to avoid steric clashes within the binding site.<sup>11</sup> Using this approach, we performed a prospective fragment-based virtual screening for dual 5-LO/sEH inhibitors. Both enzymes play an important role in the arachidonic acid cascade and are involved in inflammatory processes, pain, cardiovascular diseases, and allergic reactions.<sup>12,13</sup>

The sEH is a member of the cytochrome P450 branch of the arachidonic acid cascade and catalyzes the oxidation of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) to the more soluble dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs). It has been shown that EETs are involved in a number of physiological processes,<sup>14</sup> and an increased EET level can mediate anti-inflammatory, antihypertensive, and vasodilatory effects.<sup>13</sup> Furthermore, a combined application of cyclooxygenase (COX), 5-LO activating protein (FLAP), and sEH inhibitors leads to a significantly increased anti-inflammatory efficacy as compared to the administration of a single compound.<sup>15</sup> However, inhibiting the sEH seems to induce a shift of the arachidonic acid cascade toward the 5-LO branch,<sup>16</sup> which caused albuminuria in the 5/6 nephrectomy model. Therefore,

the simultaneous inhibition of both targets might lead to more effective anti-inflammatory compounds and also to safer antihypertensive drugs.

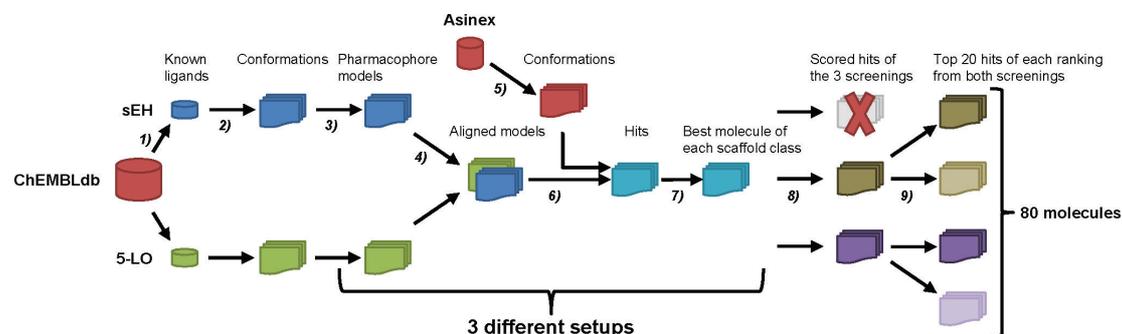
We used the ChEMBLdb database<sup>17,18</sup> (Version 9, 658075 molecules) as the source for the sets of known active compounds (Figure 2). For both targets, we retrieved all compounds with a reported  $IC_{50} < 1 \mu M$ , which led to 677 sEH and 914 5-LO inhibitors. Because the whole ChEMBLdb was used, the  $IC_{50}$  values are not always comparable due to different assays or assay conditions. However, as our approach does not rely strongly on the exact activity data, they were suitable for our requirements.

The sets were both clustered using two different setups: one based on MACCS substructure keys<sup>19</sup> (as implemented in MOE) using the Jarvis–Patrick<sup>20</sup> clustering algorithm and the Tanimoto coefficient<sup>21,22</sup> as the distance metric, and the other one based on the CATS2D descriptor<sup>23,24</sup> using the *k*-means algorithm implemented in KNIME (Konstanz Information Miner)<sup>25</sup> with the Euclidean distance as the metric. The clustering parameters were adjusted to yield a total of 50 clusters whereof the most active compounds of each cluster were picked. Using the more diverse set of each target, we generated multiple conformations using the stochastic search in MOE with an output strain limit of 6 kcal/mol, which led to 2640 (sEH) and 532 (5-LO) structures. On the basis of these conformations, we used the pharmacophore elucidator of MOE to generate a multitude of pharmacophore models for both targets. The elucidation was realized with three different setups: The first setup did not emphasize any particular pharmacophore feature; the second and third setup emphasized aromatic and H-bond donor/acceptor features, respectively (see the Supporting Information). The three runs yielded 6764/1469 (sEH/5-LO), 33/118, and 6190/1362 different models, which led to 129, 31, and 92 aligned “dual” models.

For virtual screening, we used the “merged fragments” database provided by Asinex<sup>26</sup> (37429 molecules). Similar to the preparation of the known active compounds, we first generated multiple conformations (overall, 244423 conformations). Then, using the aligned models, we performed a pharmacophore search (yielding 645/200/2071 hits, respectively) followed by a scaffold analysis for further data reduction. By selecting the best-matching molecules of each scaffold class only, we obtained 360, 120, and 929 potential dual compounds. In the last step of the virtual screening workflow, these molecules were scored using ShaEP. As ShaEP returns two scores, *shaep\_best* and *shaep\_average*, we obtained two different rankings of molecules for each virtual screening setup. We considered the first elucidation setup to be less specific than the setups two and three as there was no particular emphasis on any feature leading to more general models. Therefore, we retrieved the top 20 from each ranking of the setups two and three for manual selection.

Out of these 80 molecules (69 unique compounds), we selected 36 molecules manually (see the Supporting Information) and ordered them for in vitro activity assessment against 5-LO and sEH. 5-LO inhibition was determined in a well-established, cell-free HPLC-based assay,<sup>27</sup> and sEH inhibition in a fluorescence-based assay<sup>28</sup> (see the Supporting Information). Nine out of the compounds exhibited functional  $IC_{50}$  values below  $50 \mu M$  in either the 5-LO or the sEH assay.

None of the compounds has reported activities on these targets. The most potent 5-LO hits 3, 4, and 5 yielded functional  $IC_{50}$  values between 2.2 and  $7.6 \mu M$ , whereas the

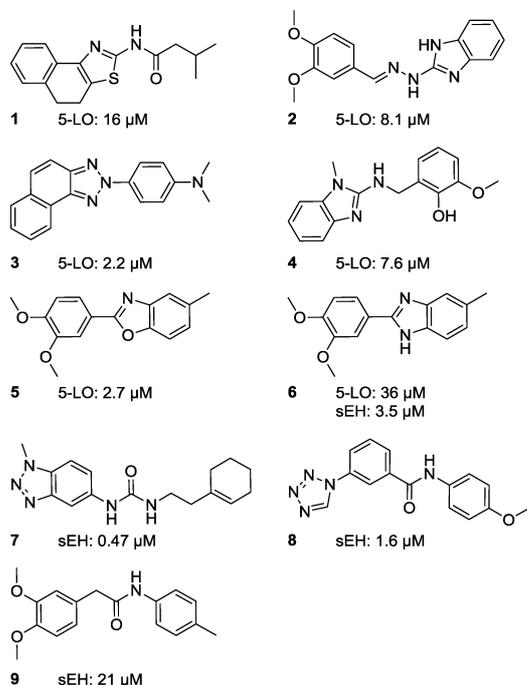


**Figure 2.** Overview of the virtual screening workflow. For a more detailed description, please see the main text. (1) First, all known ligands of sEH and 5-LO with an  $IC_{50} < 1 \mu M$  were retrieved from the ChEMBLdb. (2) The compounds were washed and clustered, and conformations were generated. (3) On the basis of these conformations, multiple pharmacophore models were generated using the pharmacophore elucidator routine of MOE with three different setups. (4) These models were subsequently aligned to yield “dual” models. (5) As the vendor database, the “merged fragments” database provided by Asinex was used. The compounds were washed, and conformations were generated. (6) With the aligned “dual” models, a pharmacophore search for molecules matching both models was performed on the Asinex database. (7) To further reduce the number of hits, a scaffold analysis was performed, and only the best matching molecule of each scaffold class was retained. (8) The resulting hits of the three screenings were scored using ShaEP. As mentioned in the main text, screening one was dropped. (9) As ShaEP returns two scores, we obtained two rankings for both remaining screenings. From each of these four lists, we picked the top 20, leading to a total of 80 molecules.

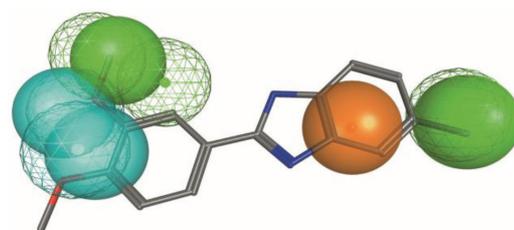
most potent sEH hits **6**, **7**, and **8** ranged between 0.47 and 3.5  $\mu M$  (Figure 3). Besides these selective inhibitors, one compound, **6**, showed activity on both targets with  $IC_{50}$  values of 36 and 3.5  $\mu M$ , respectively.

Regarding the structures of these hits, it seems obvious that an H-bond donor and acceptor feature is required to bind to the sEH. Although **5** and **6** are structurally similar, **5** shows no

activity on sEH, which may be due to the missing H-bond donor feature at the benzoxazole ring. For the same reason, compound **4**, an N-substituted benzimidazole, shows no activity. Because urea-free, unsubstituted benzimidazoles have not yet been reported as sEH inhibitors, this hit could indicate a novel class of inhibitors. Remarkably, all 36 compounds were matched by only five different pharmacophore models, with one model accounting for 20 molecules. Although none of these models contained the mentioned H-bond donor/acceptor feature, the combination of pharmacophore search and shape-based comparison led to a number of hits for both targets, including a novel dual-target compound (**6**, Figure 4).



**Figure 3.** Virtual screening hits:  $IC_{50}$  values were determined only if a compound showed at least 50% inhibition at a concentration of 30  $\mu M$ .



**Figure 4.** Compound **6** with the two matched pharmacophore models. Solid, 5-LO model; wireframe, sEH model.

In summary, we presented a virtual screening approach for the discovery of potential dual-target compounds. We derived a multitude of pharmacophore models from known ligands, computed pairwise alignments between models of both targets, and used these alignments for pharmacophore search. In conjunction with a shape-based similarity scoring, we were able to obtain a number of selective single-target ligands as well as a novel dual 5-LO/sEH inhibitor. These results indicate that the idea of aligned pharmacophore models can be successfully employed for the discovery of dual-target ligands. Nevertheless, pharmacophore elucidation is not only a crucial but also very time-consuming step; therefore, parametrization should be

considered carefully since minor changes can have a major impact on the outcome of virtual screening.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Detailed pharmacophore elucidation and alignment description, assay setups, and all compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel: +49 69 798 29301. Fax: +49 69 798 29258. E-mail: [proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de](mailto:proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the LOEWE Lipid Signaling Forschungszentrum Frankfurt (LiFF), the Oncogenic Signaling Frankfurt (OSF), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Exzellenzcluster 147 "Cardio-Pulmonary Systems") and the Fonds der Chemischen Industrie. E.B. thanks DAAD-La Caixa (Spain), J.A. thanks Merz Pharmaceuticals for a fellowship. The authors are grateful to the Chemical Computing Group (Montreal, Canada) for granting the academic license for the MOE software.

## ■ REFERENCES

- (1) Sams-Dodd, F. Target-based drug discovery: Is something wrong? *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 139–147.
- (2) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6523–6543.
- (3) Morphy, R.; Rankovic, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 641–651.
- (4) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing multiple ligands—Medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15*, 587–600.
- (5) Wei, D.; Jiang, X.; Zhou, L.; Chen, J.; Chen, Z.; He, C.; Yang, K.; Liu, Y.; Pei, J.; Lai, L. Discovery of multitarget inhibitors by combining molecular docking with common pharmacophore matching. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7882–7888.
- (6) *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2010.10; Chemical Computing Group Inc.: Montreal, Canada, 2010.
- (7) Bron, C.; Kerbosch, J. Algorithm 457: Finding all cliques of an undirected graph. *Commun. ACM* **1973**, *16*, 575–577.
- (8) Kabsch, W. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **1976**, *32*, 922–923.
- (9) Kabsch, W. A discussion of the solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **1978**, *34*, 827–828.
- (10) Vainio, M. J.; Puranen, J. S.; Johnson, M. S. ShaEP: Molecular Overlay Based on Shape and Electrostatic Potential. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 492–502.
- (11) Proschak, E.; Rupp, M.; Derksen, S.; Schneider, G. Shapelets: Possibilities and limitations of shape-based virtual screening. *J. Comput. Chem.* **2008**, *29*, 108–114.
- (12) Werz, O.; Steinhilber, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 701–718.
- (13) Imig, J. D.; Hammock, B. D. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 794–805.
- (14) Inceoglu, B.; Schmelzer, K. R.; Morisseau, C.; Jinks, S. L.; Hammock, B. D. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2010**, *82*, 42–49.
- (15) Liu, J.-Y.; Yang, J.; Inceoglu, B.; Qiu, H.; Ulu, A.; Hwang, S.-H.; Chiamvimonvat, N.; Hammock, B. D. Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 880–887.
- (16) Jung, O.; Jansen, F.; Mieth, A.; Barbosa-Sicard, E.; Pliquet, R. U.; Babelova, A.; Morisseau, C.; Hwang, S.-H.; Tsai, C.; Hammock, B. D.; Schaefer, L.; Geisslinger, G.; Amann, K.; Brandes, R. P. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. *PLoS One* **2010**, *5*, e11979.
- (17) *ChEMBLdb*, Version 9; EMBL-EBI: Cambridge, United Kingdom, 2011.
- (18) Overington, J. ChEMBL. An interview with John Overington, team leader, chemogenomics at the European Bioinformatics Institute Outstation of the European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI). Interview by Wendy A. Warr. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2009**, *23*, 195–198.
- (19) *MACCS Structural Keys*; MDL Information Systems Inc., 1979.
- (20) Jarvis, R. A.; Patrick, E. A. Clustering Using a Similarity Measure Based on Shared Near Neighbors. *IEEE Trans. Comput.* **1973**, *C-22* (11), 1025–1034.
- (21) Tanimoto, T. T. *Internal Report 17th Nov*; IBM, 1957.
- (22) Jaccard, P. Etude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et du Jura. *Bull. Soc. Vaudoises Sci. Naturelles* **1901**, *37*, 547–579.
- (23) Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3068–3070.
- (24) Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2894–2896.
- (25) *Konstanz Information Miner (KNIME) 2.3*; KNIME.com AG: Zurich, 2011.
- (26) *Merged "non-password" Fragments*; Asinex Ltd.: Moscow, Russia.
- (27) Brungs, M.; Rådmark, O.; Samuelsson, B.; Steinhilber, D. Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 107–111.
- (28) Morisseau, C.; Hammock, B. D. Measurement of Soluble Epoxide Hydrolase (sEH) Activity. In *Current Protocols in Toxicology*; Bus, J. S., Costa, L. G., Hodgson, E., Lawrence, D. A., Reed, D. J., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, 2007; pp 33:4.23.1–33:4.23.18.

Moser *et al.*, Supporting Information

---

**Dual-target virtual screening by pharmacophore elucidation and molecular shape filtering**

Daniel Moser, Joanna M. Wisniewska, Steffen Hahn, Janosch Achenbach, Estel·la Buscató, Franca-Maria Klingler, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber and Ewgenij Proschak

---

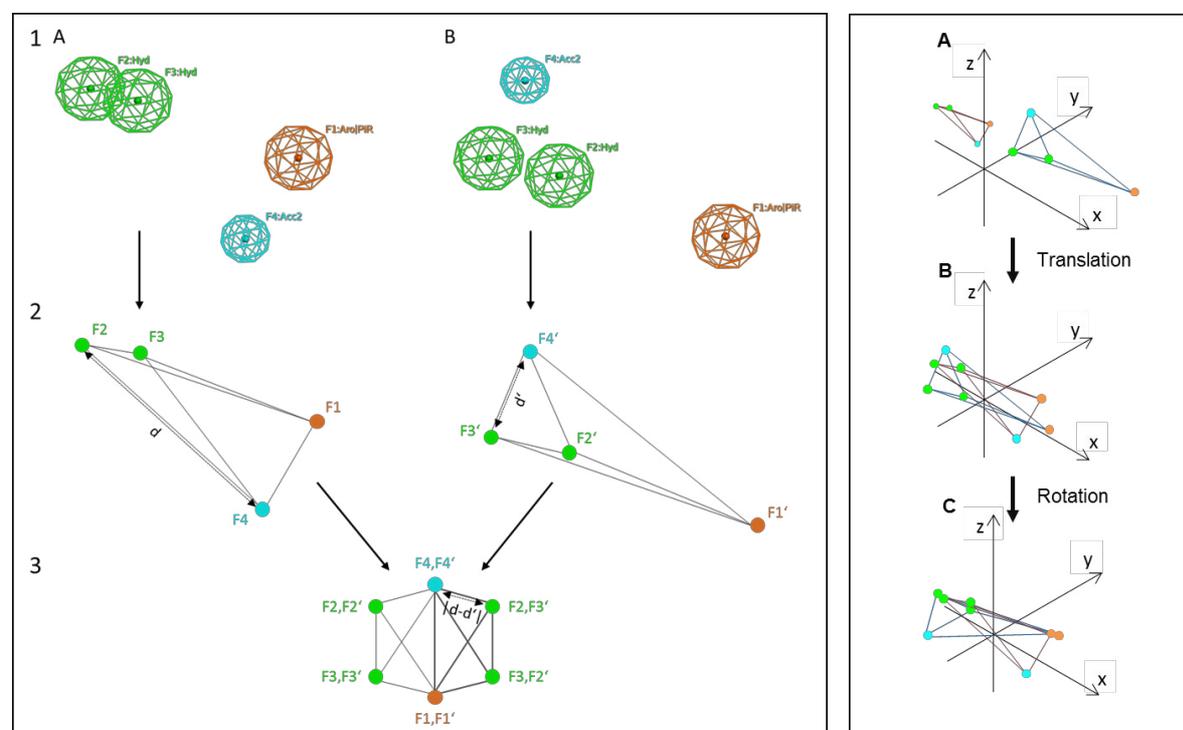
## Computational Methods

### Pharmacophore Elucidation

For the generation of pharmacophore models, the *pharmacophore elucidator* routine of the program MOE (Molecular Operating Environment (MOE), 2010.10, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada 2010) was employed. The elucidator tries to enumerate all models which are matched by at least a given percentage (active coverage) of the molecules. For all three virtual screening runs, the “Unified” annotation scheme was used with the following query expressions: “Aro|PiR, Hyd, Don2, Acc2, ML2, Cat, Ani, O2, CN2”, “Aro|PiR, Hyd, Cat, Ani, O2, CN2” and “Aro|PiR, Hyd, Cat, Ani, O2, CN2, Don, Acc”. The active coverage parameter was set to 0.2 (20 %), the query spacing to 1 and the query cluster to 1.25.

### Pharmacophore Alignment

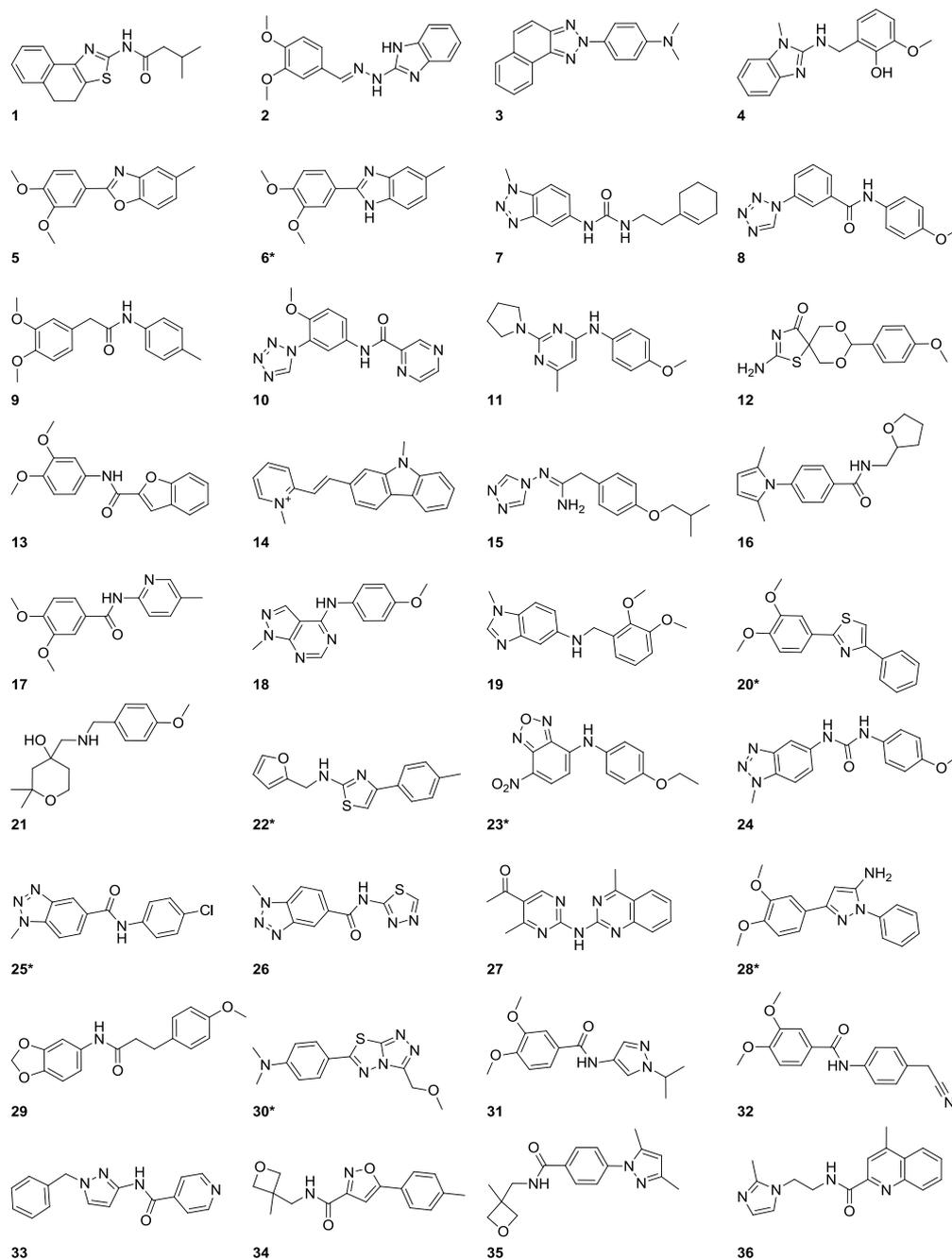
The alignment algorithm works basically as described by Proschak *et al.* (E. Proschak, M. Rupp, S. Derksen, G. Schneider, *J. Comput. Chem* 2008, 29, 108-114) and shown in Supplementary Figure 1. It was written in Java and implemented as a KNIME node.



**Supplementary Figure 1.** Alignment of pharmacophore models. Left side: the models (1) are represented as fully connected, undirected graphs (2). The nodes are labeled with the feature, the edges with the *Euclidean distance* between two features. From these graphs, an association graph (3) is constructed, which represents corresponding nodes as well as their connectivity in both source graphs. For each pair of nodes from the source graphs, an association node is created, if these parent nodes have the same properties, i.e. pharmacophore features. Between two association nodes, an edge is inserted, if an edge between the corresponding parent nodes exists and the difference of the distances is below a user-defined threshold. Upon the association graph, a clique detection using Bron-Kerbosch Algorithm (C. Bron, J. Kerbosch, *Commun. ACM* 1973, 16, 575-577) is performed to find the maximum common subgraph (highlighted bold in (3)) and therefore the greatest common subset of pharmacophore features between two models. Right side: Once the maximum cliques have been found, the corresponding nodes in the source graphs are aligned using the Kabsch Algorithm (W. Kabsch, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* 1976, 32, 922-923; W. Kabsch, *Acta Crystallogr.* 1978, 34, 827-828) which basically works in two steps: first, the graphs are translated to the origin of the coordinate system. Subsequently, an optimal rotation matrix is calculated and the graphs are rotated accordingly yielding the optimal alignment in terms of RMSD (root mean square deviation).

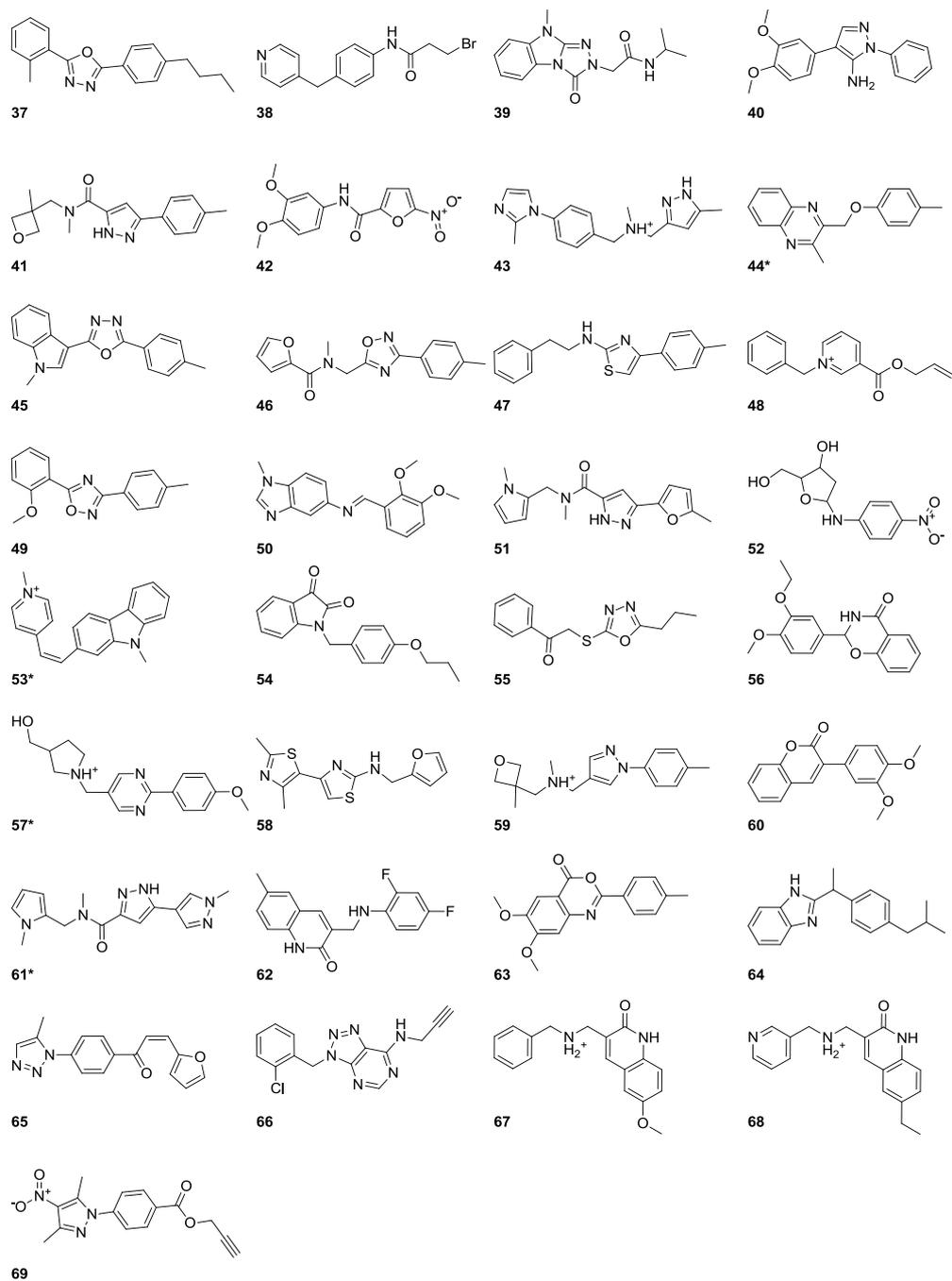
### Selection of promising compounds

From the 80 compounds found by virtual screening (69 unique compounds), the 36 shown in Supplementary Figure 2 were chosen manually and/or ordered for *in vitro* activity determination.



**Supplementary Figure 2.** The 36 compounds which were ordered for *in vitro* activity determination. Compounds marked with an asterisk were found in more than one ranking.

Moser *et al.*, Supporting Information



**Supplementary Figure 3.** The remaining 33 compounds which were not selected manually. Compounds marked with an asterisk were found in more than one ranking.

## Moser *et al.*, Supporting Information

### Assays

#### sEH

sEH assays were performed at room temperature (RT) in black polystyrol 96-well plates using PHOME (3-Phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-methyl ester) as substrate (N. M. Wolf, C. Morisseau, P. D. Jones, B. Hock, B. D. Hammock, *Anal. Biochem* **2006**, *355*, 71-80). 10  $\mu$ L of the respective test compound (dissolved in DMSO) at different concentrations in assay buffer (BisTris-HCl buffer (25 mM), 0.1 mg/mL BSA, 0.01 % Triton X-100, pH 7.0) were incubated with 100  $\mu$ L of enzyme in assay buffer for 15 minutes at RT. The assay was performed in advance without inhibitors to determine the necessary amount of sEH to obtain about 1000 RFU (relative fluorescence units) after 15 minutes of measurement (*vide infra*). Subsequent to the incubation, 10  $\mu$ L PHOME was added (final concentration 50  $\mu$ M) and the increase in fluorescence was measured instantly over the next 15 minutes every minute. The increase of fluorescence during this time gives the activity of sEH in  $\Delta$ RFU/min. The different activities of inhibited and not inhibited protein compared to the well without protein give the inhibition of the enzyme as follows (Eq. 1)

$$\text{Inhibition [\%]} = 100 \times \left[ 1 - \frac{V_I - V_B}{V_T - V_B} \right] \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $V_I$  is the velocity obtained in the presence of an inhibitor (I);  $V_B$  is the velocity obtained for the blank (B) control; and  $V_T$  is the velocity obtained for the total activity (T) control (no inhibitor). The linearity of the reaction rate was checked.

#### 5-LO

Recombinant 5 LO proteins were expressed at 22°C and purified from 1-liter cultures of *E. coli* BL21 transformed with the plasmid pT3-5-LO (YY. Zhang, O. Rådmark, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **1992**, *89*, 485-489) according to the ATP affinity chromatography procedure as described previously (T. Hammarberg, YY. Zhang, B. Lind, O. Rådmark, B. Samuelsson, *FEBS J.* **1992**, *230*, 401-407; T. Hammarberg, P. Provost, B. Persson, O. Rådmark, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38787-38793). For determination of 5-LO activity, 2 -3  $\mu$ g protein was dissolved in 1 ml of reaction mix (PBS, pH 7.4, 1 mM EDTA, and 1 mM ATP). After pre-incubation with the test compounds or vehicle (DMSO) at the indicated concentrations for 15 min at 4°C, the samples containing purified 5-LO were pre-warmed for 30 sec at 37°C. The reaction was started after addition of 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 20  $\mu$ M AA. After 10 min at 37°C, the reaction was stopped with 1 ml of ice-cold methanol. 30  $\mu$ l of 1 N HCl, 200 ng of prostaglandin  $B_1$  as internal standard and 500  $\mu$ l of PBS, pH 7.4 were added. 5-LO metabolites were extracted and analyzed by HPLC as described (M. Brungs, O. Rådmark, B. Samuelsson, D. Steinhilber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 107-111). 5 LO product formation was determined as ng of 5-LO products, which includes all-*trans* isomers of  $\text{LTB}_4$ , 5(S),12(S)-dihydroxy-6,10-*trans*-8,14-*cis*-eicosatetraenoic acid (5(S),12(S)-diHETE), and 5(S)-hydro(peroxy)-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraenoic acid (5-H(p)ETE). Each experiment was performed at least three times. Data (mean  $\pm$  S.E.) are expressed as percentage of control (DMSO).

#### $IC_{50}$ -value estimation

$IC_{50}$  values were estimated from the % of residual activity of the enzyme under influence of a compound compared to the average residual activity of the controls which were assigned 100 % residual activity. The values were plotted against the logarithmic inhibitor concentration (in molar) and fitted with Eq. 2 using GraphPad Prism 5 (log(inhibitor) vs. response (three parameters) equation with Least squares fit).

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{X - \log IC_{50}}} \quad (\text{Eq. 2})$$

where

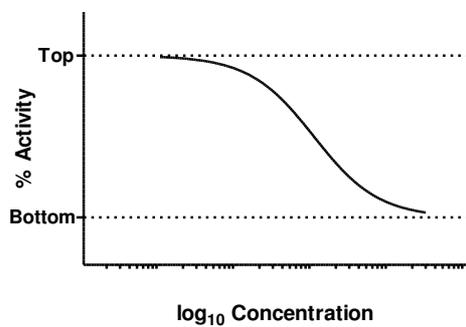
X: log of concentration

Y: Response, decreasing as X increases

Top and Bottom: Plateaus in same units as Y (Supplementary Figure 4)

$\log IC_{50}$ : Same log units as X

Moser *et al.*, Supporting Information



**Supplementary Figure 4.** Top and bottom plateaus of an  $IC_{50}$  curve. The values are used to estimate the  $IC_{50}$  values using Eq. 3

## Exploring the Chemical Space of Multitarget Ligands Using Aligned Self-Organizing Maps

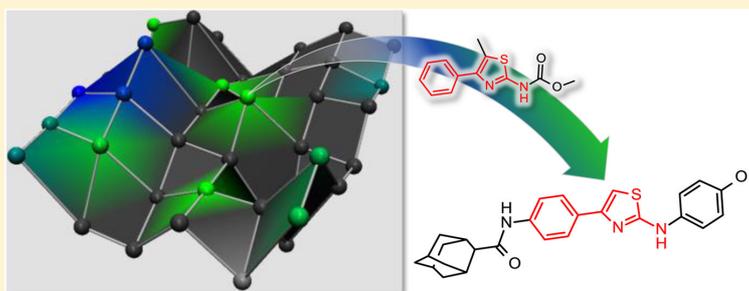
Janosch Achenbach,<sup>†</sup> Franca-Maria Klingler,<sup>†</sup> René Blöcher,<sup>†</sup> Daniel Moser,<sup>†</sup> Ann-Kathrin Häfner,<sup>†</sup> Carmen B. Rödl,<sup>†</sup> Simon Kretschmer,<sup>†</sup> Björn Krüger,<sup>‡</sup> Frank Löhner,<sup>§</sup> Holger Stark,<sup>†</sup> Bettina Hofmann,<sup>†</sup> Dieter Steinhilber,<sup>†</sup> and Ewgenij Proschak<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Institute of Pharmaceutical Chemistry, ZAFES/OSF, Goethe University, Max-von-Laue-Strasse 9, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

<sup>‡</sup>Chemical R&D—Drug Design, Merz Pharmaceuticals GmbH, Eckenheimer Landstrasse 100, D-60318 Frankfurt, Germany

<sup>§</sup>Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University, Max-von-Laue Strasse 9, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

### Supporting Information



**ABSTRACT:** Design of multitarget drugs and polypharmacological compounds has become popular during the past decade. However, the main approach to design such compounds is to link two selective ligands via a flexible linker. Although such chimeric ligands often have reasonable potency *in vitro*, the *in vivo* efficacy is low due to high molecular weight, low ligand efficiency, and poor pharmacokinetic profile. We developed an unprecedented *in silico* approach for fragment-based design of multitarget ligands. It relies on superposition of the chemical spaces related to the affinity on single targets represented by self-organizing maps. We used this approach for screening of molecular fragments, which bind to the enzymes 5-lipoxygenase (5-LO) and soluble epoxide hydrolase (sEH). Using STD-NMR and activity-based assays, we were able to identify fragments binding to both targets. Furthermore, we were able to expand one of the fragments to a potent dual inhibitor bearing a reasonable molecular weight (MW = 446) and high affinity to both targets (IC<sub>50</sub> of 0.03  $\mu$ M toward 5-LO and 0.17  $\mu$ M toward sEH).

**KEYWORDS:** Aligned self-organizing maps, 5-lipoxygenase, soluble epoxide hydrolase, structure–activity relationships

The one drug–one target–one disease paradigm in drug discovery has been reconsidered during the last decade. This paradigm change was mainly caused by high attrition rates in drug approvals due to toxicity and lack of efficacy. On top of that, the results of post-genomic and network biology showed that putative drug targets rarely act within isolated systems but rather as a part of a highly connected network.<sup>1</sup> Furthermore, the efficacy of several approved drugs has been traced back to the interaction with multiple targets.<sup>2</sup> Inhibition of a single target in such a network might not lead to the desired therapeutic effect, which explains a large proportion of clinical study failures. A paradigm shift towards designed polypharmacology should overcome the lack of efficacy;<sup>3</sup> however, the design of selective multi-target drugs is still challenging. In particular, sufficient affinity to each target as well as an adequate pharmacokinetic profile has to be considered.<sup>4</sup> Early design strategies comprise linking the relevant pharmacophores of

known selective ligands, but these methods often lead to compounds exhibiting high molecular weight and low ligand efficiency.<sup>3,4</sup> The application of computer-aided techniques could be beneficial for the development of multi-target drugs<sup>5</sup> as it was recently shown by Besnard et al.<sup>6</sup>

Fragment-based techniques have been broadly applied to design potent and selective drugs.<sup>7,8</sup> In this study, we extend this successful rational design strategy to multitarget ligands. We present an *in silico* approach based on alignment of self-organizing maps (SOM),<sup>9,10</sup> which we call multiSOM, for the identification of multitarget fragments with low molecular weight bearing space for further optimization. Our workflow

Received: July 9, 2013

Accepted: October 23, 2013

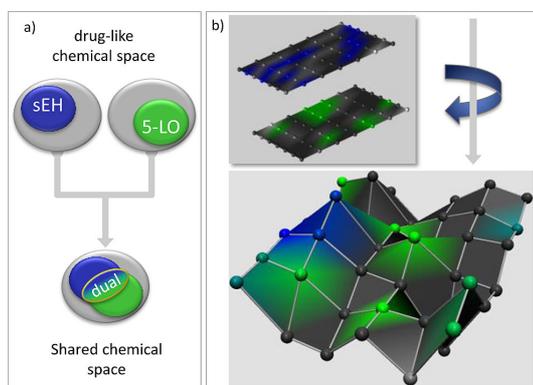
comprises the search for common substructures of known ligands for each target followed by the identification of multitarget relevant substructures among the target-specific substructures. We used our multiSOM approach to retrieve molecular fragments, which target 5-lipoxygenase (5-LO)<sup>11</sup> and soluble epoxide hydrolase (sEH).<sup>12,13</sup> We validated these findings by saturation transfer difference (STD)-NMR<sup>14,15</sup> and functional in vitro assay systems. Both enzymes are part of the arachidonic acid cascade and involved in inflammatory processes, pain, and cardiovascular diseases.<sup>16,17</sup> The simultaneous inhibition of both enzymatic pathways was shown to have synergistic effects in treatment of inflammation in vivo.<sup>18</sup>

The initial step in our screening workflow was the identification of characteristic molecular substructures of known active compounds for each target (5-LO, sEH). For the identification of the relevant substructures for each target we created two compound sets derived from the ChEMBLdb (v. 12) with annotated affinity data for each target.<sup>19</sup> We considered only ligands with  $IC_{50}$  and  $K_i$  values equal or less than 10  $\mu$ M. The DrugBank (v. 3.0) database served as a background distribution of the drug-like chemical space for the multiSOM training.<sup>20</sup> We generated a virtual fragment library as a subset of all compounds available from Specs (v. May 2011) by applying the "Astex Rule of 3" filter.<sup>21</sup> All computational procedures described were implemented as KNIME nodes or workflows.<sup>22</sup>

We used the Molecular Substructure Miner (MoSS) KNIME node,<sup>23</sup> a maximum common substructure based approach to search for frequent substructures in each active compound set. A substructure has been defined as frequent for one of the targets if it contains more than seven heavy atoms and occurs in at least 5% of the known active compounds of the corresponding target and only at most in 1% of the DrugBank compounds. We performed that kind of search for both known active sets and additionally (with swapped active/inactive definition) for the DrugBank compounds to generate a set of prevalent frequent substructures as background distribution. We could find 173 substructures that were characteristic for sEH inhibitors, 150 for 5-LO inhibitors, and 312 that were common for DrugBank compounds representing the drug-like chemical space. The subsequent step was the identification of potential dual-target substructures, i.e., the intersection of both sets of frequent substructures derived from sEH and 5-LO ligands that are most similar to each other. For the identification of this intersection, we used our multiSOM approach, which is based on the alignment of multiple self-organizing maps (Figure 1).

In this study we used the RDKit FeatMorgan fingerprint, a functional-class, generalized extended-connectivity fingerprint<sup>24</sup> to encode the identified frequent substructures. The multiSOM approach yielded three self-organized maps containing 42 neurons: two primary maps, each trained on one of both active sets and the inactive set, respectively, and additionally one aligned multiSOM (Figure 1b). High-lying neurons that contain similar substructures only from both active sets (colored) and not from the background set (gray) have been considered to be relevant for both targets. All substructures contained on those neurons were used for the following virtual screening procedure.

The resulting collection containing 229 dual relevant substructures was used to search for similar fragments in the prefiltered Specs database containing 8417 fragment-like small molecules. On the basis of the previously prepared active and



**Figure 1.** (a) Schematically depicted principle of the multiSOM approach. Two chemical subspaces described by the ligands of two distinct targets are aligned to determine the shared chemical space. (b) Primary maps of the multiSOM approach trained on the 5-LO/DrugBank and sEH/DrugBank frequent substructures (top). The resulting multiSOM map represents the similarity of the underlying, aligned neurons by its third dimension (bottom); a higher lying neuron means a higher similarity of the aligned, original neurons.

inactive substructure sets, we used the same multiSOM approach for the virtual screening. Because of the difference in size between the Specs fragment library and the frequent substructures collection, we decided to perform multiple multiSOM calculations in parallel. Each of these multiSOMs was trained on the dual substructures, the inactive DrugBank substructures and an equally sized subset of the Specs fragments library. Again, multiSOM neurons, which aggregated only dual relevant substructures and Specs fragments were further analyzed and served as a source for the final list of fragments purchased. We performed this procedure with three different fingerprint types, including the RDKit FeatMorgan, the RDKit layered fingerprint<sup>25</sup>, and the 2D CATS descriptor,<sup>26</sup> to maximize the chemical diversity of the purchased fragments. All three screenings yielded a total of 274 fragments of which we purchased 24 compounds regarding manual inspection and availability.

We had to determine the activity of the purchased fragments on two separate targets, which led to the decision to use a combination of two complementary in vitro assay approaches consisting of STD-NMR as binding assay under the same conditions for both targets, followed by functional assays for 5-LO and sEH. STD-NMR allows the testing of multiple fragments in a single experiment. Because of this fact, we clustered all 24 compounds in five subsets leading to a total of ten STD-NMR experiments for both targets. The composition of each subset was aimed to maximize the difference between the chemical shifts of the included fragments to facilitate the discrimination of the subsequent STD-NMR results. All fragments were tested at a final concentration of 400  $\mu$ M. Despite these preparations, we were not able to determine an utterly clear discrimination between all fragments on the STD-NMR spectra; thus, we had to classify the fragment in binders, nonbinders, and potential binders. We additionally determined the inhibitory potency of all fragments at a single concentration of 100  $\mu$ M in the particular functional in vitro assays for both recombinant enzymes. In the case of the 5-LO, we used a HPLC-based assay to determine the remaining 5-LO product

formation.<sup>27</sup> The sEH activity was determined in a fluorescence-based assay, which uses (3-phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-methyl ester (PHOME) as substrate (for all STD-NMR data and inhibition at 100  $\mu\text{M}$ , see Supporting Information)

Afterward, we determined an  $\text{IC}_{50}$  of all fragments, which showed a potential dual binding in the STD-NMR and an inhibition of at least 25% in the functional assays. The results of the 11 compounds matching these criteria are shown in Table 1. We were able to identify fragments with a functional  $\text{IC}_{50}$  value in the range of 3 to 379  $\mu\text{M}$  for sEH and in the range of 7 to 237  $\mu\text{M}$  for 5-LO. For both targets, we identified known,

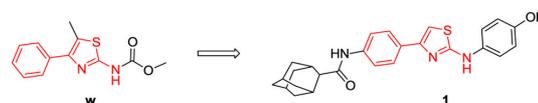
**Table 1.**  $\text{IC}_{50}$  Values ( $\mu\text{M}$ ) and STD-NMR Binding Data of the Most Promising Candidates

ID	Cpd.	sEH $\text{IC}_{50}^a$	5-LO $\text{IC}_{50}^a$	sEH STD <sup>b</sup>	5-LO STD <sup>b</sup>
f		91	-	x	✓
g		75	-	✓	✓
l		18	66	~	~
m		91	237	✓	~
n		95	27	✓	~
o		57	-	✓	✓
q		207	-	x	~
r		3	-	✓	~
v		-	8	n.s.	n.s.
w		379	89	n.s.	n.s.
x		133	7	n.s.	n.s.

<sup>a</sup> $\text{IC}_{50}$  values in  $\mu\text{M}$ ; each experiment was performed at least three times. <sup>b</sup>STD-NMR data: checkmark = binder; x = nonbinder; ~ = ambiguous; and n.s. = not soluble under STD conditions.

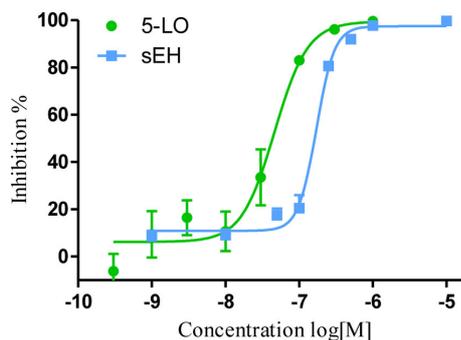
already described active scaffolds like benzimidazole, urea, and amide (l, q, o, and r) for the sEH or imidazo-[1,2-a]-pyridine, aminothiazole, and benzoxazole (g, w, and x) for the 5-LO as well as new, so far not described scaffolds like compounds m and n.

Furthermore, we were able to identify five fragments i, m, n, w, and x, which exhibit inhibitory activity on both targets. Especially compound n showed inhibitions in a low micromolar concentration range for both sEH and 5-LO. To investigate the optimization potential of at least one of the fragments, we searched our in-house library for compounds containing the dual hit fragments. We found a derivative of fragment w, an enlarged aminothiazole 1 (ST-1366, Figure 2).



**Figure 2.** Substructure search in our in-house library based on compound w lead to compound 1.

Compound 1 was subsequently tested in both assay systems yielding  $\text{IC}_{50}$  values of 0.03  $\mu\text{M}$  at 5-LO and 0.17  $\mu\text{M}$  at sEH (Figure 3). Thus, compound 1 is a good starting point for lead optimization.



**Figure 3.** Dose–response curves for the  $\text{IC}_{50}$  determination of compound 1 on 5-LO (green) and sEH (blue).

In conclusion, our study presents a novel approach for the development of multitarget drugs. We show that fragment-based techniques are applicable to design multitarget ligands, as postulated in theoretical papers by Morphy and Rancovic<sup>29,30</sup> and Bottegoni et al.<sup>5</sup> We suggest an in silico technique for recognition of molecular fragments suitable for multitarget drug design, which led to enrichment of dual fragments targeting sEH and 5-LO in a prospective study. An exemplary testing of an enlarged fragment yields a potent lead structure for further optimization. Further studies following this multiSOM strategy are needed to demonstrate the broad applicability of diverse fragment-based design.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

More detailed description of the multiSOM approach, the identified relevant substructures for each target, all purchased compounds and assay setups, and synthesis of compound 1.

This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*(E.P.) Tel: +49 69 798 29301. Fax: +49 69 798 29258. E-mail: [proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de](mailto:proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sachbeihilfe PR 1405/2-1 and SFB 1039, Teilprojekt A07), Oncogenic Signaling Frankfurt (OSF), Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), and LOEWE-Schwerpunkt: Anwendungsorientierte Arzneimittelforschung. J.A. thanks Merz Pharmaceuticals for a fellowship. J.A. and R.B. thank Else Kröner-Fresenius Foundation (EKFS), Research Training Group Translational Research Innovation-Pharma (TRIP) for a fellowship.

## REFERENCES

- (1) Jeong, H.; Mason, S. P.; Barabási, A. L.; Oltvai, Z. N. Lethality and centrality in protein networks. *Nature* **2001**, *411*, 41–2.
- (2) Zimmermann, G. R.; Lehár, J.; Keith, C. T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 34–42.
- (3) Morphy, R.; Kay, C.; Rankovic, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 641–51.
- (4) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6523–43.
- (5) Bottegoni, G.; Favia, A. D.; Recanatini, M.; Cavalli, A. The role of fragment-based and computational methods in polypharmacology. *Drug Discovery Today* **2011**, *17*, 23–34.
- (6) Besnard, J.; Ruda, G. F.; Setola, V.; Abecassis, K.; Rodriguiz, R. M.; Huang, X.-P.; Norval, S.; Sassano, M. F.; Shin, A. I.; Webster, L. A.; Simeons, F. R. C.; Stojanovski, L.; Prat, A.; Seidah, N. G.; Constam, D. B.; Bickerton, G. R.; Read, K. D.; Wetsel, W. C.; Gilbert, I. H.; Roth, B. L.; Hopkins, A. L. Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature* **2012**, *492*, 215–20.
- (7) Hajduk, P. J.; Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–9.
- (8) Congreve, M.; Chessari, G.; Tisi, D.; Woodhead, A. J. Recent developments in fragment-based drug discovery. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3661–80.
- (9) Kohonen, T. Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biol. Cybern.* **1982**, *43*, 59–69.
- (10) Digles, D.; Ecker, G. F. Self-organizing maps for in silico screening and data visualization. *Mol. Inf.* **2011**, *30*, 838–846.
- (11) Werz, O.; Steinhilber, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **2006**, *112*, 701–18.
- (12) Imig, J. D.; Hammock, B. D. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 794–805.
- (13) Shen, H. C.; Hammock, B. D. Discovery of inhibitors of soluble epoxide hydrolase: a target with multiple potential therapeutic indications. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1789–808.
- (14) Mayer, M.; Meyer, B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–17.
- (15) Wagstaff, J. L.; Taylor, S. L.; Howard, M. J. Recent developments and applications of saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD NMR) spectroscopy. *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 571–7.
- (16) Hwang, S. H.; Weckler, A. T.; Wagner, K.; Hammock, B. D. Rationally designed multitarget agents against inflammation and pain. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 1783–99.
- (17) Meirer, K.; Rödl, C. B.; Wisniewska, J. M.; George, S.; Häfner, A.-K.; la Buscató, E.; Klingler, F.-M.; Hahn, S.; Berressem, D.; Wittmann, S. K.; Steinhilber, D.; Hofmann, B.; Proschak, E. Synthesis and structure activity relationship studies of novel dual inhibitors of soluble epoxide hydrolase and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1777–1781.
- (18) Liu, J.-Y.; Yang, J.; Inceoglu, B.; Qiu, H.; Ulu, A.; Hwang, S.-H.; Chiamvimonvat, N.; Hammock, B. D. Inhibition of soluble epoxide hydrolase enhances the anti-inflammatory effects of aspirin and 5-lipoxygenase activation protein inhibitor in a murine model. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 880–7.
- (19) Gaulton, A.; Bellis, L. J.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Davies, M.; Hersey, A.; Light, Y.; McGlinchey, S.; Michalovich, D.; Al-Lazikani, B.; Overington, J. P. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D1100–7.
- (20) Knox, C.; Law, V.; Jewison, T.; Liu, P.; Ly, S.; Frolkis, A.; Pon, A.; Banco, K.; Mak, C.; Neveu, V.; Djoumbou, Y.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Wishart, D. S. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for “omics” research on drugs. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D1035–41.
- (21) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A “rule of three” for fragment-based lead discovery? *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 876–7.
- (22) Berthold, M. R.; Cebron, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kötter, T.; Meiln, T.; Ohl, P.; Thiel, K.; Wiswedel, B. KNIME: the Konstanz information miner. *ACM SIGKDD Explorations Newsletter* **2009**, *11*, 26.
- (23) Borgelt, C.; Berthold, M. R. In *Proceedings 2002 IEEE International Conference on Data Mining. ICDM*; IEEE Comput. Soc.: Washington, DC, 2002; pp 51–58.
- (24) Rogers, D.; Hahn, M. Extended-connectivity fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 742–54.
- (25) Landrum, G. RDKit: Open-source cheminformatics. <http://www.rdkit.org>.
- (26) Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. Scaffold-Hopping” by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 2894–2896.
- (27) Brungs, M.; Rådmark, O.; Samuelsson, B.; Steinhilber, D. Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 107–111.
- (28) Morisseau, C.; Hammock, B. D. In *Current Protocols in Toxicology*; Bus, J. S., Costa, L. G., Hodgson, E., Lawrence, D. A., Reed, D. J., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2007; pp 33:4.23.1–4.23.18.
- (29) Morphy, R.; Rankovic, Z. Fragments, network biology and designing multiple ligands. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 156–60.
- (30) Stark, H. Turning from monogamy to strategic promiscuity. *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 736–7.

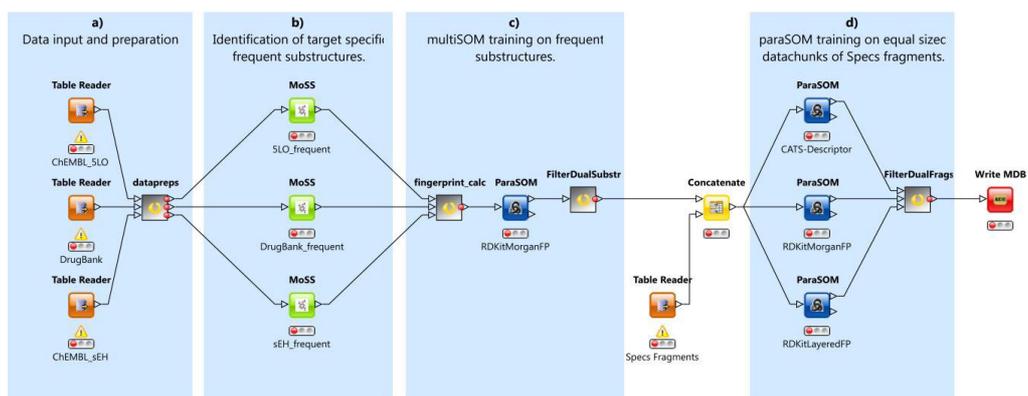
# Exploring the chemical space of multi-target ligands using aligned self-organizing maps.

Janosch Achenbach, Franca-Maria Klingler, René Blöcher, Daniel Moser, Ann-Kathrin Häfner, Carmen Rödl, Simon Kretschmer, Björn Krüger, Frank Löhr, Holger Stark, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber, Ewgenij Proschak\*

## Table of Contents

KNIME-Workflow:.....	2
Data preparation: .....	2
multiSOM screening: .....	2
5-Lipoxygenase enzyme assay:.....	4
Soluble epoxide hydrolase enzyme assay: .....	4
Synthesis of compound 1: .....	5
STD-NMR: .....	7
Analytical data of purchased hits: .....	12
Purchased fragments.....	18
5-LO dual substructures .....	19
sEH dual substructures .....	23

## KNIME-Workflow:



Condensed representation of the applied KNIME workflow. A) Import of the extracted ChEMBL DB compounds and their related affinity data. Only compounds with affinity data of less than 10 $\mu$ M were kept. B) Identification of frequent substructures for each target and the DrugBank compounds respectively. C) Calculation of all fingerprints (CATS, RDKit Morgan and Layered Fingerprint) and training of a multiSOM on the frequent substructures. Afterwards only the potential dual-substructures and the drugbank substructures were kept for the subsequent screening step. D) Screening of similar Specs fragment-like compounds with three ParaSOMs with three different fingerprints. Each ParaSOM represents the parallel training of multiple multiSOMs on the dual substructures, the DrugBank substructures and an equal sized batch of the Specs fragment-like compounds library.

### Data preparation:

All compounds were prepared using the MOE “wash” KNIME node with standard parameters, including protonation and deprotonation of strong bases and acids and removal of lone pairs. All fingerprint (morganFP, layerdFP) and descriptor (CATS-2D) calculations were performed with standard configuration, provided by RDKit and MOE.

### multiSOM screening:

A self-organizing map (SOM), an unsupervised data clustering and visualization technique, is an ordered representation of high dimensional data on a two-dimensional neural network. It can be used to represent and explore the chemical space of a set of compounds described by any kind of high dimensional vector. Our multiSOM approach goes one step further and merges two SOMs in one single map, which combines the data of the primary maps and forms an overlap of the underlying chemical

spaces. The merging of both primary maps is based on an alignment algorithm, which calculates the similarity between each neuron of both maps. The fact that the primary maps have a borderless, toroidal topology makes it possible to shift the first map column- and/or row-wise over the second map and score the current map superposition after each shift. This score is the average similarity between all superposed neurons of both primary maps. Once the optimal alignment is determined, the projected data on each aligned neuron of both maps will be combined in a new neuron. Additionally, the calculated similarity between two aligned neurons will be attached as a third topological dimension (Z-coordinate) to the new neuron. This procedure leads to a new map with a kind of altitude profile. Consequently, high-lying neurons represent a higher similarity between the underlying primary data than lower neurons located on the maps valleys. This property allows an intuitive interpretation of the multiSOM and simplifies the identification of intersections of the primary datasets.

### 5-Lipoxygenase enzyme assay:

Recombinant 5-LO protein was expressed at 22 °C and purified from 1-liter cultures of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with the plasmid pT3-5-LO (YY. Zhang, O. Rådmark, B. Samuelsson, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 1992, 89, 485-489) according to the ATP affinity chromatography procedure as described previously (T. Hammarberg, YY. Zhang, B. Lind, O. Rådmark, B. Samuelsson, FEBS J. 1992, 230, 401-407; T. Hammarberg, P. Provost, B. Persson, O. Rådmark, J. Biol. Chem. 2000, 275, 38787-38793) followed by anion exchange chromatography (Hörnig et al., 2011). For determination of 5-LO activity, 3 µg protein was dissolved in 1 ml of reaction mix (PBS, pH 7.4, 1 mM EDTA, and 1 mM ATP). After pre-incubation with the test compounds or vehicle (DMSO) at the indicated concentrations for 15 min at 4 °C, the samples containing purified 5-LO were pre-warmed for 30 sec at 37 °C. The reaction was started after addition of 2 mM CaCl<sub>2</sub> and 20 µM AA. After 10 min at 37 °C, the reaction was stopped with 1 ml of ice-cold methanol. 30 µl of 1 N HCl, 200 ng of prostaglandin B1 as internal standard and 500 µl of PBS, pH 7.4 were added. 5-LO metabolites were extracted with RP18 solidphase extraction columns (Clean-Up<sup>®</sup> Extraction Column, United Chemical Technologies, Bristol, USA) and analyzed by HPLC as described (M. Brungs, O. Rådmark, B. Samuelsson, D. Steinhilber, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995, 92, 107-111). 5-LO product formation was determined as ng of 5-LO products, which includes all-trans isomers of LTB<sub>4</sub>, 5(S),12(S)-dihydroxy-6,10-trans-8,14-cis-eicosatetraenoic acid (5(S),12(S)-diHETE), and 5(S)-hydro(peroxy)-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraenoic acid (5-H(p)ETE). Each experiment was performed at least three times. Data (mean ± S.E.) are expressed as percentage of control (DMSO).

### Soluble epoxide hydrolase enzyme assay:

sEH assays were performed at room temperature (RT) in black polystyrol 96-well plates using PHOME (3-Phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxy-naphthalen-2-yl)-methyl ester) as substrate (N. M. Wolf, C. Morisseau, P. D. Jones, B. Hock, B. D. Hammock, Anal. Biochem 2006, 355, 71-80). 10 µL of the respective test compound (dissolved in DMSO) at different concentrations in assay buffer (BisTris-HCl buffer (25 mM), 0.1 mg/mL BSA, 0.01 % Triton X-100, pH 7.0) were incubated with 100 µL of enzyme in assay buffer for 15 minutes at RT. The assay was performed in advance for normalization without inhibitors to determine the necessary amount of sEH to obtain about 1000 RFU (relative fluorescence units) after 15 minutes of measurement Subsequent to the incubation, 10 µL PHOME was added (final concentration 50 µM) and the increase in fluorescence was measured instantly over the next 30 minutes every minute. The increase of fluorescence during this time gives the activity of sEH in ΔRFU/min. The different activities of inhibited and not inhibited protein compared to the well without protein give the inhibition of the enzyme as follows (Eq. 1)

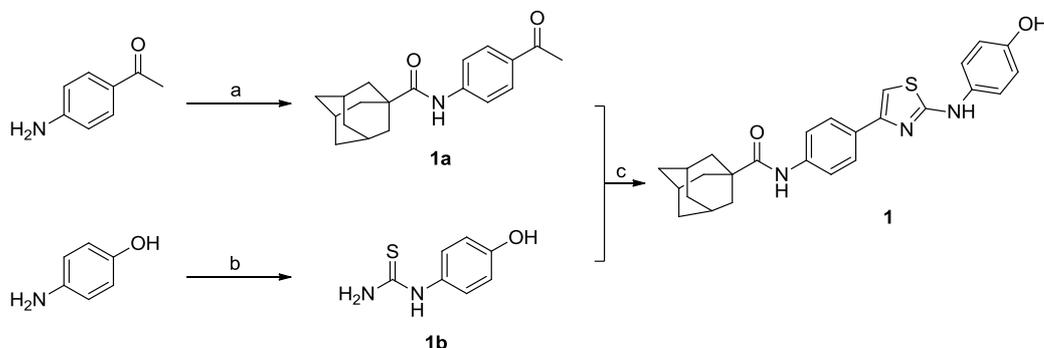
$$\text{Inhibition [\%]} = 100 \times \left[ 1 - \frac{V_i - V_b}{V_t - V_b} \right] \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $V_i$  is the velocity obtained in the presence of an inhibitor (i);  $V_b$  is the velocity obtained for the blank (b) control; and  $V_t$  is the velocity obtained for the total activity (t) control (no inhibitor). The linearity of the reaction rate was checked.

IC<sub>50</sub> determination: IC<sub>50</sub> values were determined using a sigmoidal dose response (variable slope) equation from GraphPad Prism 5<sup>®</sup> (GraphPad Software, LaJolla, USA) software.

## Synthesis of compound 1:

Please, find enclosed a brief description of the synthetic procedure and the corresponding analytics:



### a. *N*-(4-Acetylphenyl)adamantane-1-carboxamide **1a**

*p*-Aminoacetophenone (0.68 g (5.03 mmol)) and 1.00 g (5.03 mmol) adamantane-1-carbonyl chloride were refluxed in 40 ml anhydrous dioxane with 0.40 g (5.03 mmol) anhydrous pyridine under argon overnight. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The dry residue was resolved in 100 ml dichloromethane and washed with 100 ml water. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure, yielding 1.13 g (75%) of the intermediate **1a** as a light brown solid. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sup>6</sup>): δ 9.45 (s, 1H, NH-C=O), 7.93 (d, *J* = 8.9, 2H, NH-Ph-3-H, -5-H), 7.84 (d, *J* = 8.9, 2H, NH-Ph-2-H, -6-H), 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (m, 3H, Ada-3-H), 1.95 (d, 6H, Ada-2-H), 1.72 (t, 6H, Ada-4-H).

### b. (4-Hydroxyphenyl)thiourea **1b**

Ammonium isothiocyanate (1.55 g (20.4 mmol)) were dissolved in anhydrous acetone under argon atmosphere. 2.58g (18.4 mmol) benzoyl chloride were slowly added and refluxed 3h. 2.00g (18.4 mmol) 4-aminophenol were added and refluxed for one additional hour. The mixture was poured in a beaker with ice. The precipitate was washed with water/methanol (1:1) and stirred in 2N NaOH for 20 min at 80°C. Afterwards the mixture was poured in a beaker with ice and acidified with 5N HCl. The resulting precipitate was filtered, washed with water and dried under reduced pressure, yielding 1,60 g (52%) of a light yellow solid **1b**. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sup>6</sup>): δ 12.93 (s, 1H, NH<sub>2</sub>-C=S-NH), 9.42 (s, 2H, NH<sub>2</sub>-C=S-NH), 9.38 (s, 1H, Ph-OH), 7.06 (d, *J* = 8.6, 2H, NH-Ph-3-H, -5-H), 6.71 (d, *J* = 8.9, 2H, NH-Ph-2-H, -6-H).

### c. *N*-(4-{2-[(4-Hydroxyphenyl)amino]-1,3-thiazol-4-yl}phenyl)adamantane-1-carboxamide **1**

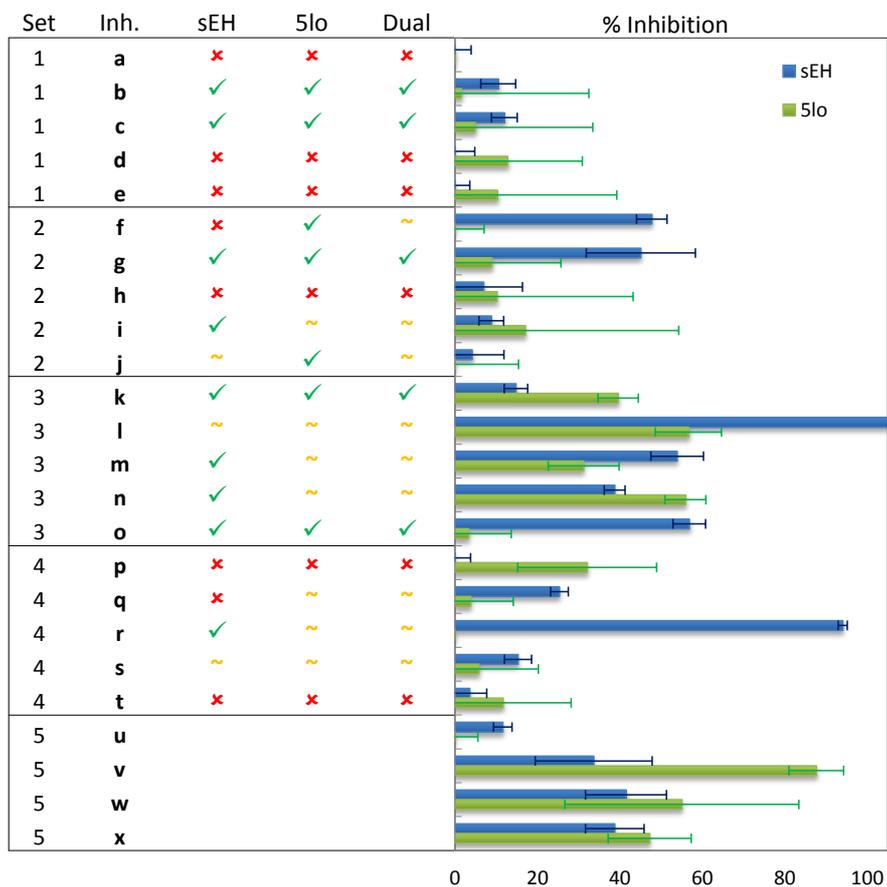
The precursor **1a** (1.00 g (3.36 mmol)) was stirred with 0.54 g (3.36 mmol) bromine in 40 ml of chloroform until decolorization and then the solvent was removed under reduced pressure at ambient

temperature. The resulting oil was directly used for reaction with 0.38 g (2.23 mmol) **1b**, which was accomplished under reflux in ethanol for 3 hours. The precipitating product was dissolved in 50 ml of ethyl acetate and washed with aqueous ammonium hydroxide solution (12.5% NH<sub>3</sub> (m/m)), yielding 0.33 g (32%) of the monohydrate of **1** as a brown solid. <sup>1</sup>H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sup>6</sup>): δ 9.86 (s, 1H, -NH-), 9.12 (s, 1H, -OH), 7.73 (d, *J* = 8.8, 2H, Amid-Ph-2-*H*, -6-*H*), 7.64 (d, *J* = 8.8, 2H, Amid-Ph-3-*H*, -5-*H*), 7.40 (d, *J* = 8.9, 2H, OH-Ph-3-*H*, -5-*H*), 7.03 (s, 1H, Thiazol-5-*H*), 6.70 (d, *J* = 8.9, 2H, OH-Ph-2-*H*, -6-*H*), 1.96 (m, 3H, Ada-3-*H*), 1.87 (d, 6H, Ada-2-*H*), 1.65 (t, 6H, Ada-4-*H*). <sup>13</sup>C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*<sup>6</sup>): δ 175.9 (C=O), 164.5 (Thiazol-2-*C*), 152.6 (Thiazol-4-*C*), 149.7 (OH-Ph-1-*C*), 138.9 (Amid-Ph-1-*C*), 133.3 (OH-Ph-4-*C*), 129.6 (Amid-Ph-4-*C*), 125.8 (Amid-Ph-3-*C*, -5-*C*), 120.2 (OH-Ph-3-*C*, -5-*C*), 119.7 (Amid-Ph-2-*C*, -6-*C*), 115.6 (OH-Ph-2-*C*, -6-*C*), 100.6 (Thiazol-5-*C*), 38.8 (Ada-2-*C*), 38.3 (Ada-1-*C*), 36.0 (Ada-4-*C*), 27.7 (Ada-3-*C*). ESI-MS (*m/z*): 446.5 [M+H<sup>+</sup>] (100%). Elemental analysis (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S\*H<sub>2</sub>O) found (calculated) C 67.36% (67.59%), H 6.31% (6.29%), N 9.06% (9.01%), S 6.92% (6.99%)

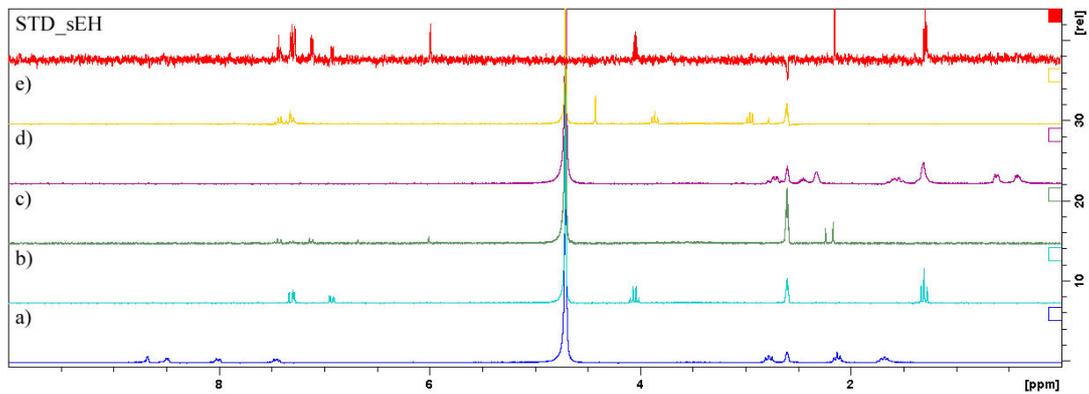
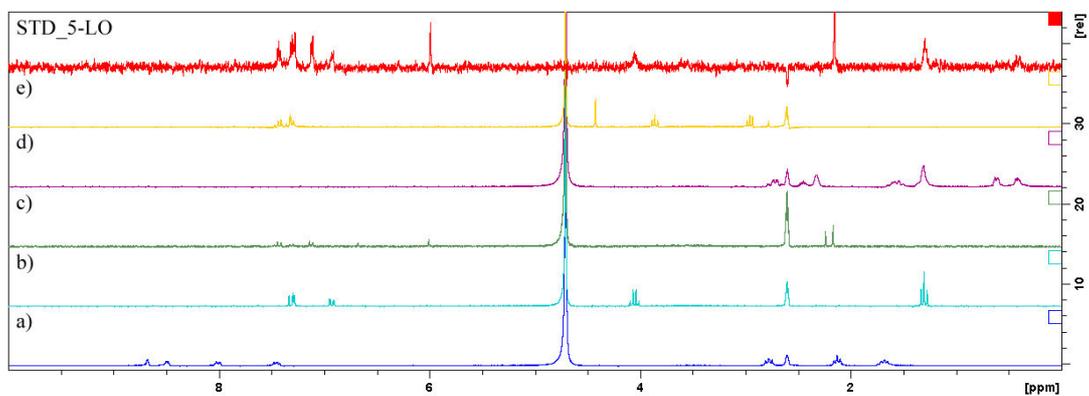
### STD-NMR:

Protein concentration was increased with 10 ml “Amicon stirred cells” (MILLIPORE, Schwalbach/Ts., Germany) with regenerated cellulose ultrafiltration membrane (10 kDa cut-off). The protein was transferred into a deuterated phosphate buffer (50 mM) of 25 mM Na<sub>2</sub>DPO<sub>4</sub> and 25 mM D<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> in D<sub>2</sub>O, pD 7.5 with 0.05 mM DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) standard. The inhibitors were tested at a concentration of 400 μM. The STD experiments were performed at 600 MHz on a Bruker AvIII spectrometer equipped with a <sup>1</sup>H{<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N} cryogenic triple-resonance probe. Residual water resonances were suppressed with the excitation sculpting method. Frequencies for ON and OFF irradiation were set at 0.3 and 21.4 ppm, respectively. Saturation was achieved in a total period of 2s using trains of 50-ms Gaussian pulses (1% truncation) with flip angles of 135°.

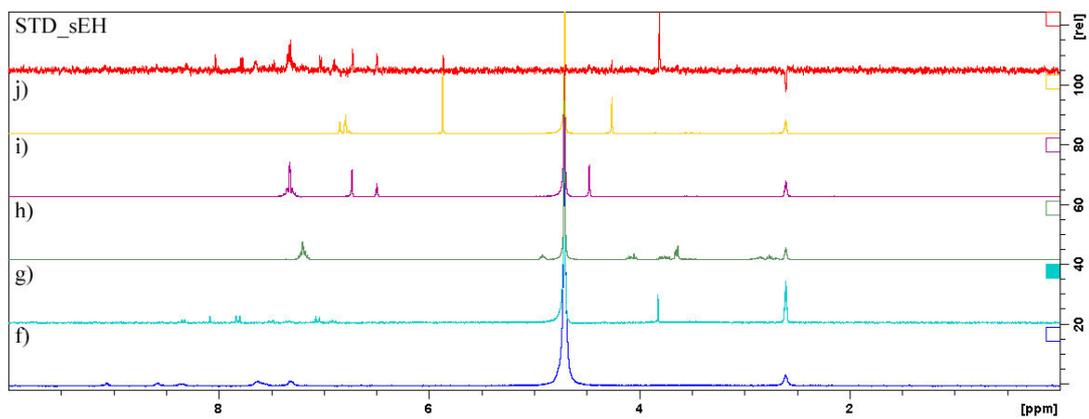
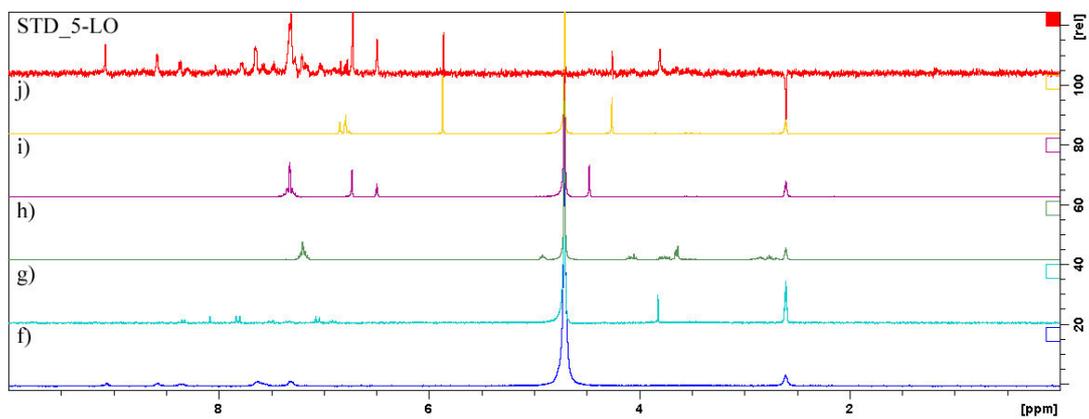
Summary Table of the STD-NMR experiments in comparison to the inhibition of all compounds at a single concentration of 100 μM in the functional assay systems.



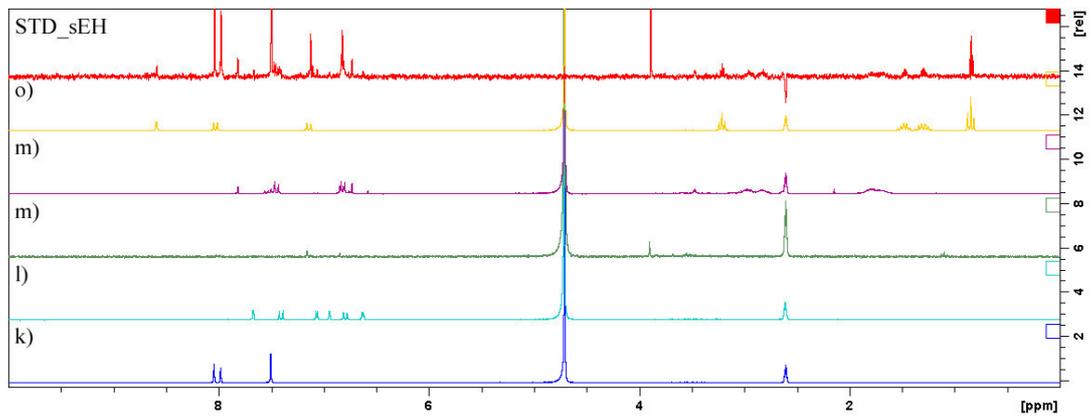
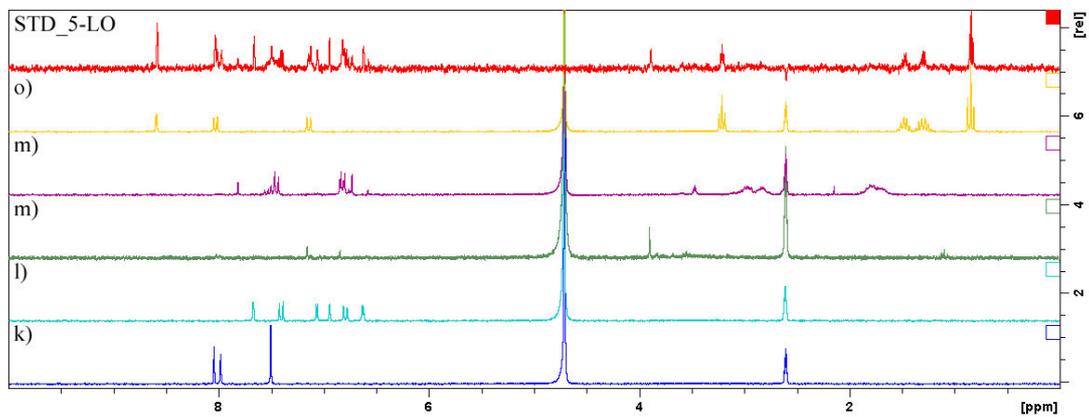
STD-NMR Set 1 (compound a-e) stacked spectra:



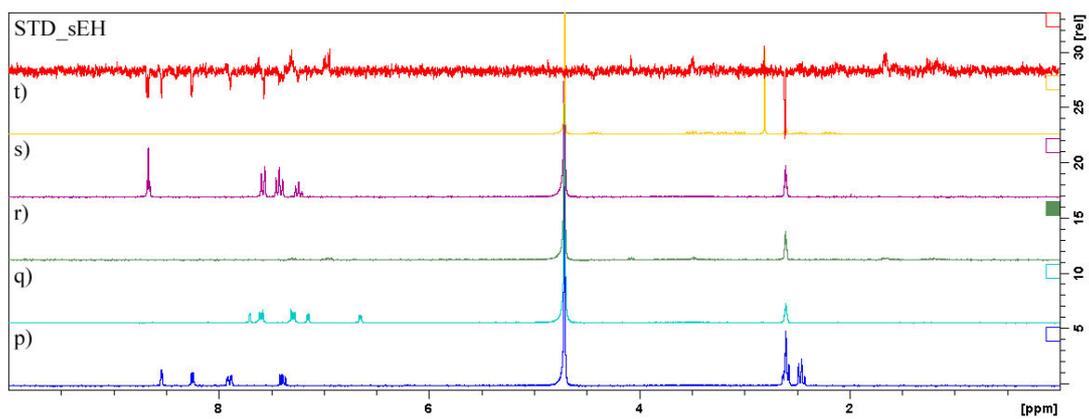
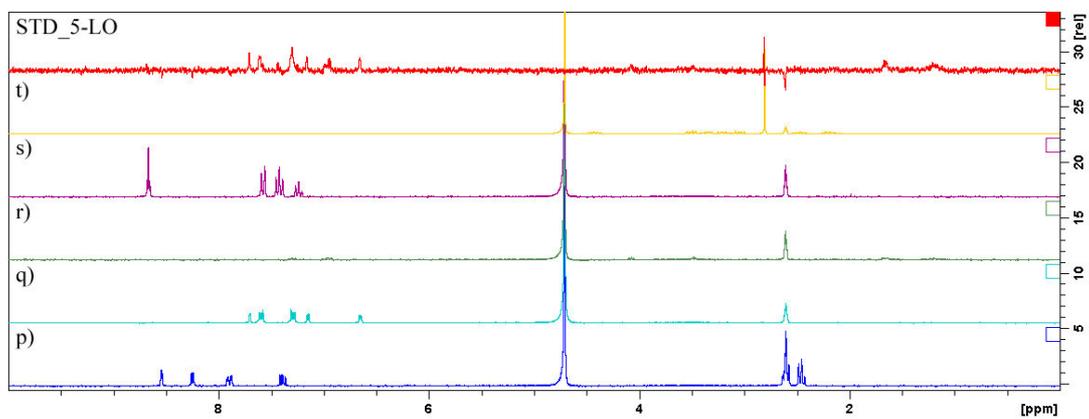
STD-NMR Set 2 (compound f-j) stacked spectra:



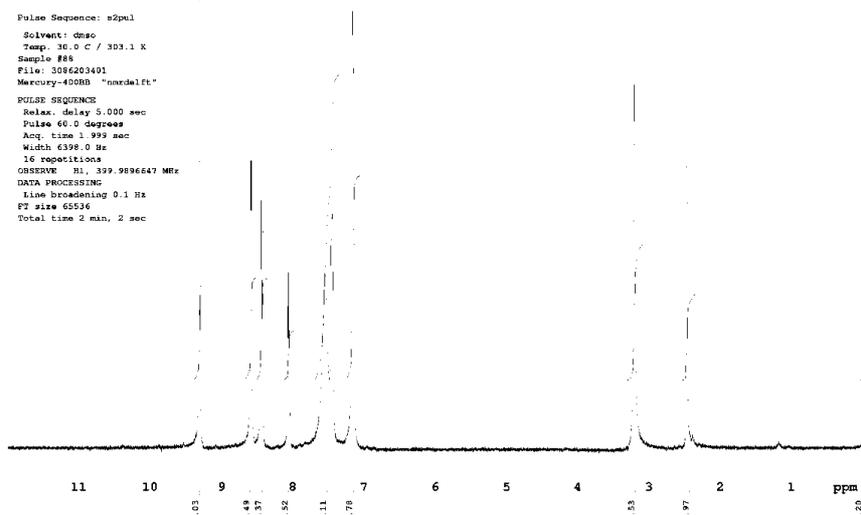
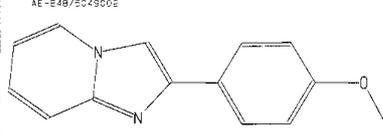
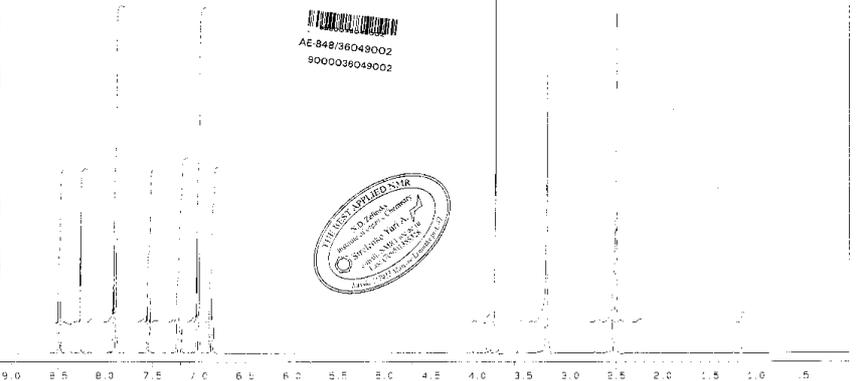
STD-NMR Set 3 (compound **k-o**) stacked spectra:

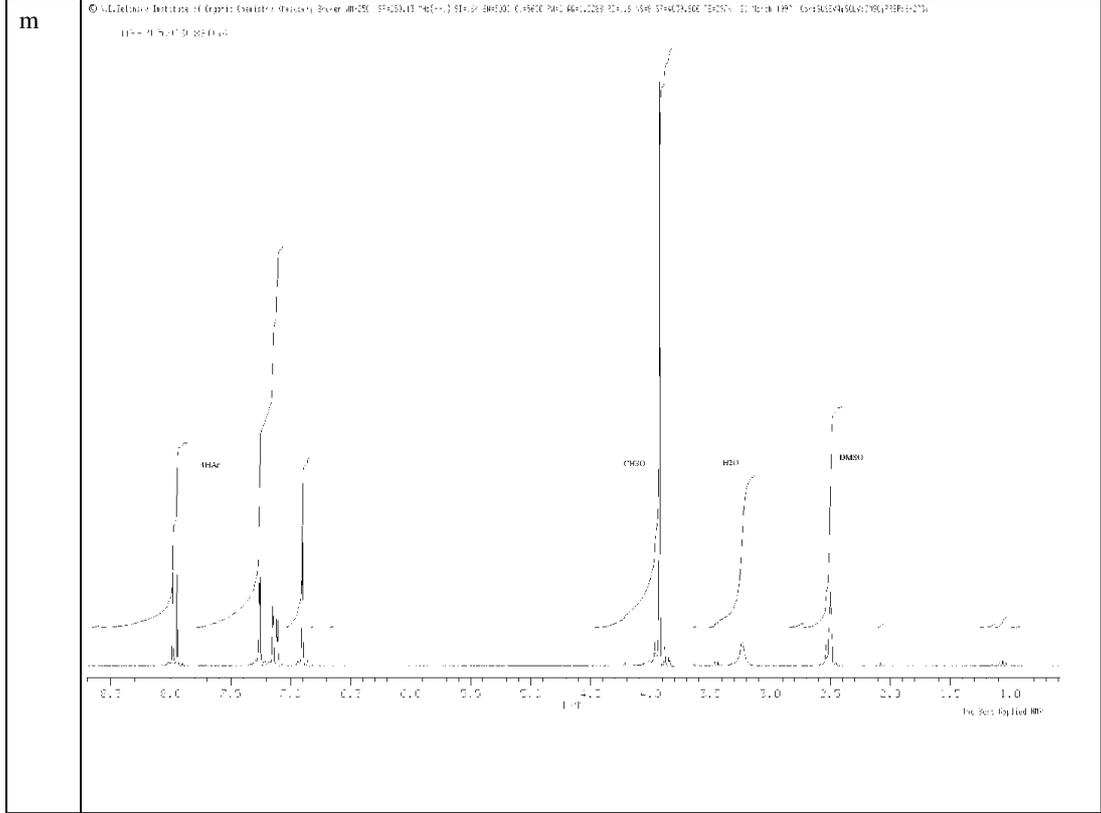
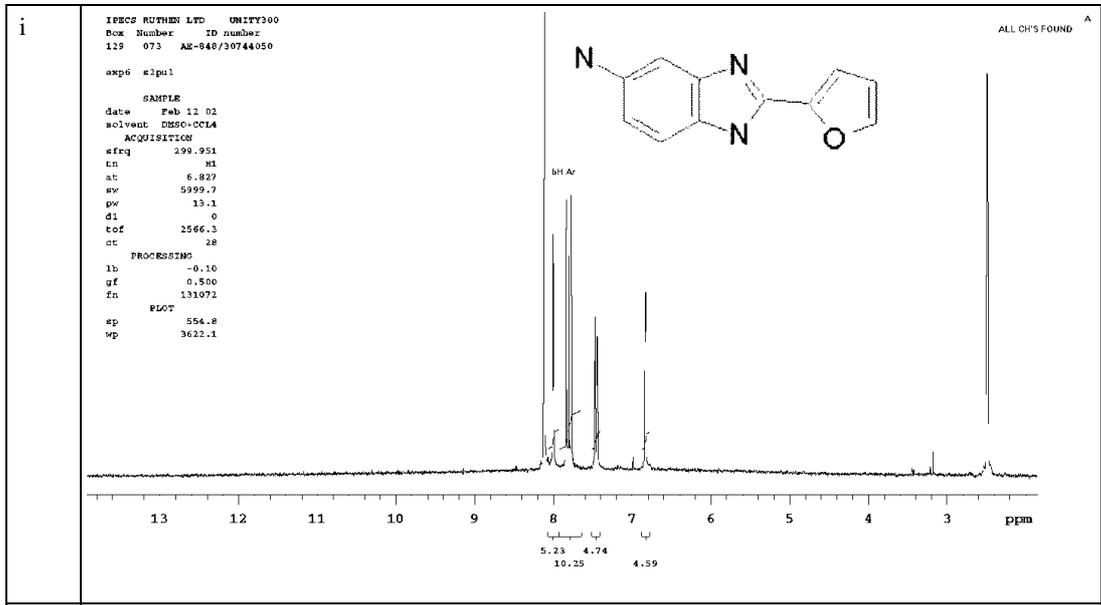


STD-NMR Set 4 (compound **p-t**) stacked spectra:



Analytical data of purchased hits:

Cpd.	Data (1H NMR or LCMS)
f	<p>SPECS and BioSPECS B.V. <span style="float: right;">Date: Sat May 4, 2002</span></p> <p>30962034 STANDARD 1H OBSERVE</p> <p>SPECS and BioSPECS</p> <p>Pulse Sequence: s2pul</p> <p>Solvent: dmsc Temp: 30.0 C / 303.1 K Sample #88 File: 3096203401 Mercury-400MB "nordel.ft"</p> <p>PULSE SEQUENCE Relax: delay 5.000 sec Pulse 60.0 degrees Acq: time 1.999 sec Width 6398.0 Hz 16 repetitions</p> <p>OBSERVE H1, 399.989647 MHz</p> <p>DATA PROCESSING Line broadening 0.1 Hz SI size 65536 Total time 2 min, 2 sec</p>  <p>11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 ppm</p> <p>9.03 8.49 8.37 8.32 7.81 7.78 7.75 3.23 7.97</p> <p>Varian NMR Spectrometer Mercury 400 MHz SPECS and BioSPECS B.V., Fleminglaan 16, 2289 CB, Rijswijk, The Netherlands, Tel: +31703190019, Fax: +31703190011, Internet: www.specs.net</p>
0c	<p>AE-B48/36049002</p>  <p>AE-B48/36049002 9000036049002</p>  <p>9.03 8.49 8.37 8.32 7.81 7.78 7.75 3.23 7.97</p> <p>THE BEST APPLIED NMR SPECS and BioSPECS B.V. Fleminglaan 16 2289 CB Rijswijk The Netherlands Tel: +31703190019 Fax: +31703190011 Internet: www.specs.net</p>



n

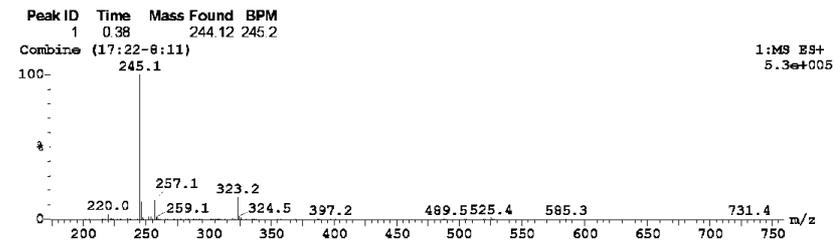
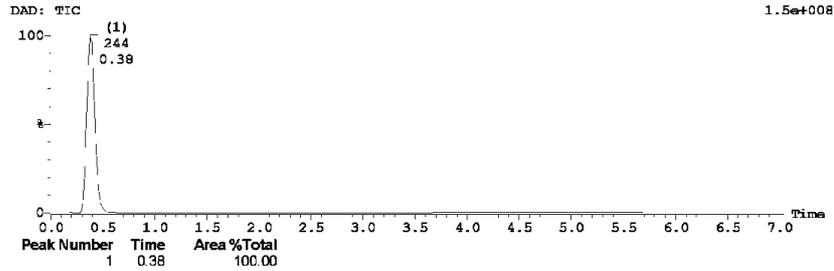
SPECS and BioSPECS B.V., The Netherlands  
 File: 9910115227013 ID: AH-262/15227013  
 Vial: 2:3 Date: 24-Aug-2000

Description: C14H16N2O2  
 Time: 08:28:09

Page 135

Printed: Wed Sep 06 12:09:43 2000

Sample Report (continued):



O

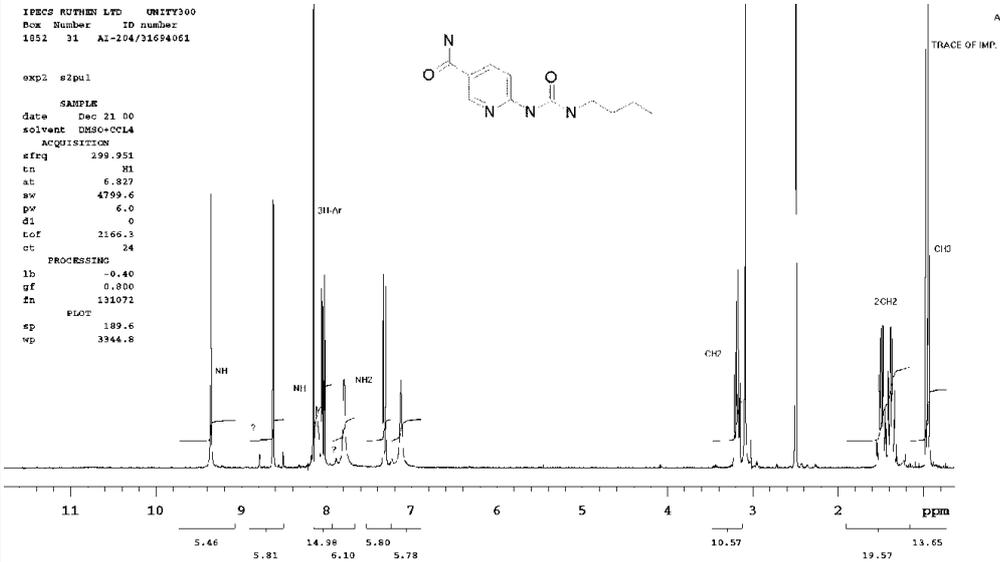
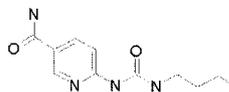
IFPCS RUTHEN LTD UNITY300  
 Box Number ID number  
 1852 31 AI-204/31694061

exp2 s2pul

SAMPLE  
 date Dec 21 00  
 solvent DMSO-d6  
 ACQUISITION  
 freq 299.951  
 tn H1  
 at 6.827  
 sw 4799.6  
 pv 6.0  
 d1 0  
 tof 2166.3  
 ct 24

PROCESSING  
 lb -0.40  
 gf 0.800  
 fn 131072

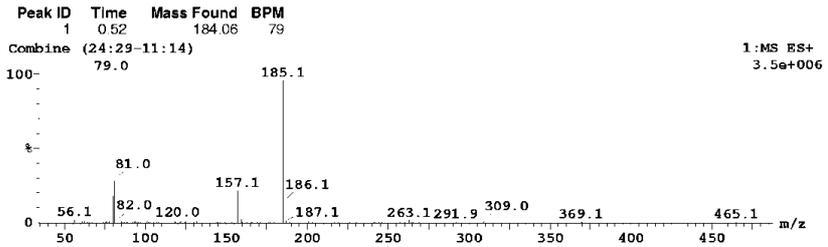
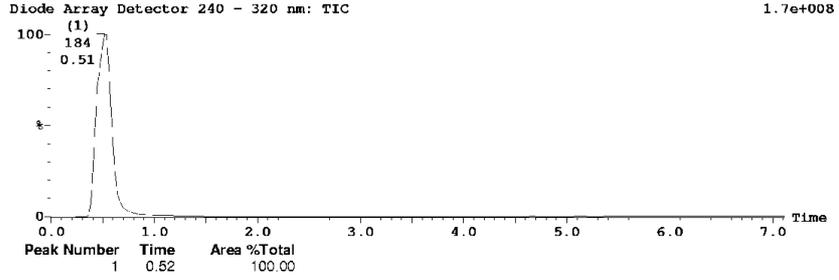
PLOT  
 sp 189.6  
 wp 3944.8



q

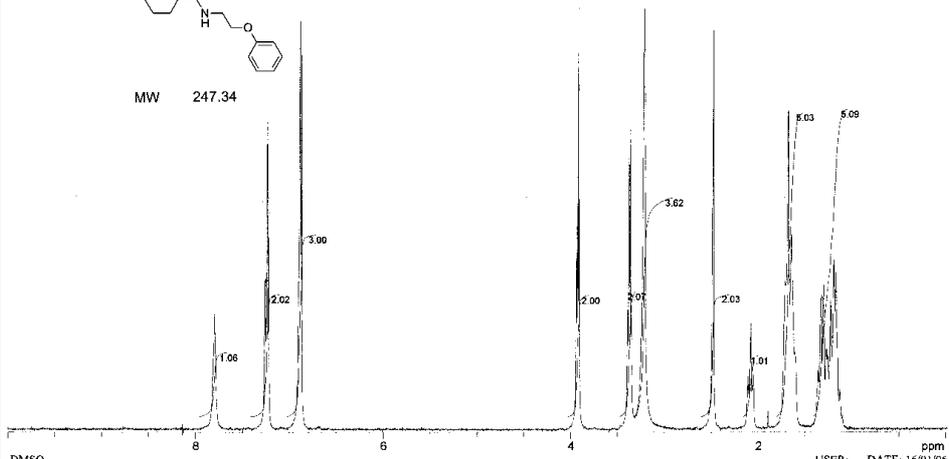
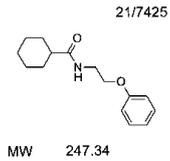
Specs File: 9920102605022 ID: AO-289/02605022 Description: C11H8N2O Page 12  
 Instrument: LC/MS B Vial: 2.12 Date: 24-Aug-2004  
 Printed: Thu Aug 26 16:46:07 2004

Sample Report (continued):



r

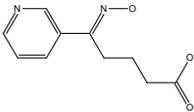
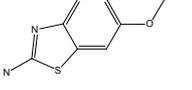
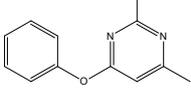
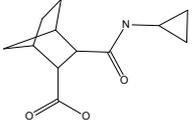
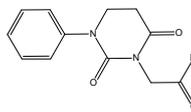
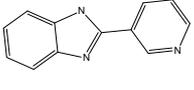
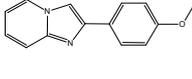
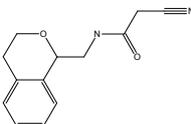
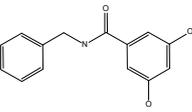
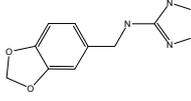
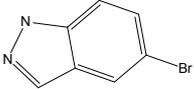
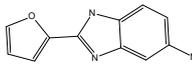
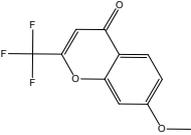
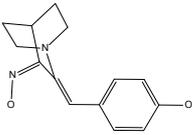
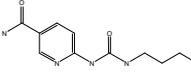
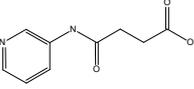
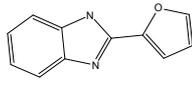
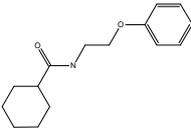
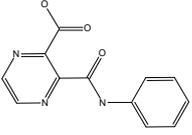
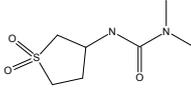
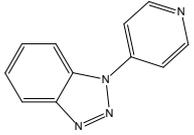
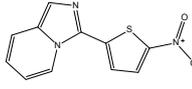
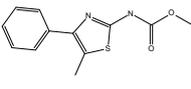
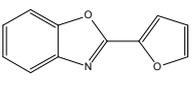
AO-080/05987017 21/7425

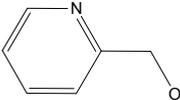
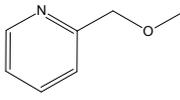
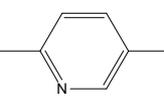
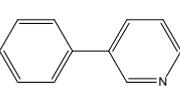
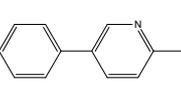
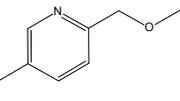
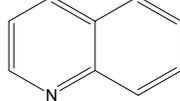
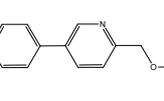
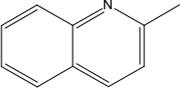
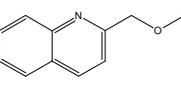
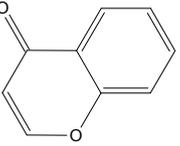
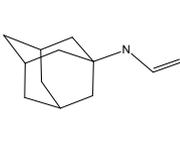
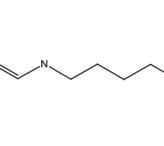
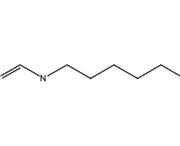
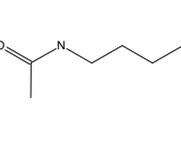
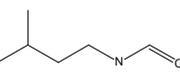
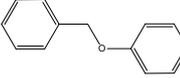
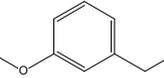
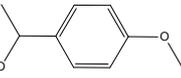
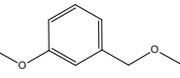
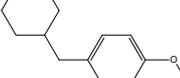
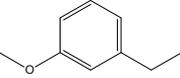
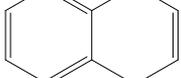
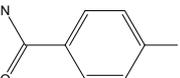
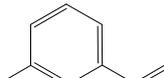
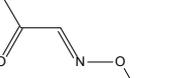
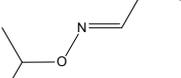


DMSO	SW1: 8065	OF1: 3506.1	PTSId: 8192	USER:	DATE: 16/01/06
FL: 400.141	PW: 3.0 usec	PD: 20.0 sec	NA: 16	LB: 0.0	Nuts32 - \$V71425.021

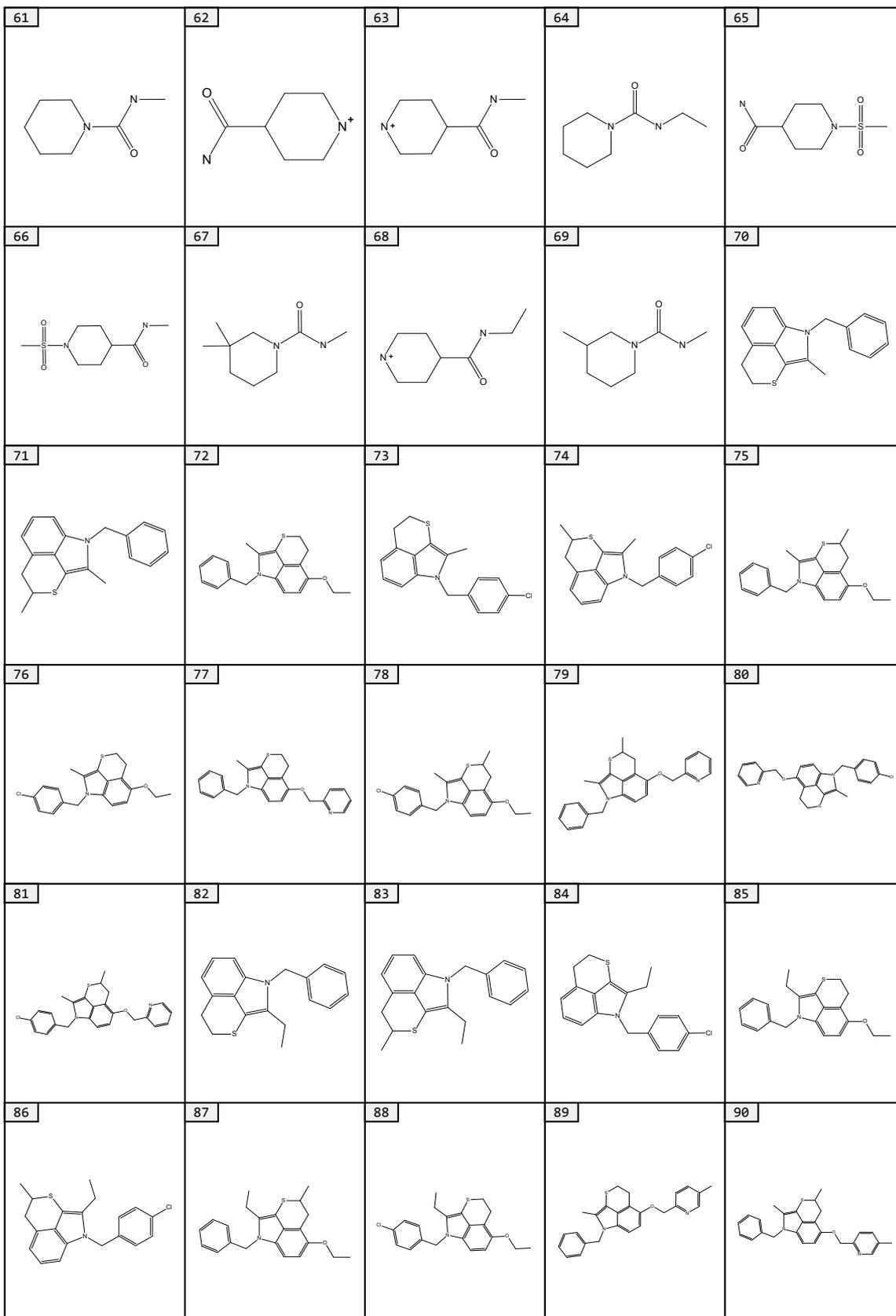


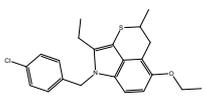
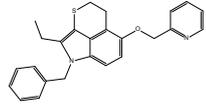
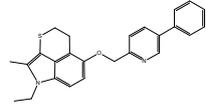
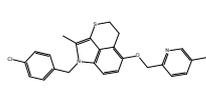
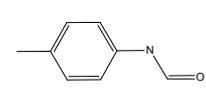
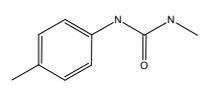
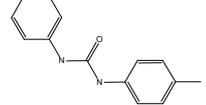
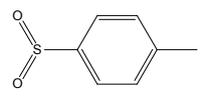
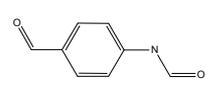
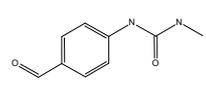
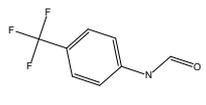
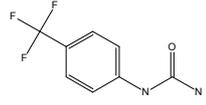
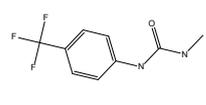
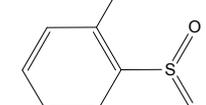
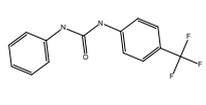
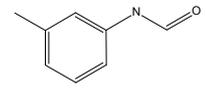
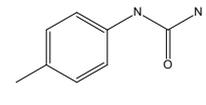
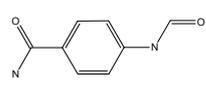
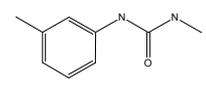
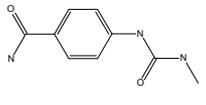
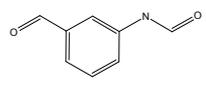
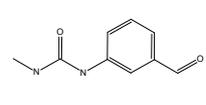


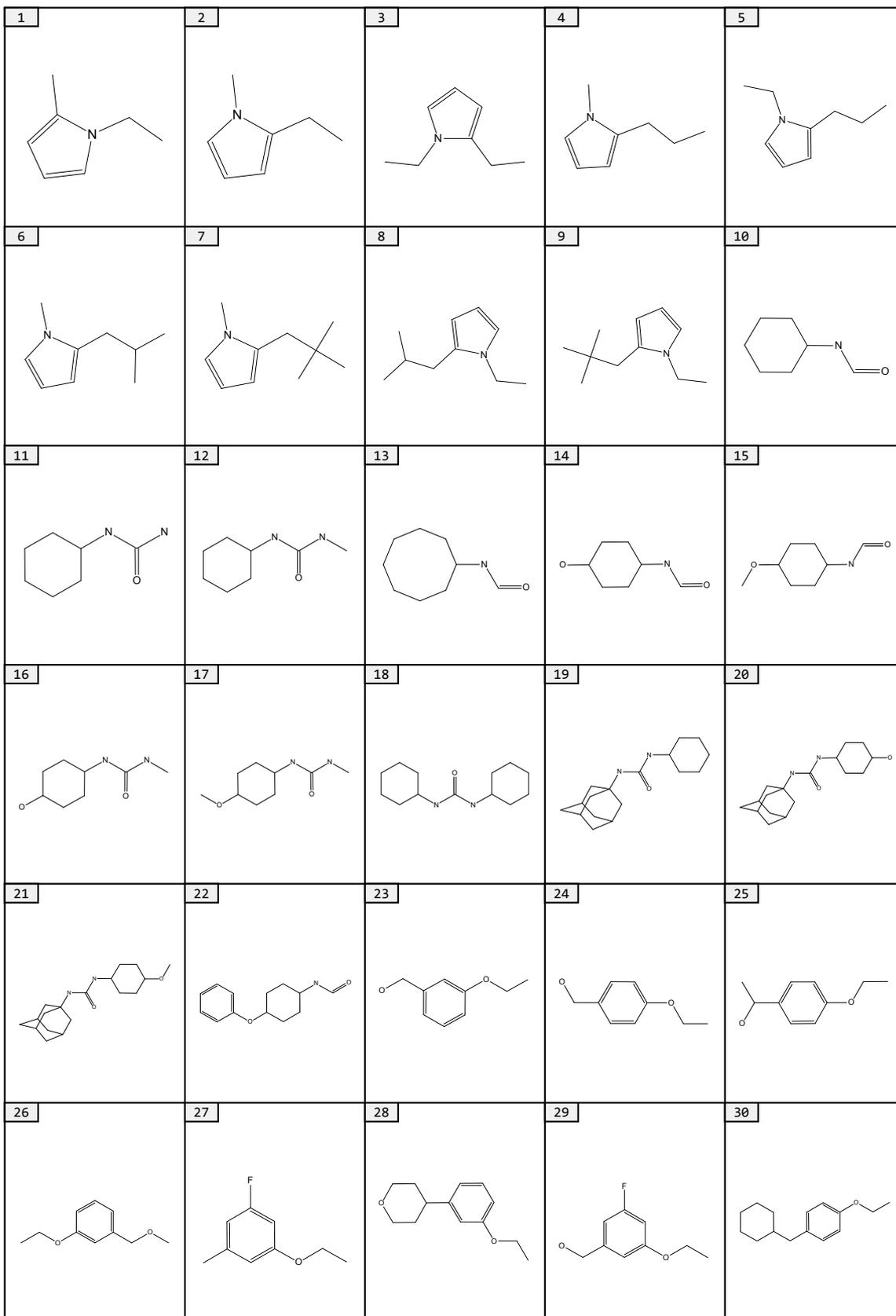
<p><b>ID: a</b></p>  <p>AC-907/34128018</p>	<p><b>ID: b</b></p>  <p>AE-641/00784023</p>	<p><b>ID: c</b></p>  <p>AG-670/25003526</p>	<p><b>ID: d</b></p>  <p>AK-968/40946440</p>	<p><b>ID: e</b></p>  <p>AQ-099/42182035</p>
<p><b>ID: f</b></p>  <p>AE-848/30862034</p>	<p><b>ID: g</b></p>  <p>AE-848/36049002</p>	<p><b>ID: h</b></p>  <p>AJ-292/12783025</p>	<p><b>ID: i</b></p>  <p>AK-087/42718422</p>	<p><b>ID: j</b></p>  <p>AK-968/11988197</p>
<p><b>ID: k</b></p>  <p>AE-848/30721012</p>	<p><b>ID: l</b></p>  <p>AE-848/30744050</p>	<p><b>ID: m</b></p>  <p>AF-407/03086044</p>	<p><b>ID: n</b></p>  <p>AH-262/15227013</p>	<p><b>ID: o</b></p>  <p>AI-204/31694061</p>
<p><b>ID: p</b></p>  <p>AE-473/30501047</p>	<p><b>ID: q</b></p>  <p>AE-641/02605022</p>	<p><b>ID: r</b></p>  <p>AG-205/05987017</p>	<p><b>ID: s</b></p>  <p>AG-690/33357054</p>	<p><b>ID: t</b></p>  <p>AG-690/33371056</p>
<p><b>ID: u</b></p>  <p>AE-641/30607008</p>	<p><b>ID: v</b></p>  <p>AI-204/41491646</p>	<p><b>ID: w</b></p>  <p>AK-968/11987510</p>	<p><b>ID: x</b></p>  <p>AN-979/15448051</p>	

1		2		3		4		5	
6		7		8		9		10	
11		12		13		14		15	
16		17		18		19		20	
21		22		23		24		25	
26		27		28		29		30	

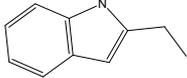
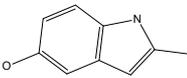
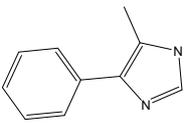
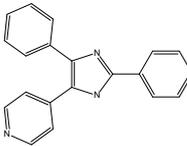
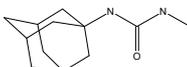
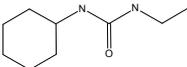
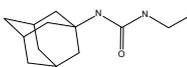
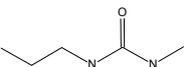
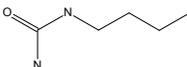
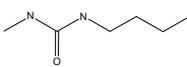
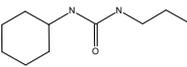
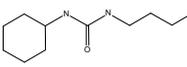
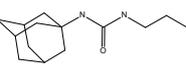
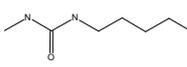
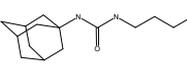
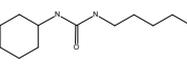
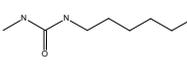
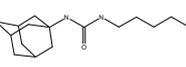
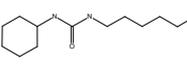
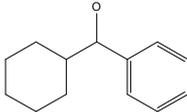
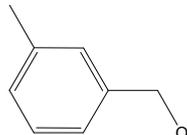
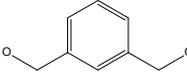
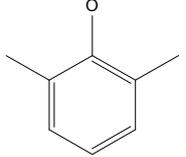
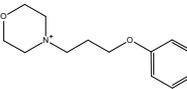
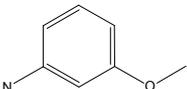
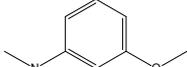
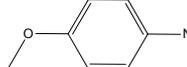
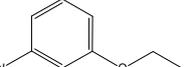
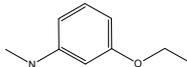
<p>31</p>	<p>32</p>	<p>33</p>	<p>34</p>	<p>35</p>
<p>36</p>	<p>37</p>	<p>38</p>	<p>39</p>	<p>40</p>
<p>41</p>	<p>42</p>	<p>43</p>	<p>44</p>	<p>45</p>
<p>46</p>	<p>47</p>	<p>48</p>	<p>49</p>	<p>50</p>
<p>51</p>	<p>52</p>	<p>53</p>	<p>54</p>	<p>55</p>
<p>56</p>	<p>57</p>	<p>58</p>	<p>59</p>	<p>60</p>

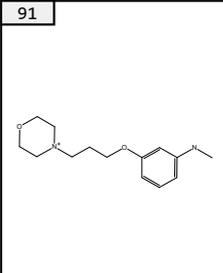
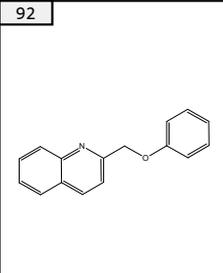
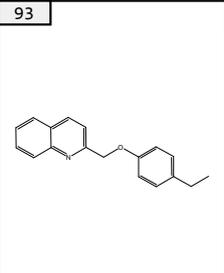
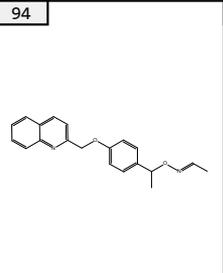
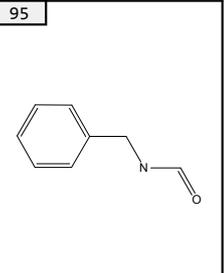
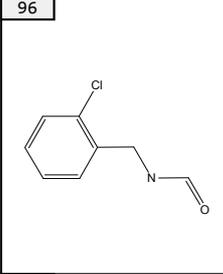
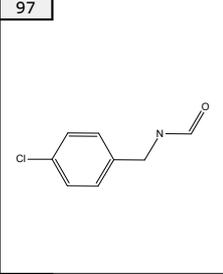
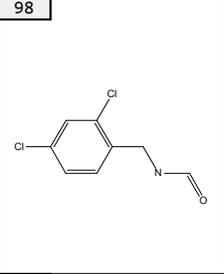
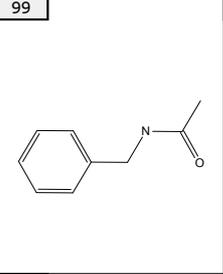
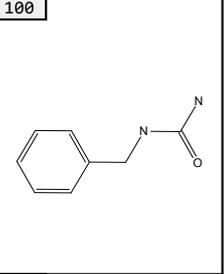
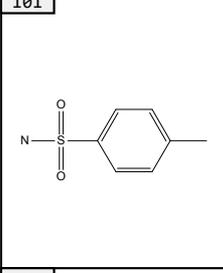
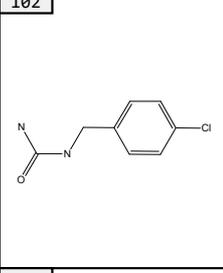
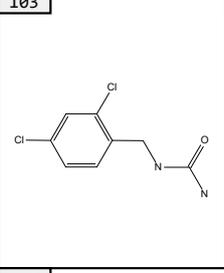
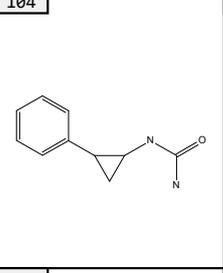
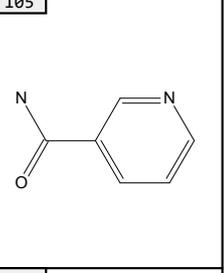
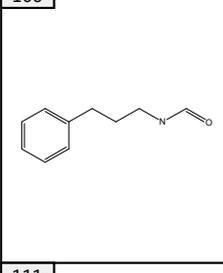
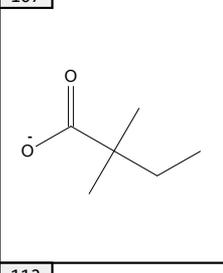
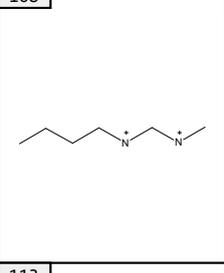
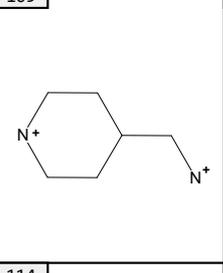
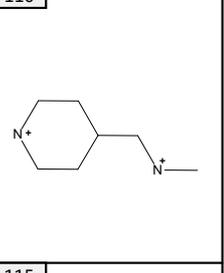
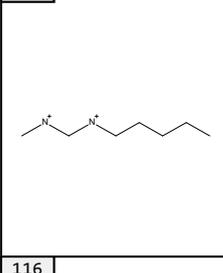
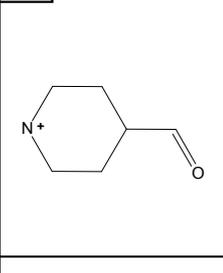
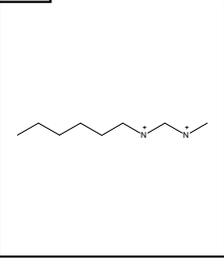
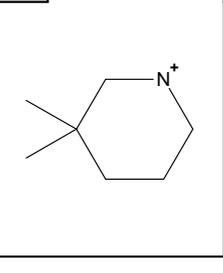
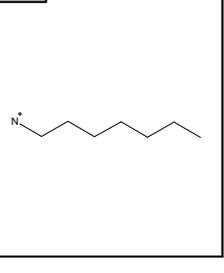
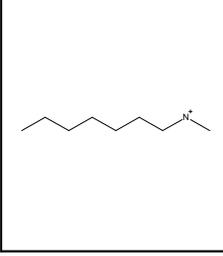


<p>91</p> 	<p>92</p> 	<p>93</p> 	<p>94</p> 	<p>95</p> 
<p>96</p> 	<p>97</p> 	<p>98</p> 	<p>99</p> 	<p>100</p> 
<p>101</p> 	<p>102</p> 	<p>103</p> 	<p>104</p> 	<p>105</p> 
<p>106</p> 	<p>107</p> 	<p>108</p> 	<p>109</p> 	<p>110</p> 
<p>111</p> 	<p>112</p> 	<p>113</p> 		



31		32		33		34		35	
36		37		38		39		40	
41		42		43		44		45	
46		47		48		49		50	
51		52		53		54		55	
56		57		58		59		60	

61	62	63	64	65
				
66	67	68	69	70
				
71	72	73	74	75
				
76	77	78	79	80
				
81	82	83	84	85
				
86	87	88	89	90
				

91	92	93	94	95
				
96	97	98	99	100
				
101	102	103	104	105
				
106	107	108	109	110
				
111	112	113	114	115
				
116				
				



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochempharm](http://www.elsevier.com/locate/biochempharm)



## Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity

Ramona Steri<sup>1</sup>, Janosch Achenbach<sup>1</sup>, Dieter Steinhilber, Manfred Schubert-Zsilavecz, Ewgenij Proschak\*

*Institute of Pharmaceutical Chemistry, ZAFES/LiFF/Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438 Frankfurt/Main, Germany*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 January 2012  
Accepted 28 February 2012  
Available online xxx

#### Keywords:

Farnesoid X receptor  
Self-organizing maps  
Imatinib  
Virtual screening  
Antidiabetic compounds  
Drug repurposing

### ABSTRACT

A self-organizing map (SOM) is a virtual screening method used for correlation of molecular structure and potential biological activity on a certain target and offers a way to represent multi-dimensional data of large databases in a two-dimensional space. Large databases, for example the DrugBank database, provide information about biological activity and chemical structure of small molecules and are widely used in drug development for identification of new lead structures.

The farnesoid X receptor (FXR) is a ligand activated transcription factor involved in key regulation mechanisms within glucose and lipid homeostasis. Although FXR became an established target in drug development for diseases associated with lipid, glucose or hepatic disorders during the last decade, none of the developed compounds have reached later phases of clinical development so far.

We used a SOM trained with known FXR ligands to screen the DrugBank database for potential ligands for FXR. In this article, we report the successful identification of six approved drugs out of the DrugBank as FXR modulators (ketoconazole, pentamidine, dobutamine, imatinib, papaverine and montelukast) by using a SOM for screening of the DrugBank database. We show FXR modulation by selected compounds in a full length FXR transactivation assay and modulation of a FXR target gene by imatinib.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

As mentioned by the Nobel Prize laureate James Black, "the most fruitful basis of the discovery of a new drug is to start with an old drug" [1], thus recognition and selective optimization of side activities (SOSA approach) of approved drugs lead to discovery of several new drugs. This approach, as proposed by Wermuth, consists of two steps: screening of a limited number of drug molecules and optimization of hits using the existing methods of medicinal chemistry [2]. Approved drugs exhibit favorable pharmacokinetic and toxicological properties; furthermore, almost every drug exhibits (undesired) interaction with secondary targets, which can be optimized toward new lead structures for these targets. In the development of antidiabetics, SOSA has already played an important

role: the class of antidiabetic sulfonylurea represented by tolbutamide originates from antimicrobial sulcarbamide, which caused hypoglycemic convulsions in clinics [3]. In this study we investigated compounds approved by the FDA as potential starting points for SOSA for development of novel antidiabetics. We have chosen farnesoid X receptor (FXR) as a promising target in the field of metabolic syndrome with glucose-lowering properties. FXR is a ligand-activated transcription factor, which plays a crucial role within bile acid, glucose and lipid homeostasis [4]. These metabolic effects are mainly caused by upregulation of another transcription factor, the small heterodimer partner (SHP), which itself regulates the expression of several key genes within gluconeogenesis (for example phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) or lipid metabolism (for example sterol regulatory element binding protein 1c) [5]. In the last decade, FXR became an attractive drug target to treat diseases like diabetes mellitus, dyslipidemia or hepatic disorders like non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Much effort in academia and pharmaceutical industry was made to develop FXR ligands, but until now few compounds have reached early phases of clinical development. Most FXR ligands have not been further developed due to toxicological or pharmacokinetic issues, so that to date only INT-747 is reported to be in clinical phase II for the treatment of NASH (press release Intercept Pharmaceuticals, [www.intercept-pharma.com](http://www.intercept-pharma.com)).

We have chosen an in silico approach to identify approved drugs with potential to modulate FXR [38]. A self-organizing map

*Abbreviations:* CATS2D, chemically advanced template search 2D; CDCA, chenodeoxycholic acid; CHF, congestive heart failure; CML, chronic myeloid leukemia; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; DMEM, Dulbeccó's modified eagle medium; DMSO, dimethylsulfoxide; FCS, fetal calf serum; FXR, farnesoid X receptor; GIST, gastrointestinal stromal tumors; PCR, polymerase chain reaction; PPAR, peroxisome-proliferator activated receptor; PS, penicillin/streptomycin; qPCR, quantitative PCR; SOM, self-organizing map; SHP, small heterodimer partner; SP, sodium pyruvate; SSRI, selective serotonin reuptake inhibitor; PDE, phosphodiesterase; SERM, selective estrogen receptor modulator.

\* Corresponding author. Tel.: +49 69 79829301; fax: +49 69 79829332.

E-mail address: [proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de](mailto:proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de) (E. Proschak).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

0006-2952/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.bcp.2012.02.027

Please cite this article in press as: Steri R, et al. Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity. *Biochem Pharmacol* (2012), doi:10.1016/j.bcp.2012.02.027

(SOM) algorithm [6] has been employed broadly for correlation of molecular structure and biological activity [7]. SOMs offer a way to project multi-dimensional data on a two-dimensional grid, which represents a better interpretable visualization of the input data space. Similar data points, in this case molecular structures, are projected on topological nearby or even the same neurons. This leads to a clustering of chemical compounds that share similar pharmacophore features, represented by the CATS2D-descriptor, on common neurons. Under the assumption that similar molecules exhibit similar biological activities [8], a SOM provides a suitable approach to identify biological related molecules within a large chemical space. During the training process of a SOM only chemical properties are considered, while the biological activity remains disregarded. Once trained, the SOM returns a two-dimensional representation of the chemical space, a map projection where similar chemical structures were clustered in nearby regions. We used known ligands of the farnesoid X receptor (FXR) together with the DrugBank database [9] to train the SOM and considered compounds from the DrugBank database which were projected to the same neurons as the known FXR ligands as potentially active. We manually chose a set of potentially active compounds and tested them in an appropriate in vitro system to determine activity at the farnesoid X receptor.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and suppliers

Imatinib was a kind gift from Prof. Beatrix Süß (Goethe-University of Frankfurt). Atorvastatine, atovaquone, dobutamine, GW4064, guggulsterone, nicergoline, ouabain, paroxetine, pentamidine, podoflox, probucol, ritodrine, rotigotine, tamsulosin, ziprasidone and DMSO were purchased from Sigma Aldrich (München, Germany). Fluvastatine, raloxifene and rimonabant were from Biozol (Eching, Germany). Ezetimib and sorafenib were purchased from SelleckChem (Houston, TX, USA), formoterole and ketoconazole were from Biotrend (Cologne, Germany). DMEM, penicillin/streptomycine stock and sodium pyruvate stock solutions were from PAA (Pasching, Austria), FCS was purchased from Biochrom (Berlin, Germany). Montelukast, zafirlukast, pranlukast, papaverine, fenoterole, HeLa and HepG2 cells were property of the Institute of Pharmaceutical Chemistry (Frankfurt, Germany), PCR oligonucleotide primers were synthesized by Eurofins MWG/Operon (Ebersberg, Germany), qPCR Master Mix was purchased from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany). Telmisartan was a kind gift from Prof. Ingrid Fleming (Vascular Research Center, Frankfurt, Germany).

### 2.2. Database preparation

We used compounds from two different datasets for the SOM training. The active compound set contained 297 published FXR agonists with an  $EC_{50}$  value of at least  $1 \mu\text{M}$  extracted from ChEMBL database [10] (<http://www.ebi.ac.uk/chembl/>). The background compound set contained 1280 FDA-approved drugs with a molecular weight less than 600 Da extracted from the DrugBank database [9] (version 2.0, <http://www.drugbank.ca/>). All compounds were further prepared for descriptor calculation by addition of explicit hydrogens, deprotonation of strong acids and protonation of strong bases performed by the so-called “wash” function of the Molecular Operating Environment (MOE [www.chemcom.com](http://www.chemcom.com), Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) provided as KNIME (Konstanz Information Miner, [www.knime.org](http://www.knime.org)) node.

### 2.3. Descriptor (CATS)

In order to provide a vector representation of the compounds for the training of the SOM, we used the CATS2D descriptor [11].

The CATS2D descriptor is an atom-pair correlation descriptor and employs the topological information of potential pharmacophore points to generate a vector representation of a compound. First, six possible potential pharmacophore features are assigned to each atom: hydrogen-bond donor or acceptor, positively or negatively charged, lipophilic or aromatic. Afterwards, the shortest topological path between each atom in the molecule is calculated and saved in a distance matrix. These distances are used to build the correlation vector for each pharmacophore point pair. All combinations of the six pharmacophore types lead to 21 possible pharmacophore point pairs that regarding a maximum path-length of ten bonds lead to a 210-dimensional feature space in total. The descriptor was calculated by the CATS2D implementation of MOE provided as KNIME node.

### 2.4. Self-organizing map (SOM) and training procedure

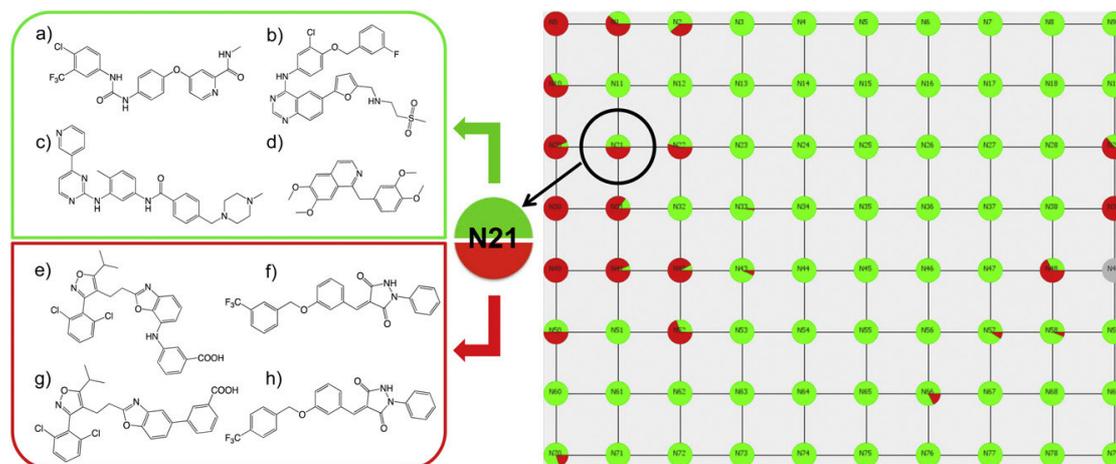
We used our in-house KNIME node implementation of a SOM to project the 210-dimensional feature space of the CATS2D descriptor on a two-dimensional neuronal network, where a neuron is connected to four other neurons to form a toroid neuron grid with a fixed rectangular topology. Each neuron is initialized with a random weight vector of the same dimension as the input data described by the CATS vector. The background dataset of DrugBank compounds was merged with FXR agonist dataset and used as combined training set for the SOM. The SOM was initialized with 80 neurons (see Fig. 1) and the setup parameters in Table 1. The training consisted of two steps, a competitive and an adaptive step, which were repeated over a defined number of iterations, so-called “training epochs”. For the competitive step, we randomly chose an input vector, presented it to the network and determined the “winner neuron”, which is the neuron defined by the weight vector with the lowest distance to the input vector. For the adaptive step, we updated the weight vectors of all neurons; each weight vector was moved toward the input vector, whereby the movement range was defined by a neighborhood function and the map topology. Training quality was evaluated by the mean quantization error (MQE) tendency during training progress. The SOM neuron adaptation reached a MQE steady state after about 800 epochs indicating sufficient training iterations. The distribution of the compounds over all neurons is shown in supplementary material, Fig. S1.

### 2.5. Cell culture

HeLa and HepG2 cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with FCS, sodium pyruvate (SP) and penicillin/streptomycin (PS) at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . The day before transfection for FXR transactivation assay, HeLa cells were seeded in 96-well plates with a density of 30,000 cells per well. For real-time qPCR experiments, HepG2 cells were seeded into 6-well plates with a density of  $10^6$  cells per well. 8 h later, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with SP, PS and 0.5% charcoal-stripped FCS. The following day cells were incubated in DMEM additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control for 24 h or first transiently transfected as described later.

### 2.6. Plasmids

pCDNA3-hFXR contains the sequence of human FXR, obtained from HepG2 cDNA by PCR amplification and cloned into the BamHI/XbaI cleavage site of pCDNA3 (Invitrogen) (primers: forward 5'-GCCAGGATCCATGGGATCAAAAATGAATCTC-3', reverse 5'-GCCTCTAGATCACTGCACGTCCCAGATTTC-3'). Sequence of the insert in pCDNA3 was verified by sequencing (SRD GmbH,



**Fig. 1.** Topological two-dimensional data distribution of the SOM and detailed view on the compound distribution of neuron 21 in green: DrugBank compounds, in red: known FXR agonists; Neuron 21: DrugBank compounds (a) sorafenib, (b) lapatinib, (c) imatinib, (d) papaverine and FXR agonists (e) CHEMBL559890, (f) CHEMBL485403, (g) CHEMBL556311, (h) CHEMBL485404. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Oberursel, Germany). pGL3basic (Promega, Mannheim, Germany) was used as a reporter plasmid, with either a shortened construct of the promoter of the bile salt export protein (BSEP, sequence of construct from (49)) or a threefold repeat of the direct FXR response element IR1 (GGGACATTGATCCT) cloned into the SacI/NheI cleavage site in front of the luciferase gene. pRL-SV40 (Promega) was transfected as a control for normalization of transfection efficacy and cell survival. pSG5-hRXR was already published elsewhere [12].

### 2.7. Full length FXR transactivation assay

Transient transfection of HeLa cells with BSEP-pGL3 or IR1-3x-pGL3, pRL-SV40 and the expression plasmids pCDNA-hFXR and pSG5-hRXR was carried out using calcium phosphate transfection method. 5 h after transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with SP, PS and 0.5% charcoal-stripped FCS. 24 h after transfection, medium was changed to DMEM, now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compounds or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in triplicate wells and each experiment was repeated independently at least three times. Following 24 h incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) and luminescence was measured with a GENios Pro luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany).

### 2.8. Real-time quantitative PCR

After 24 h of incubation with the test compounds, HepG2 cells were harvested and RNA was isolated with E.Z.N.A Total RNA Kit

(Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA). After DNase treatment, 2 µg RNA was subjected to cDNA-synthesis, carried out by using iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, München, Germany). Real-time qPCR was performed with the StepOnePlus™ System (Applied Biosystems) with specific primers for the FXR target gene SHP (forward 5'-CAACCCCGATGTGCCAG-3', reverse 5'-CCTCTGCCACCTGATCTCT-3') and Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for detection of the transcripts. Transcription levels were normalized to β-actin mRNA levels (primers: forward 5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3', reverse 5'-CTTCTCTTAATGTCACGCACG-3').

## 3. Results

### 3.1. DrugBank screening, SOM analysis and selection of test compounds

For the recognition of potential starting points for the SOSA approach in respect of new FXR agonists, we trained a SOM with the combined dataset of known FXR agonists and the DrugBank compounds. Regarding the capability of SOMs to cluster similar compounds with potentially similar biological activity on a common neuron, we analyzed those neurons that contained at least as many FXR agonists (Fig. 1, shown in red) as DrugBank compounds (shown in green), these were of special interest in terms of potential FXR “activity islands” [7].

Overall 13 of 80 neurons complied with these requirements, containing a majority of FXR agonists together with a smaller set of approved drugs. These 13 neurons shared 258 molecules including 73 approved drug compounds. Table 2 shows the subset of 31 compounds with their “original” molecular action and approved indication as listed in the DrugBank database, which were selected after visual examination with regard to reported adverse effects, chemical diversity and commercial availability for further examination in an in vitro FXR transactivation assay.

### 3.2. In vitro screening in FXR transactivation assay

The selected compounds were characterized in vitro in a full length FXR transactivation assay developed by our group, using a bile salt export protein (BSEP) promoter driven luciferase plasmid

**Table 1**  
Setup parameters for the self-organizing map.

Parameters	Value
Number of neurons	80
Map width	10
Map height	8
Map topology	Rectangular
Number of training epochs	1000
$\lambda_{\text{initial}}/\lambda_{\text{final}}$	50.0/0.005
$\sigma_{\text{initial}}/\sigma_{\text{final}}$	0.5/0.005

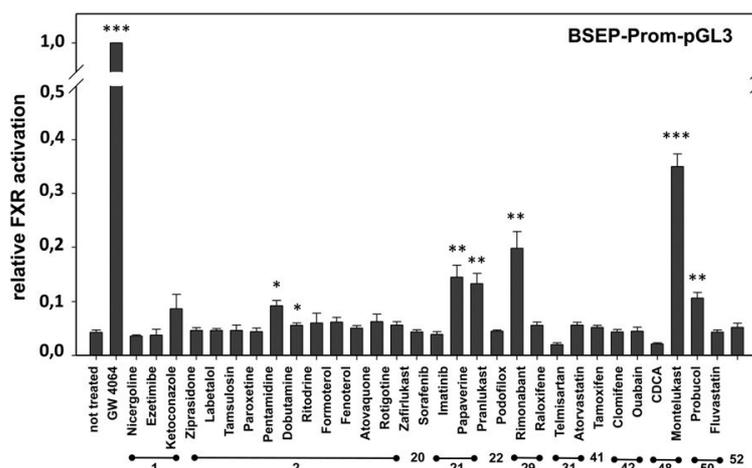
**Table 2**  
List of selected DrugBank compounds, which were further characterized in vitro.

Compound	Biological effect	Approved indication	DB ID
Nicergoline	$\alpha_{1A}$ -Receptor antagonist	Vascular disorders	DB00699
Ezetimibe	Cholesterol absorption inhibitor	Hypercholesterolemia	DB00973
Ketoconazole	Ergosterol synthesis inhibitor	Systemic fungal infections	DB01026
Ziprasidone	Antipsychotic (D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> , 5-HT)	Schizophrenia	DB00246
Labetalol	$\alpha_1$ -/ $\beta$ -Receptor antagonist	Hypertension, angina pectoris	DB00598
Tamsulosin	$\alpha_1$ -Receptor antagonist	Benign prostatic hyperplasia	DB00706
Paroxetine	SSRI	Depression, anxiety	DB00715
Pentamidine	Antiprotozoal action unknown	Pneumonia	DB00738
Dobutamine	$\beta_1$ -Receptor agonist	Cardiac decompensation	DB00841
Ritodrine	$\beta_2$ -Receptor agonist	Prophylaxis of premature labor	DB00867
Formoterol	Long acting $\beta_2$ -receptor agonist	Asthma, COPD	DB00983
Fenoterol	$\beta_2$ -Receptor agonist	Asthma	DB01288
Atovaquone	Mitochondrial electron transport	Pneumonia, malaria	DB01117
Rotigotine	Dopamine receptor agonist	Parkinsons disease	DB05271
Zafirlukast	CysLT <sub>1</sub> receptor antagonist	Asthma	DB00549
Sorafenib	Serin/threonine and tyrosin kinase inhibitor	Renal cell carcinoma	DB00398
Imatinib	Tyrosine kinase inhibitor	CML, GIST	DB00619
Papaverine	PDE inhibitor	Impotence, vasospasm	DB01113
Pranlukast	CysLT <sub>1</sub> receptor antagonist	Asthma	DB01411
Podofilox	Topoisomerase II (not clear)	Genital warts	DB01179
Rimonabant	CB1 receptor antagonist	Obesity (BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> )	DB06155
Raloxifene	SERM	Osteoporosis, breast cancer	DB00481
Telmisartan	AT <sub>1</sub> receptor antagonist	Hypertension, CHF	DB00966
Atorvastatin	HMG-CoA-reductase inhibitor	Dyslipidemia, hypercholesterolemia	DB01076
Tamoxifen	SERM	Breast cancer	DB00675
Clomifene	SERM	Infertility (anovulation)	DB00882
Ouabain	Na-K-ATPase pump inhibitor	Heart failure, atrial fibrillation	DB01092
CDCA	FXR agonist	Gallstones	DB06777
Montelukast	CysLT <sub>1</sub> receptor antagonist	Asthma	DB00471
Probucol	LDL catabolism, cholesterol synthesis	Hypercholesterolemia	DB01599
Fluvastatin	HMG-CoA-reductase inhibitor	Dyslipidemia, hypercholesterolemia	DB01095

to determine FXR transactivation. Fig. 2 shows the determination of relative FXR activation of the test compounds in a concentration of 10  $\mu$ M, (pentamidine, atovaquone, sorafenib and ouabain in lower concentrations due to toxic effects), compared to 3  $\mu$ M of the FXR agonist GW4064, which was set at 100% activation. Compounds are ordered according to the SOM neurons, to which the numbers beneath the diagram in Fig. 2 refer.

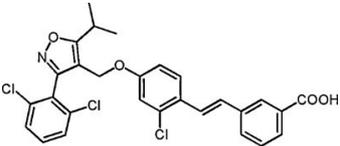
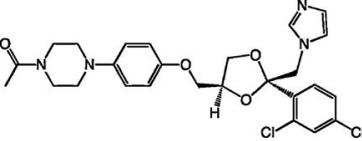
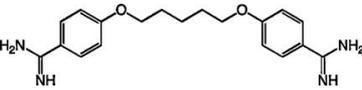
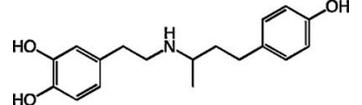
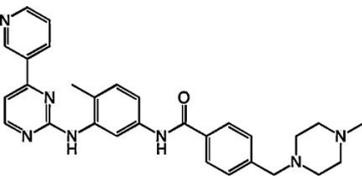
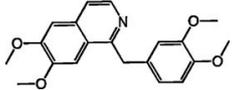
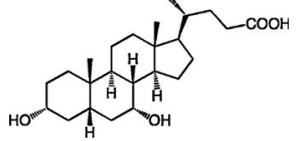
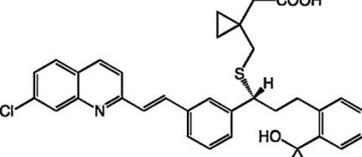
We observed significant FXR activation by pentamidine, dobutamine, imatinib, papaverine, podofilox, CDCA and montelukast, whereas most of the remaining compounds were inactive at

this concentration. FXR activation was also detected for ketoconazole, but this effect was not considered significant by *t* test, maybe due to the high standard deviation. CDCA is already known to be the natural ligand for FXR since the late 1990s [13] and is approved in the US for the treatment of gallstones. Podofilox seems to activate FXR most after CDCA, but in this case we additionally observed strong upregulation of renilla luciferase expression, which was used for normalization, so that we concluded that the effect shown by podofilox in our assay system is not necessarily FXR-dependent.



**Fig. 2.** In vitro full length FXR transactivation assay in HeLa cells transfected with FXR/RXR, BSEP-pGL3 and pRL-SV40. Compounds were ordered as they appear on the SOM neurons (numbers beneath the bars) and tested at 10  $\mu$ M. Due to toxicity pentamidine and sorafenib were tested at 3  $\mu$ M, atorvastatin at 1  $\mu$ M and ouabain at 0.03  $\mu$ M. Bars show relative FXR activation compared to 3  $\mu$ M GW4064  $\pm$  S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by *t* test (\* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001).

**Table 3**  
Structures and FXR-activity of DrugBank compounds.

SOM Neuron	Compound	Chemical structure	FXR activation at 10 $\mu$ M in % ( $\pm$ S.E.M)	t-Test
	Not treated		4.3 $\pm$ 0.9	
	GW4064		100	$p = 9.4 \times 10^{-8***}$
1	Ketoconazole		8.6 $\pm$ 2.7	$p = 0.1222$ (N.S.)
2	Pentamidine		9.2 $\pm$ 1	$p = 0.0122^*$
	Dobutamine		5.6 $\pm$ 0.4	$p = 0.0458^*$
21	Imatinib		14.5 $\pm$ 2.1	$p = 0.0079^{**}$
	Papaverine		13.3 $\pm$ 1.9	$p = 0.0079^{**}$
48	CDCA		35 $\pm$ 2.4	$p = 0.0004^{***}$
50	Montelukast		10.6 $\pm$ 1.1	$p = 0.0027^{**}$

All compounds were tested in BSEP promoter driven full length FXR transactivation assay in HeLa cells at least in three independent determinations, values are given in %  $\pm$  S.E.M.

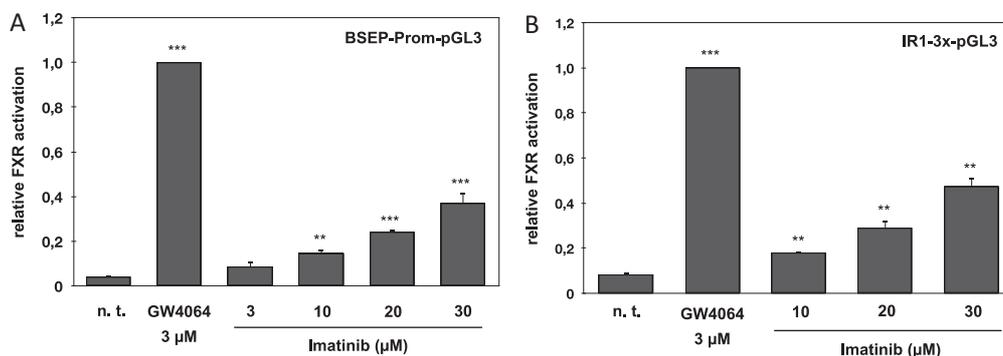
N.S., not significant.

\*  $p < 0.05$ .

\*\*  $p < 0.01$ .

\*\*\*  $p < 0.001$ .

Please cite this article in press as: Steri R, et al. Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity. Biochem Pharmacol (2012), doi:10.1016/j.bcp.2012.02.027



**Fig. 3.** Concentration-dependent effect of imatinib in full length FXR transactivation assay in HeLa cells transfected with FXR/RXR, BSEP-pGL3 (A) or IR1-3x-pGL3 (B) and pRL-SV40. Bars show relative FXR activation compared to 3 μM GW4064 ± S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by t test (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

The other hits (ketoconazole, pentamidine, dobutamine, imatinib, papaverine and montelukast) represent a group of structural diverse compounds, each of them approved for complete different diseases (Table 3). We chose imatinib for further characterization as it had the highest activity in the transactivation assay.

### 3.3. Imatinib concentration dependently activates FXR in transactivation assays

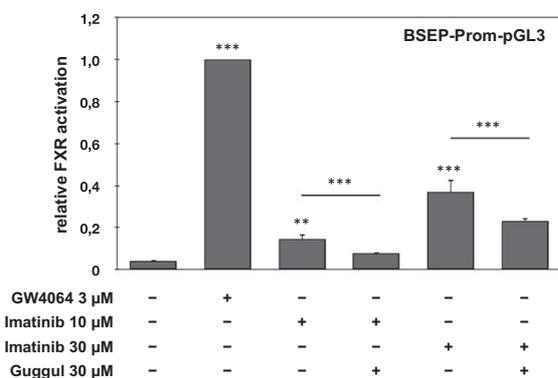
Fig. 3A shows a concentration dependent luciferase induction in the BSEP promoter driven reporter gene assay, which was significant from a concentration of 10 μM imatinib and above. To confirm that the luciferase induction is dependent on the FXR response element in the BSEP promoter, we additionally tested the significant active concentrations in an IR1-3x-repeat driven reporter gene assay, which also showed significant luciferase induction (Fig. 3B).

In order to verify that the luciferase induction by imatinib is FXR-dependent, we perform co-incubation experiments with the known FXR antagonist guggulsterone in the BSEP promoter driven

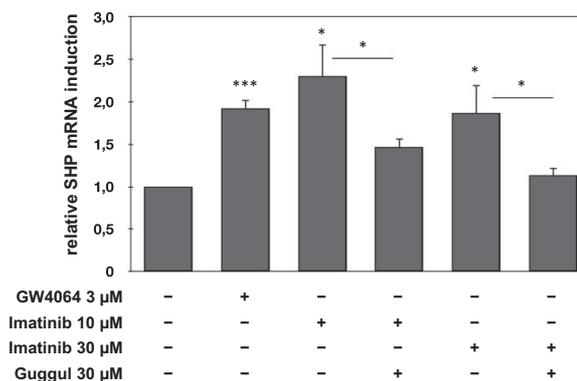
reporter gene assay, using 10 or 30 μM imatinib and 30 μM guggulsterone. As Fig. 4 shows, guggulsterone was able to decrease luciferase induction by imatinib in both combinations, which suggests that the observed effect of imatinib is FXR-dependent.

### 3.4. Imatinib induces SHP mRNA in HepG2 cells

As the used transactivation assays are quite artificial due to the overexpression of FXR and RXR and the “non-physiological” surrounding of HeLa cells, we incubated the liver carcinoma cell line HepG2 with imatinib and guggulsterone for 24 h to quantify mRNA levels of the FXR target gene SHP by real-time quantitative PCR, in order to verify FXR activation in a more natural context. As Fig. 5 shows both 10 and 30 μM imatinib were able to significantly induce SHP mRNA. Comparable to the results of the transactivation assays, 30 μM guggulsterone again decreased the amount of induced SHP mRNA in both combinations. The fact that 10 μM imatinib induced slightly more SHP mRNA than 30 μM despite the fact that 30 μM activates FXR to a higher extend in the reporter gene assays is not completely explainable, however cytotoxic effects of imatinib on HepG2 cells might explain this behavior.



**Fig. 4.** Effect of guggulsterone on FXR activation by imatinib in full length FXR transactivation assay in HeLa cells transfected with FXR/RXR, BSEP-pGL3 and pRL-SV40. Bars show relative FXR activation compared to 3 μM GW4064 ± S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by t test (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Fig. 5.** Relative SHP mRNA induction by imatinib in HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with imatinib or co-incubated with imatinib and guggulsterone for 24 h and cDNA synthesized from isolated mRNA served as template in qPCR experiments. Bars show relative SHP mRNA induction compared to 3 μM GW4064 ± S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by t test (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

#### 4. Discussion and conclusions

SOMs are an established technique in drug discovery to screen a large amount of compounds for potential biological activity. Here, we were able to identify six compounds as FXR modulators, which represent 20% of the total of 31 handpicked compounds and consist of scaffolds, which have not been reported to show FXR activation so far. There may be even more FXR-active substances among the 42 compounds, which shared neurons with FXR agonists but have not been chosen for further in vitro characterization. Additionally, the fact that CDCA, the physiological FXR ligand [13], which was included in the DrugBank dataset but not in our set of known FXR agonists, shared a common neuron with other known agonists, emphasizes the capability of our SOM to recognize new scaffolds for FXR agonists.

The identified FXR-active DrugBank compounds ketoconazole, pentamidine, dobutamine, imatinib, papaverine and montelukast (Table 3) represent a group of structurally diverse compounds, approved for the treatment of different diseases, which were not reported to include FXR signaling in their pathophysiological context so far. One can assume that their original mode of action is FXR-independent (cf. Table 2). In terms of identifying new lead compounds using the SOSA approach, it is necessary to take into account adverse effects, for example observed in clinical studies, regarding the selection of test compounds. In case of FXR, those effects would mainly affect glucose and lipid homeostasis or bile acid metabolism. Indeed, we found evidence in the literature that almost all identified FXR-active compounds of this work except dobutamine show such effects in vitro or in clinical studies. In case of dobutamine the lack of observations in altering lipid and glucose homeostasis is not surprising, as dobutamine is only as short-time treatment in emergencies and therefore does not exhibit long-term effects.

Papaverine is a nonspecific phosphodiesterase inhibitor used for the treatment of erectile dysfunction and vasospasms. In 2003, it was shown that papaverine amongst other PDE inhibitors is able to increase gluconeogenesis and glycogenolysis in isolated rat hepatocytes [14], which can be potentially mediated by FXR activation. Montelukast is an antagonist of the leukotriene receptor subtype CysLT1 and approved for the chronic treatment of asthma bronchiale. Montelukast shows antiatherogenic effects by reduction of the expression of the inflammation marker MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) in rabbits fed with atherogenic diet [15] and improves hepatic fibrosis in cholestatic rats [16], indicating, that FXR activation may play a role in the observed effects.

Imatinib is a tyrosine kinase inhibitor approved for the therapy of chronic myeloid leukemia and gastrointestinal stromal tumors. In 2005, a case study about a 70-year-old woman with type 2 diabetes mellitus was treated with imatinib due to CML was published [17]. During treatment, her blood glucose levels decreased progressively and insulin doses were reduced until she did not need diabetes medication any longer. In animal models, imatinib improves insulin sensitivity in high-fat diet fed rats [18], induces diabetes remission in db/db mice [19] and attenuates diabetes-associated atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice [20]. In clinical studies, diabetic patients were able to discontinue their medication under the treatment with tyrosine kinase inhibitors [21]. Furthermore, there are several reports of diabetes remission in patients [22] and improved insulin sensitivity in non-diabetic CML patients treated with imatinib [23]. Tyrosine kinase inhibitors are discussed as a possible therapy option for diabetes [24,25], but without knowing the underlying mechanisms, further development toward clinical candidates is a challenge. Pharmacokinetic determinations reveal plasma imatinib levels in patients up to 4000 ng/ml [26], which equates around 8.1  $\mu$ M imatinib. We

determined significant FXR activation and a magnitude of SHP mRNA induction comparable to the full agonist GW4064 at 10  $\mu$ M imatinib, in spite of the fact that imatinib only causes 14.5% FXR activation in reporter gene assays at this concentration. We suggest that the observed beneficial influences on glucose metabolism may be caused by FXR activation and modulation of gene transcription of FXR target genes involved in glucose and lipid metabolism.

The strength of the SOM approach with topological pharmacophore descriptors is the high level of abstraction. The ability to retrieve active compounds with chemical scaffolds different from the reference compound, the so-called scaffold-hopping potential [27] could be demonstrated for similarity searches based on the topological pharmacophore descriptors. Due to the high flexibility of the FXR binding site a large number of interaction patterns with the binding site are possible [28–31]. These interaction patterns are implicitly encoded in the active molecules. Comparing imatinib with the most similar reference compound (reference compounds with the highest similarity to the screening hits are listed in supplementary Fig. S2) both compounds exhibit two annealed aromatic rings 4-(pyridine-3-yl)pyrimidine in the case of imatinib and 3-phenyl-1,2-oxazole in the case of the reference compound. This ring system is followed by a linker and an amide moiety in both molecules and is succeeded by an aromatic ring with a polar group. This abstract blueprint, which is probably sufficient for FXR binding could be recognized by the topological pharmacophore descriptor and lead consequently to an aggregation of active compounds on nearby neurons on the SOM.

The identified compounds, despite their relatively weak agonistic FXR activity, can exhibit excellent starting points for lead optimization. Full agonistic activity on the receptor is not necessarily needed or desired for a beneficial modulation of FXR signaling, as recent developments of FXR ligands show [32] and newer animal studies with full FXR agonists reveal [33]. Modulation of nuclear receptors is an established therapy option for instance in the therapy of breast cancer (modulation of estrogen receptor by SERMs [34]) or in clinical studies for the treatment of diabetes mellitus (modulation of PPAR $\gamma$  by halofenate [35]) for many years now. An FXR agonist, in spite of activating FXR only to an extent of 30%, was successful in reduction of LDL and triglyceride levels in LDLR<sup>-/-</sup> mice fed a high fat diet, showing that receptor modulation, but not full activation may be a promising approach for pharmacological targeting of FXR as well [32]. The same strategy is examined for targeting PPAR $\gamma$ , after the full agonists troglitazone and rosiglitazone were withdrawn from the market, causing severe side effects in long-term treatment [36,37]. The SOSA approach supported by a technique like self-organizing maps composes a successful procedure to identify new lead structures for a defined target. Optimization of these structures with regard to FXR activity may lead to new candidates to further explore the potential of FXR modulation within a variety of diseases.

#### Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support from the Else-Kröner-Fresenius-Stiftung (research grant Ramona Steri), Merz Pharmaceuticals (research grant Janosch Achenbach), Lipid Signaling Forschungszentrum Frankfurt (LIFF) and Oncogenic Signaling Frankfurt (OSF) for financial support. We thank Chemical Computing Group for academic license of MOE software, Dr. Markus Steber and Prof. Dr. Beatrix Suess (Institute of Molecular Biosciences) for providing imatinib substance, Astrid Fischer (Institute of Pharmaceutical Chemistry) for montelukast, zafirlukast and pranlukast substances and Prof. Dr. Ingrid Fleming

(Vascular Research Center, Frankfurt, Germany) for telmisartan substance.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2012.02.027.

#### References

- [1] Raju TN. The Nobel chronicles. *Lancet* 2000;356:346.
- [2] Wermuth CG. Selective optimization of side activities: the SOSA approach. *Drug Discov Today* 2006;11:160–4.
- [3] Patlak M. New Weapons to combat an ancient disease: treating diabetes. *FASEB J* 2002;16:1853.
- [4] Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* 2007;13:298–309.
- [5] Claudel T, Staels B, Kuipers F. The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2020–30.
- [6] Kohonen T. Self-organized formation of topologically correct feature maps. *Biol Cybern* 1982;43:59–69.
- [7] Schneider P, Tanrikulu Y, Schneider G. Self-organizing maps in drug discovery: compound library design, scaffold-hopping, repurposing. *Curr Med Chem* 2009;16:258–66.
- [8] Johnson MA, Maggiora GM. Concepts and applications of molecular similarity. New York: John Wiley & Sons; 1990.
- [9] Wishart DS, Knox C, Guo AC, Cheng D, Shrivastava S, Tzur D, et al. DrugBank: a knowledge base for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D901–6.
- [10] Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, et al. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D1100–07.
- [11] Schneider G, Neidhart W, Giller T, Schmid G. “Scaffold-hopping” by topological pharmacophore search: a contribution to virtual screening. *Angew Chem Int Ed* 1999;38:2894–6.
- [12] Seuter S, Väisänen S, Rådmark O, Carlberg C, Steinhilber D. Functional characterization of vitamin D responding regions in the human 5-lipoxygenase gene. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:864–72.
- [13] Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 1999;3(5):543–53.
- [14] Abdollahi M, Chan TS, Subrahmanyam V, Ó'Brien PJ. Effects of phosphodiesterase 3,4,5 inhibitors on hepatocyte cAMP levels, glycogenolysis, gluconeogenesis and susceptibility to a mitochondrial toxin. *Mol Cell Biochem* 2003;252:205–11.
- [15] Ge S, Zhou G, Cheng S, Liu D, Xu J, Xu G, et al. Anti-atherogenic effects of montelukast associated with reduced MCP-1 expression in a rabbit carotid balloon injury model. *Atherosclerosis* 2009;205:74–9.
- [16] El-Sweify S, Hassanen SI. Improvement of hepatic fibrosis by leukotriene inhibition in cholestatic rats. *Ann Hepatol* 2009;8:41–9.
- [17] Veneri D, Franchini M, Bonora E. Imatinib and regression of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2005;352:1049–50.
- [18] Hägerkvist R, Jansson L, Welsh N. Imatinib mesylate improves insulin sensitivity and glucose disposal rates in rats fed a high-fat diet. *Clin Sci (Lond)* 2008;114(1):65–71.
- [19] Han MS, Chung KW, Cheon HG, Rhee SD, Yoon CH, Lee MK, et al. Imatinib mesylate reduces endoplasmic reticulum stress and induces remission of diabetes in db/db mice. *Diabetes* 2009;58:329–36.
- [20] Lassila M, Allen TJ, Cao Z, Thallas V, Jandeleit-Dahm KA, Candido R, et al. Imatinib attenuates diabetes-associated atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:935–42.
- [21] Agostino N, Chinchilli VM, Lynch CJ, Koszyk-Szewczyk A, Gingrich R, Sivik J, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitors (sunitinib, sorafenib, dasatinib, and imatinib) on blood glucose levels in diabetic and nondiabetic patients in general clinical practice. *J Oncol Pharm Pract* 2011;17:197–202.
- [22] Breccia M, Muscaritoli M, Aversa Z, Mandelli F, Alimena G. Imatinib mesylate may improve fasting blood glucose in diabetic Ph+ chronic myelogenous leukemia patients responsive to treatment. *J Clin Oncol* 2004;22:4653–5.
- [23] Tsapas A, Vlachaki E, Sarigianni M. Restoration of insulin sensitivity following treatment with imatinib mesylate (Gleevec) in non-diabetic patients with chronic myelogenous leukemia (CML). *Leukemia* 2008;32:674–5.
- [24] Mokhtari D, Welsh N. Potential utility of small tyrosine kinase inhibitors in the treatment of diabetes. *Clin Sci (Lond)* 2010;118:241–7.
- [25] Little PJ, Cohen N, Morahan G. Potential of small molecule protein tyrosine kinase inhibitors as immuno-modulators and inhibitors of the development of type 1 diabetes. *ScientificWorldJournal* 2009;9:224–8.
- [26] von Mehren M, Widmer N. Correlations between imatinib pharmacokinetics, pharmacodynamics, adherence, and clinical response in advanced metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST): an emerging role for drug blood level testing. *Cancer Treat Rev* 2011;37:291–9.
- [27] Renner S, Schneider G. Scaffold-hopping potential of ligand-based similarity concepts. *ChemMedChem* 2006;1:181–5.
- [28] Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, et al. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* 2003;11:1079–92.
- [29] Schuster D, Markt P, Grienke U, Mihaly-Bison J, Binder M, Noha SM, et al. Pharmacophore-based discovery of FXR agonists. Part I: model development and experimental validation. *Bioorg Med Chem* 2011;19:7168–80.
- [30] Soisson SM, Parthasarathy G, Adams AD, Sahoo S, Sitlani A, Sparrow C, et al. Identification of a potent synthetic FXR agonist with an unexpected mode of binding and activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5337–42.
- [31] Steri R, Kara M, Proschak E, Steinhilber D, Schneider G, Schubert-Zsilavecz M. Antidiabetic sulfonylureas modulate farnesoid X receptor activation and target gene transcription. *Future Med Chem* 2010;2:575–86.
- [32] Richter HGF, Benson GM, Bleicher KH, Blum D, Chaput E, Clemann N, et al. Optimization of a novel class of benzimidazole-based farnesoid X receptor (FXR) agonists to improve physicochemical and ADME properties. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21:1134–40.
- [33] Watanabe M, Horai Y, Houten SM, Morimoto K, Sugizaki T, Arita E, et al. Lowering bile acid pool size with a synthetic FXR agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem* 2011;286:26913–20.
- [34] Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor transcription and transactivation: estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta—regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000;2:335–44.
- [35] Allen T, Zhang F, Moodie SA, Clemens LE, Smith A, Gregoire F, et al. Halofenate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator with antidiabetic activity. *Diabetes* 2006;55:2523–33.
- [36] Watkins PB. Insight into hepatotoxicity: the troglitazone experience. *Hepatology* 2005;41:229–30.
- [37] Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2010;170:1191–201.
- [38] Steri R, Schneider P, Klenner A, Rupp M, Kriegl JM, Schubert-Zsilavecz M. Target Profile Prediction: Cross-Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) and Farnesoid X Receptor (FXR). *Mol Inform* 2010;29:287–92.

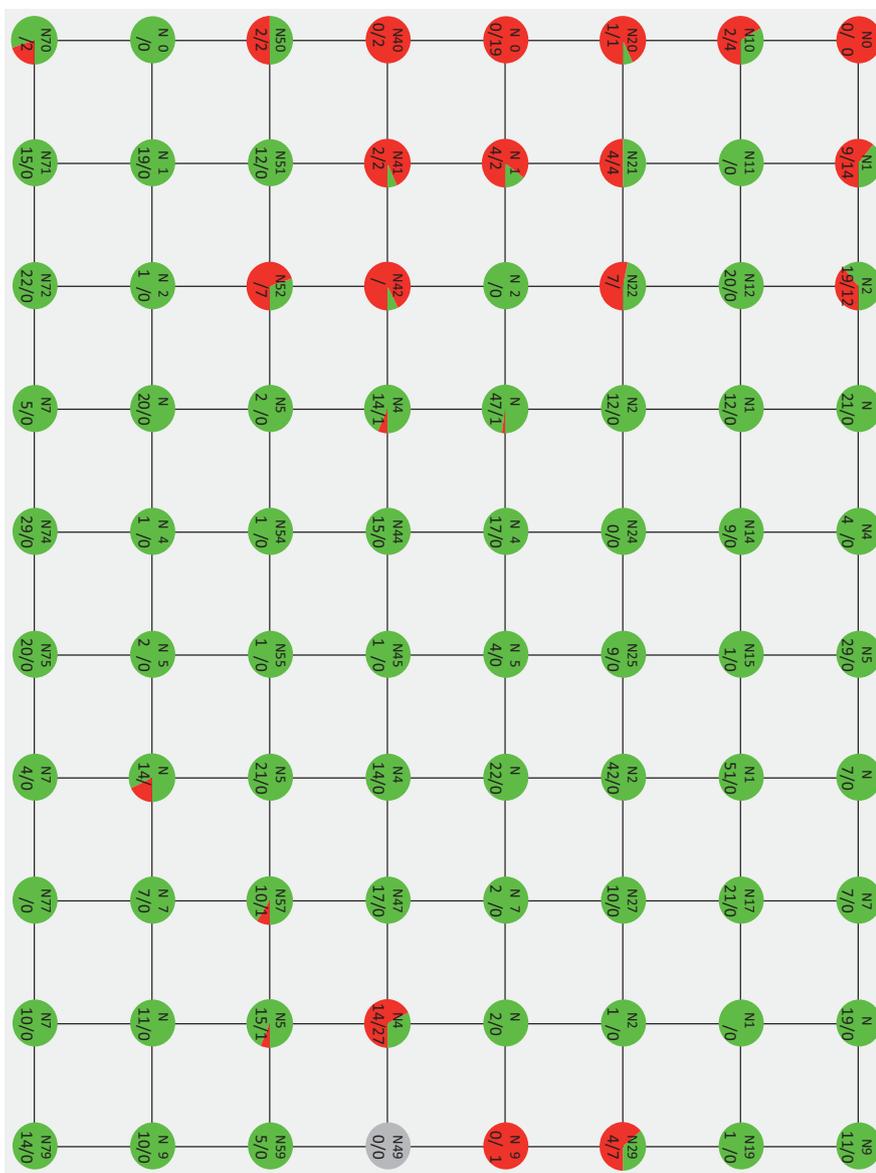
## Supplementary material

# Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity

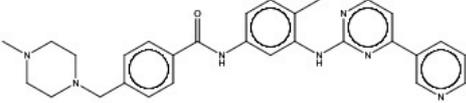
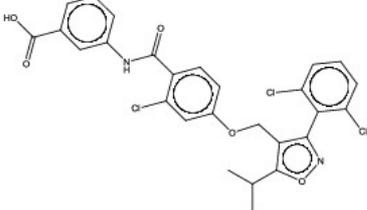
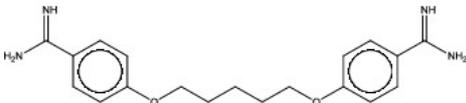
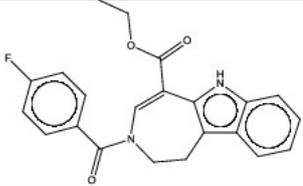
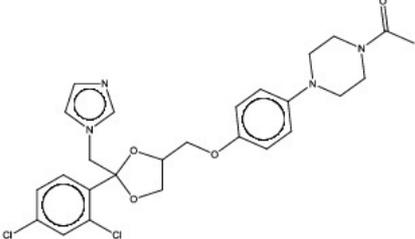
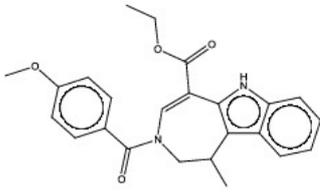
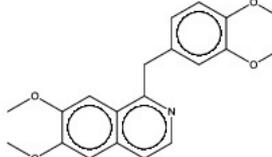
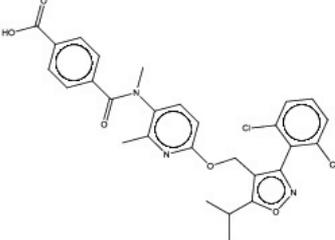
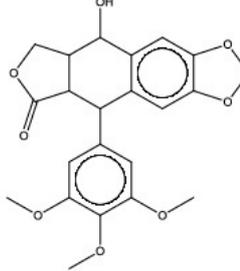
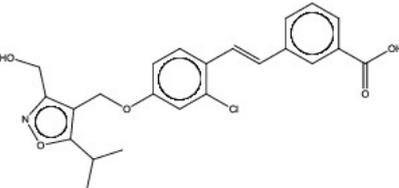
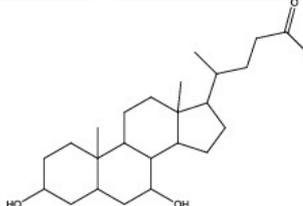
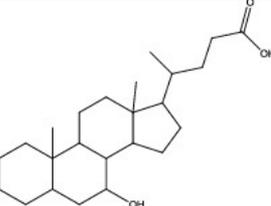
*Ramona Steri, Janosch Achenbach, Dieter Steinhilber, Manfred Schubert-Zsilavecz*

*and Ewgenij Proschak*

**Figure S1.** Overall distribution of compounds over the SOM, absolute number of DrugBank compounds/absolute number of reference FXR agonists is indicated.



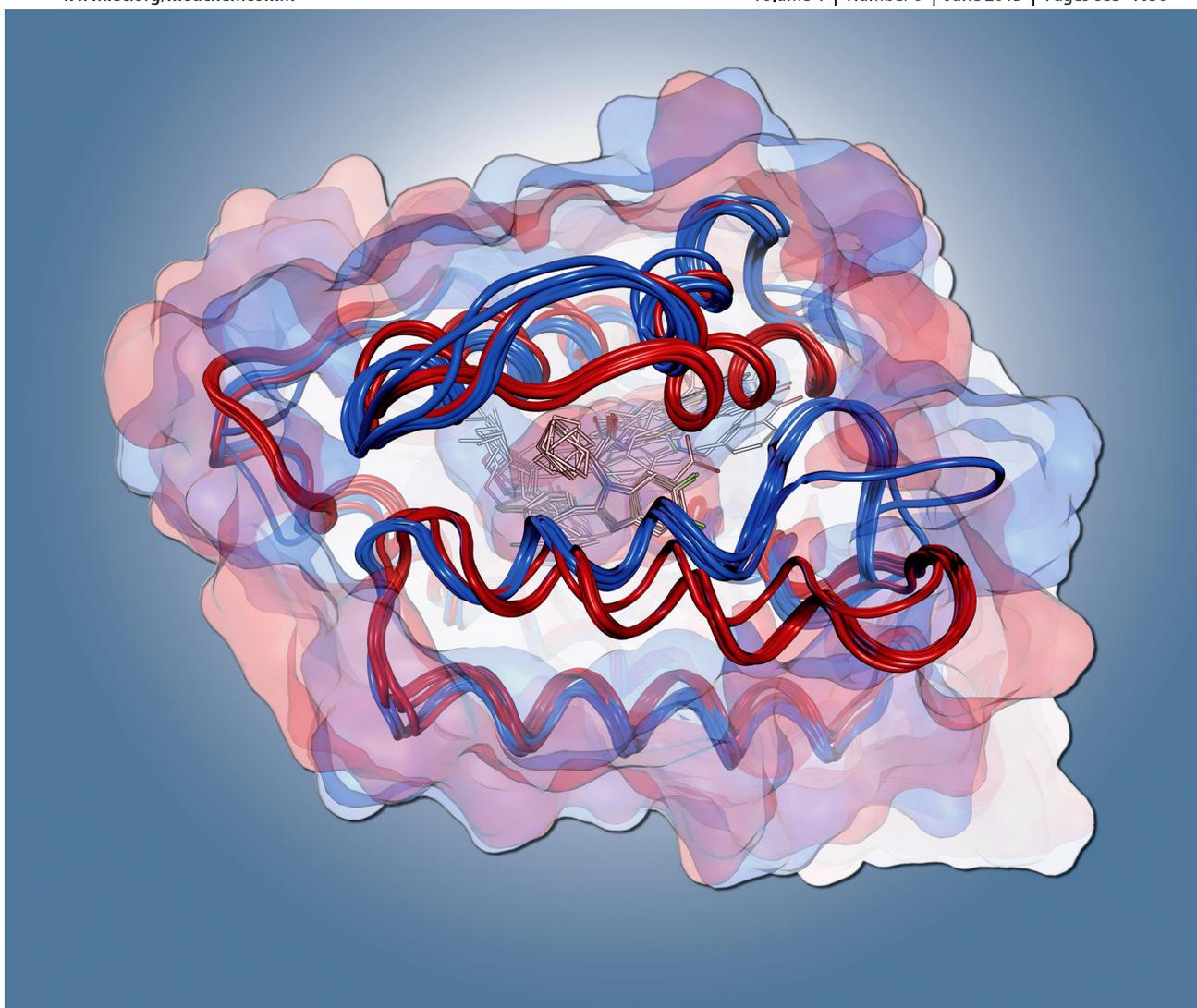
**Figure S2.** Screening hits, the most similar reference compounds, the Euclidian distance is given

Screening hit	Most similar reference compound	distance
		<b>28</b>
		<b>29</b>
		<b>20</b>
		<b>23</b>
		<b>30</b>
		<b>10</b>

# MedChemComm

www.rsc.org/medchemcomm

Volume 4 | Number 6 | June 2013 | Pages 883–1050



ISSN 2040-2503

RSCPublishing

**CONCISE ARTICLE**  
Janosch Achenbach, Ewgenij Proschak *et al.*  
Identification of novel farnesoid X receptor  
modulators using a combined ligand- and  
structure-based virtual screening



2040-2503 (2013) 4:6:1-N

## CONCISE ARTICLE

## Identification of novel farnesoid X receptor modulators using a combined ligand- and structure-based virtual screening†

Cite this: *Med. Chem. Commun.*, 2013, **4**, 920

Janosch Achenbach,‡ Matthias Gabler,‡ Ramona Steri,‡ Manfred Schubert-Zsilavecz and Ewgenij Proschak

Received 13th February 2013  
Accepted 15th April 2013

DOI: 10.1039/c3md00049d

www.rsc.org/medchemcomm

A combined ligand- and structure-based virtual screening has been applied to retrieve novel modulators of the farnesoid X receptor (FXR). Four distinct chemotypes exhibiting partial activation of FXR in a reporter gene assay could be identified. The analysis of the preliminary structure–activity relationships yielded a 3-amino-imidazo[1,2-*a*]pyridine derivative which showed a maximum relative FXR activation of about 14% with an  $EC_{50} = 480$  nM.

In the last decade, the farnesoid X receptor (FXR) became an attractive drug target for the treatment of several diseases associated with metabolic disorders, such as dyslipidemia, diabetes and atherosclerosis. Additionally, beneficial effects at non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver regeneration and inflammatory bowel disease (IBD) were reported.<sup>1–6</sup> FXR is a ligand-activated transcription factor, which plays a crucial role in bile acid, glucose and lipid homeostasis.<sup>7–10</sup> The metabolic effects of FXR activation are mainly caused by the up-regulation of another transcription factor, the small heterodimer partner (SHP), which itself regulates the expression of several key genes within gluconeogenesis (*e.g.* phosphoenolpyruvate carboxykinase 1) or lipid metabolism (*e.g.* sterol regulatory element binding protein 1c). Several attempts in academia and the pharmaceutical industry have been made to develop FXR ligands, however until now only a few compounds have reached early phases of clinical development.<sup>11,12</sup> The development of several classes of FXR agonists has been discontinued due to toxicological or pharmacokinetic issues.<sup>13–17</sup> To date only INT-747 (6-EDCA, (3 $\alpha$ ,5 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )-6-ethyl-3,7-dihydroxy-cholan-24-oic acid, Fig. 1), is reported to be in clinical phase III for the treatment of primary biliary cirrhosis (PBC) (press release Intercept Pharmaceuticals, <http://www.intercept-pharma.com>).

In analogy to other ligand-activated transcription factors, which have been exploited as drug targets, full agonism might

not be the ideal mode of action of a successful pharmacological compound. In the case of the estrogen receptor, selective estrogen receptor modulators (SERMs) have replaced full agonists due to improved pharmacodynamic properties. Analogously, in the case of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), full agonists acting as insulin sensitizers have been removed from the market due to various side effects.<sup>18,19</sup> Novel clinical developments in PPAR $\gamma$  research indicate that partial agonists can yield comparable metabolic effects with reduced full agonist-mediated side effects (*e.g.* water retention and weight gain).<sup>20</sup> The development of partial FXR agonists is underway. Recently, we reported that Imatinib (Fig. 1), a BCR-ABL inhibitor, exhibits partial agonistic properties and leads to activation of genes involved in glucose metabolism.<sup>21</sup> A benzimidazole-derived compound series developed by Richter *et al.* exhibits partial agonistic properties *in vitro* and lipid-lowering activity *in vivo*.<sup>22</sup> The most promising candidate is shown as compound 7 in Fig. 1. The latter study comprises

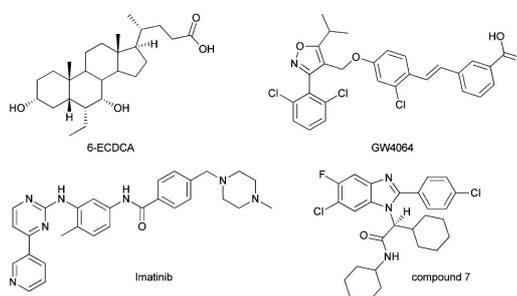


Fig. 1 Four different known FXR Ligands. 6-EDCA, GW4064 and compound 7 have been co-crystallized with FXR and each of them lead to a different receptor conformation.

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University of Frankfurt, Max-von-Laue Str. 9, D-60438 Frankfurt, Germany. E-mail: [proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de](mailto:proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de); Tel: +49 69 798 29301

† Electronic supplementary information (ESI) available: A full list of screened compounds; configuration of the conformer generation procedure and large pictures of the pharmacophore model; analysis of the retrospective virtual screening procedure. See DOI: 10.1039/c3md00049d

‡ J.A., M.G. and R.S. contributed equally to this work and are listed in alphabetical order.

crystallographic data of FXR modulators, which can be employed for the development of novel partial agonists as described below. Wolber *et al.* developed a structure-based pharmacophore approach for screening new FXR full agonists.<sup>23,24</sup>

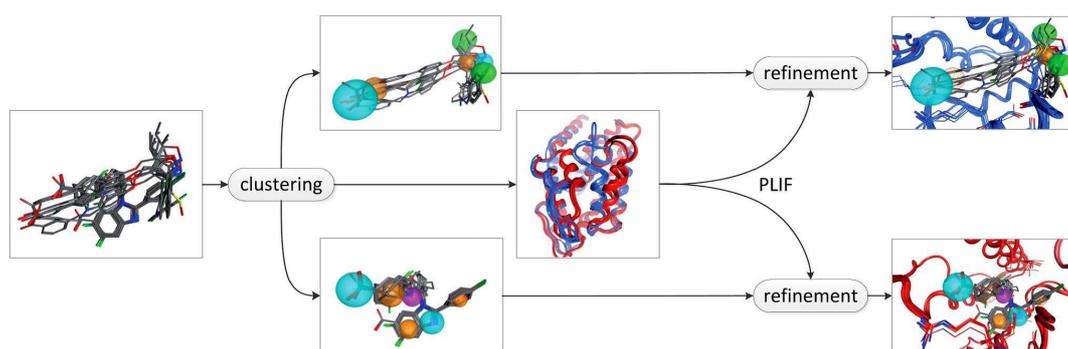
We have chosen an *in silico* approach to identify new compounds with potential to modulate FXR based on the available crystallographic data as well. Due to the described structural flexibility of the FXR ligand binding domain (LBD),<sup>23</sup> we decided to combine a ligand- and structure-based consensus pharmacophore model followed by docking analysis to compensate the potential problems regarding the modelling of the induced fit of FXR.<sup>25</sup>

First of all, due to the known conformational changes of FXR induced by a binding ligand, we manually clustered the published FXR crystal structures according to their structural similarity to the co-crystallized ligands. This clustering led to the subdivision of the available structures into two distinct conformational clusters. The first cluster (compounds derived from GW4064) contains the complexes 3FXV, 3GD2, 3HC5, 3HC6, 3DCT and 3DCU, whereas the second cluster (benzimidazole derivatives) comprises the complexes 3OKH, 3OKI, 3OLF, 3OMK, 3OMM, 3OOF and 3OOK. Afterwards, the X-ray structures of each cluster were superimposed with an average pairwise root mean square deviation (RMSD) of 0.9 Å for cluster 1, 1.225 Å for cluster 2 and 2.634 Å between all complexes from both clusters. The alignment confirmed the ligand-based clustering and illustrated the underlying induced fit of the FXR ligand binding site. To incorporate these findings into our screening workflow, we decided to perform each virtual screening step independently on both clusters.

Our virtual screening workflow can be divided into two distinct screening steps which build up on each other (Fig. 2, for a more detailed view of the pharmacophore models see ESI†). Initially, we performed a ligand-based pharmacophore search. We built two independent consensus pharmacophore models based on the co-crystallized ligands of each receptor cluster. Afterwards, similar pharmacophore features, which occurred in

at least two-third of the co-crystallized ligands of each cluster with a distance cut-off of 1.2 Å, were selected and aggregated to a common feature in each model. We limited the feature count in each model to a maximum of 6 features in order to obtain a more generalized model. Both models were used for a pharmacophore search in the Asinex compound database (v2011, incl. gold, platinum and synergy) containing 434 347 compounds. The database was prepared for the screening by applying the so-called washing routine (assigning of explicit hydrogen atoms and adequate protonation states) and subsequent conformer sampling resulting in overall 9 426 496 conformations. The pharmacophore search obtained 2658 compounds matching the model of cluster 1 and 14 022 compounds matching the model of cluster 2.

As a follow-up screening step we performed molecular docking aiming at a further restriction and additional ranking of the compounds found by the pharmacophore search. We used the MOE pharmacophore-based docking placement method, which accounts for the binding mode information of the co-crystallized ligands represented by their pharmacophore model. Due to the volume limitations of the binding pocket and the conformational flexibility of the FXR ligand binding domain, we could not use the complete pharmacophore models, which did not include the pocket information, because of the ligand-based elucidation approach. Therefore, we simplified the models by defining essential and optional pharmacophore features, which have to be matched for a successful docking placement. The definition of the essential features was supported by a receptor-driven pharmacophore feature extraction based on the Protein-Ligand-Interaction-Fingerprint (PLIF). The PLIF is a MOE tool to summarize and compare protein-ligand interactions in a fingerprint-like manner. Therefore, surface contacts, hydrogen bonds, and ionic interactions are classified according to their strength and participating type of residue, and are built into a fingerprint scheme. Since PLIF functions are based on the structural information of the receptor, its co-crystallized ligands and their 3D



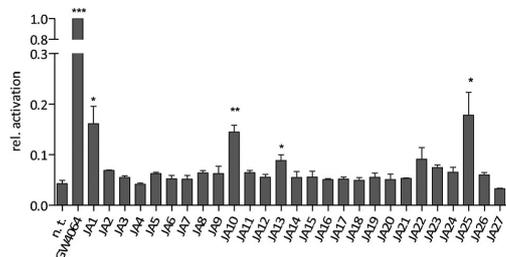
**Fig. 2** Virtual screening workflow divided into two subsequent screening steps. Initially, known co-crystallized FXR ligands were structurally clustered into two sets. We used each set of ligands to build an individual ligand-based consensus pharmacophore model, which was used for a first pharmacophore search in the Asinex database. Afterwards, each pharmacophore model was refined by a receptor-driven PLIF-based pharmacophore feature extraction and thereupon these models were used as a placement constraint for the docking. Pharmacophore features were coloured accordingly: cyan – H-bond-acceptor, orange – aromatic, green – hydrophobic, magenta – H-bond-donor. Wire-framed pharmacophore features represent non-essential features.

interactions, it is possible to use this information to deduce complement pharmacophore features of these interactions. In contrast to the ligand-based feature elucidation, this approach focuses on pharmacophore features, which participate in the underlying receptor–ligand interactions. Again, if a similar PLIF-based pharmacophore feature annotation was based on at least two-third of the underlying interactions in its receptor cluster, we selected and aggregated them to a common feature for the final model.

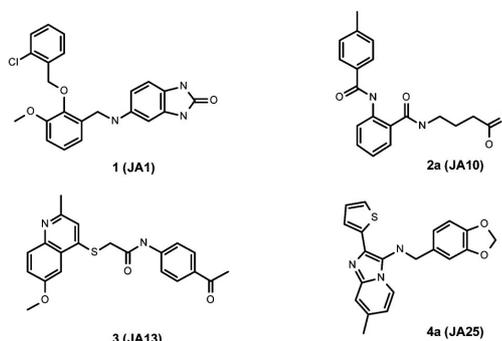
Afterwards, we compared the PLIF-based pharmacophore models with our primary ligand-based pharmacophore models and defined spatial overlapping and similar features, which occurred in both the ligand- and the PLIF-based models, to be essential features and the remaining features as optional in our new combined consensus models.

Finally, we applied these consensus models as a placement constraint for the subsequent docking of both compound sets, which resulted from the initial pharmacophore searches. For both docking runs, we used the crystal structure with the lowest average RMSD in each cluster, which was complex 3DCT for cluster 1 and complex 30MM for cluster 2, respectively. The docking was able to place and score 240 compounds of the first set and 1183 of the second set in the particular binding pockets. We analysed the top 200 compounds of each docking run to build a combined list of 27 compounds based on chemical diversity and availability for the purchasing order.

In the first instance, the ordered compounds were tested in a single concentration of 30  $\mu\text{M}$  in a cell-based FXR full-length transactivation assay. The measured FXR activation is related to the activity of the FXR full agonist GW4064 (Fig. 1), which is set at 100% activation. We observed a significant FXR activation for 4 out of the 27 compounds (Fig. 3) with a relative activation between 10% and 20%. Encouraged by the first *in vitro* screening results, we decided to use the scaffolds of compounds **1** (JA1), **2a** (JA10), **3** (JA13) and **4a** (JA25) (Fig. 4) to perform a subsequent substructure search for derivatives in the Asinex database for further characterization of the preliminary structure–activity relationship of these different chemotypes. Unfortunately, the search with the scaffolds of compounds **1** and **3** did not result in any further purchasable compounds in the Asinex database, however we could obtain 4 derivatives of compound **2a** and 11 derivatives of compound **4a**. The



**Fig. 3** Bar plot shows relative FXR activation compared to 3  $\mu\text{M}$  GW4064  $\pm$  S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by *t*-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).



**Fig. 4** Four hits obtained from the first screening round, which showed a relative FXR activation of more than 10%.

relative FXR activation of these derivatives at 30  $\mu\text{M}$  is shown in Tables 1 and 2.

The derivatives of compound **2a** (anthranilic acid derivatives, shown in Table 1) are inactive at the FXR, except compound **2b**. Here the carboxyl group of compound **2a** is substituted for a less polar hydroxyl group, impaired with lower FXR activation. The *p*-tolyl-group of compound **2a** seems to be crucial for FXR activation. The removal of the methyl group (compound **2d**) or the substitution by a 2-furyl-group (compound **2c**) leads to loss of activity.

The derivatives of compound **4a** that share the 3-aminoimidazo[1,2-*a*]pyridine-based scaffold are on par with the original compound with exception of compounds **4e**, **4f** and **4l**, which show no activity (Table 2). Both, **4e** and **4f** feature no thiophene ring, which is substituted by a 1,2-dihydro-2-oxoquinoline and a phenol group, respectively, indicating that polar substituents are not tolerable in the  $R_3$  position. In addition, the substitution of the 5-methyl-1,3-benzodioxole for a

**Table 1** Derivatives of compound **2a** and their relative FXR activation<sup>a</sup>

Cpd	$R_1$	$R_2$	Rel. act.
<b>2a</b>		COOH	14.5 $\pm$ 1.3%**
<b>2b</b>		OH	11.5 $\pm$ 0.6%**
<b>2c</b>		COOH	4.9 $\pm$ 1% (n. s.)
<b>2d</b>		COOH	4.2 $\pm$ 1% (n. s.)

<sup>a</sup> Relative FXR activation compared to 3  $\mu\text{M}$  GW4064  $\pm$  S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by *t*-test (n. s. = not significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

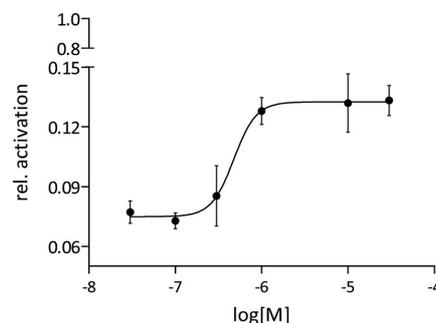
**Table 2** Derivatives of compound **4a** and their relative FXR activation<sup>a</sup>

Cpd	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Rel. act.
<b>4a</b>	H	Me			17.8 ± 4.5%*
<b>4b</b>	Me	H			16.4 ± 0.9%***
<b>4c</b>	H	H			10.1 ± 1.6%*
<b>4d</b>	H	Me			14.7 ± 1.7%**
<b>4e</b>	H	Me			Inactive
<b>4f</b>	H	Me			Inactive
<b>4g</b>	H	Me			17.3 ± 4.3%*
<b>4h</b>	H	Me			13.6 ± 2%**
<b>4i</b>	H	Me			16.2 ± 2.4%**
<b>4j</b>	H	Me			15.9 ± 2.6%**
<b>4k</b>	H	Me			14.3 ± 1.9%**
<b>4l</b>	H	Me			Inactive

<sup>a</sup> Relative FXR activation compared to 3 μM GW4064 ± S.E.M., determined in at least three independent experiments. Significance was determined by *t*-test (\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001).

benzoyl group (**4l**) results in a loss of activation, which demonstrates the importance of the amino function of the 3-amino-imidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold. By comparing the methylation patterns of the active derivatives **4b** and **4c** with compound **4a**, it is obvious that a methyl group at position 6 or 7 of the 3-amino-imidazo[1,2-*a*]pyridine core is beneficial for FXR activation. Additionally, the structure–activity relationship of the 3-amino-imidazo[1,2-*a*]pyridines shows that in active compounds different nonpolar substituents are tolerated in the R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> position, respectively.

To distinguish between weak binding compounds and genuine partial FXR agonists, we assayed the active compounds, which showed an activation of more than 10% in different



**Fig. 5** Concentration-dependent relative FXR activation of compound **4b** with a maximum relative FXR activation of about 14%, resulting in an EC<sub>50</sub> = 480 nM.

concentrations. In fact, compound **4b** (Fig. 5) showed a maximum relative FXR activation of about 14% with an EC<sub>50</sub> = 480 nM.

## Conclusions

In the present study we used known active compounds that were co-crystallized in the FXR ligand binding domain to find common pharmacophore features, which lead to a partial agonism of FXR. Because of the pronounced induced fit of the known FXR agonists, we decided to cluster the compounds and build individual pharmacophore models for each compound cluster representing the conformational changes of the underlying chemotype. Our approach illustrates that the combination of a consensus ligand- and receptor-based pharmacophore model elucidation can be used to identify relevant features, which are necessary to model the interactions of a partial FXR agonist. We ordered a total of 41 compounds of which 12 compounds can activate FXR significantly and at least one of them (**4b**) could be identified as a partial FXR agonist.

## Experimental

### Computational methods

All computational procedures were performed with MOE (Molecular Operating Environment) 2011.10. The 3D alignment of the FXR crystal structures was performed with the MOE superposition tool. Both the ligand-based and the protein–ligand interaction fingerprint-based pharmacophore models were obtained with the MOE consensus pharmacophore feature extraction approach. We used the stochastic conformational search from MOE with a RMSD cutoff of 0.8 Å (for detailed information see ESI†). For the docking study, we used the MOE pharmacophore-based placement and the 'AlphaHB' scoring function implemented in MOE for scoring and rescoring after grid minimization. Each docking run retained a maximum of 10 poses per compound. The docking was evaluated by a retrospective study with 297 known FXR ligands with an EC<sub>50</sub> of less than 10 μM obtained from the ChEMBLdb<sup>26</sup> and with 15,500 decoys generated from the DUD-E website.<sup>27</sup> Our FXR docking protocol achieved in this evaluation an enrichment factor EF<sub>50%</sub> = 50.8% and a ROC AUC of 0.873 (enrichment curve available in the ESI†).

### Full length FXR transactivation assay

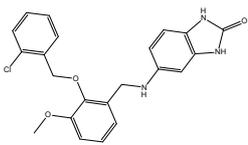
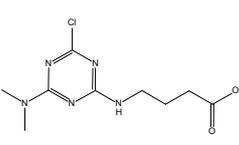
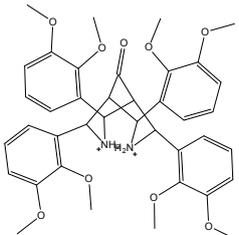
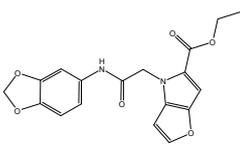
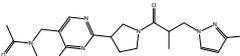
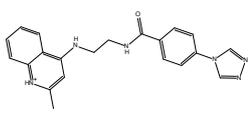
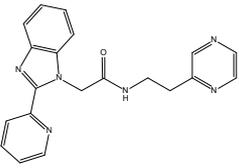
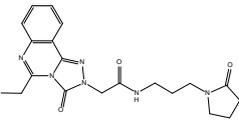
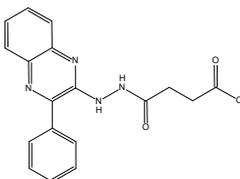
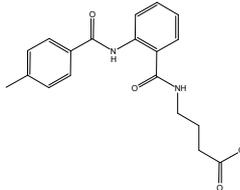
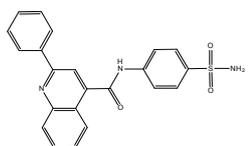
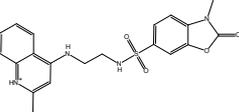
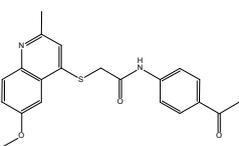
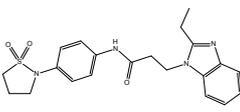
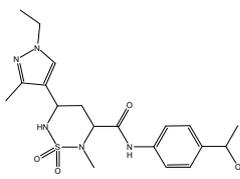
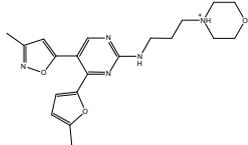
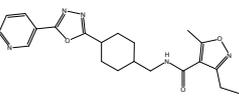
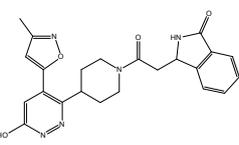
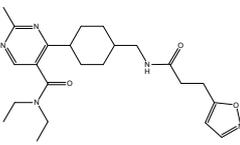
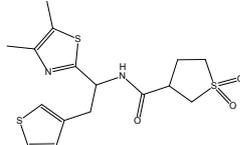
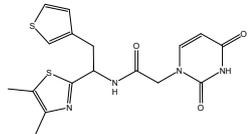
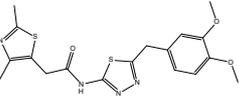
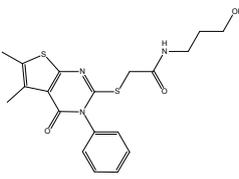
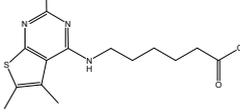
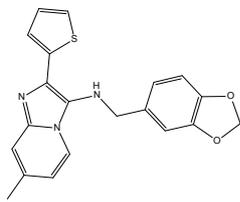
Transient transfection of HeLa cells with BSEP-pGL3, pRL-SV40 and the expression plasmids pcDNA3-hFXR and pSG5-hRXR was carried out using the calcium phosphate transfection method. 5 h after transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with SP, PS and 0.5% charcoal-stripped FCS. 24 h after transfection, medium was changed to DMEM, now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compounds or 0.1% DMSO alone as an untreated control. Each concentration was tested in triplicate wells and each experiment was repeated independently at least three times. Following 24 h incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using the Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) and luminescence was measured with a GENios Pro luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany).

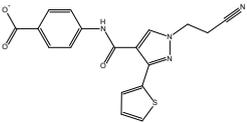
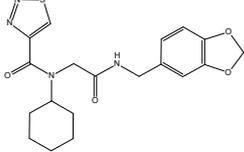
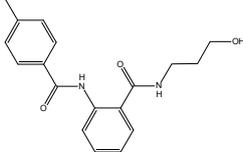
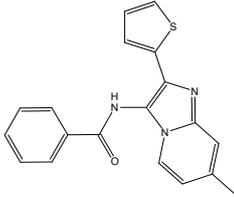
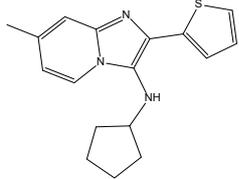
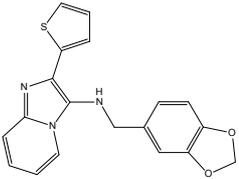
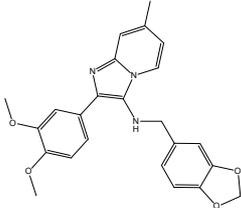
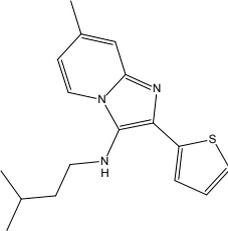
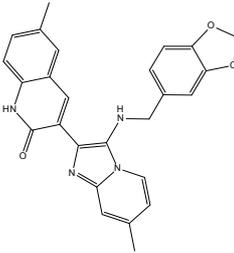
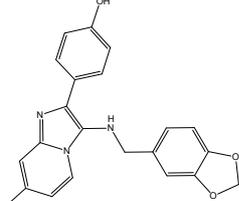
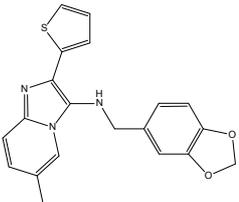
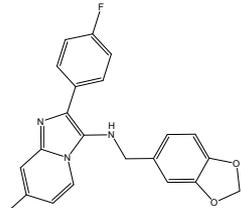
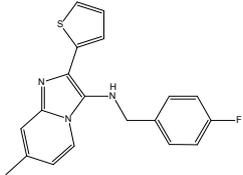
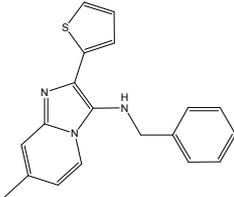
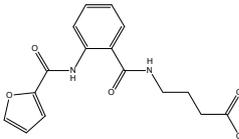
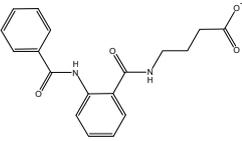
### Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; PR 1405/2-1), Oncogenic Signaling Frankfurt (OSF), Else-Kröner-Fresenius-Stiftung (EKFS) and Research Training Group Translational Research Innovation – Pharma (TRIP). J.A. thanks Merz Pharmaceuticals and Fraunhofer Projektgruppe Translationale Medizin und Pharmakologie (TMP), R.S. thanks Else-Kröner-Fresenius-Stiftung for a fellowship. We thank Chemical Computing Group for academic license of MOE software.

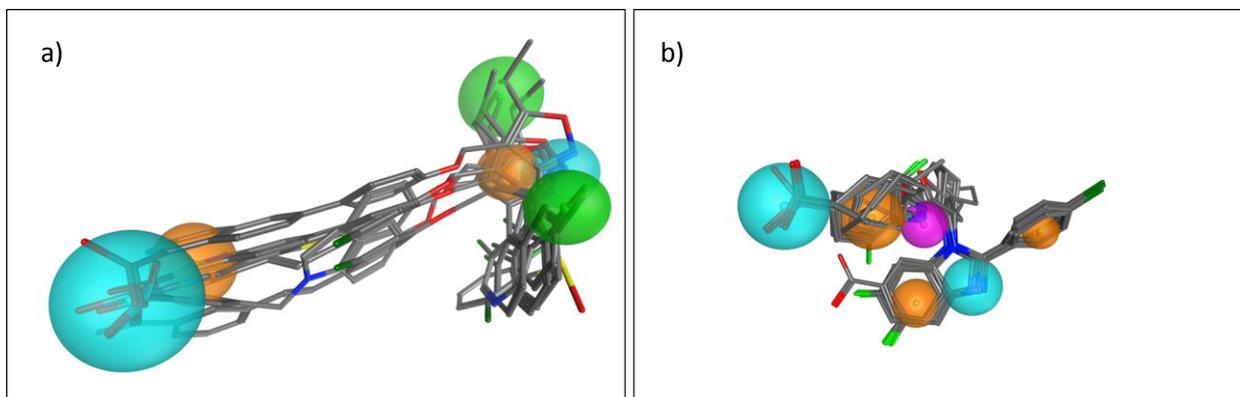
### Notes and references

- 1 L. Adorini, M. Pruzanski and D. Shapiro, *Drug Discovery Today*, 2012, **17**(17–18), 988–997.
- 2 R. M. Gadaleta, K. J. van Erpecum, B. Oldenburg, E. C. Willemsen, W. Renooij, S. Murzilli, L. W. Klomp, P. D. Siersema, M. E. Schipper, S. Danese, G. Penna, G. Laverny, L. Adorini, A. Moschetta and S. W. van Mil, *Gut*, 2011, **60**(4), 463–472.
- 3 Y. Zhang, F. Y. Lee, G. Barrera, H. Lee, C. Vales, F. J. Gonzales, T. M. Willson and P. A. Edwards, *P. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**(4), 1006–1011.
- 4 A. Mencarelli, B. Renga, E. Distrutti and S. Fiorucci, *Am. J. Physiol.: Heart Circ. Physiol.*, 2009, **296**(2), 272–281.
- 5 M. Düfer, K. Hörth, R. Wagner, B. Schittenhelm, S. Prowald, T. F. Wagner, J. Oberwinkler, R. Lukowski, F. J. Gonzales, P. Krippeit-Drews and G. Drews, *Diabetes*, 2012, **61**(6), 1479–1489.
- 6 W. Huang, K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang and D. D. Moore, *Science*, 2006, **312**(5771), 233–236.
- 7 Y. D. Wang, W. D. Chen, D. D. Moore and W. Huang, *Cell Res.*, 2008, **18**(11), 1087–1095.
- 8 S. Fiorucci, A. Mencarelli, E. Distrutti, G. Palladino and S. Cipriani, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**(2), 139–159.
- 9 P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers and B. Staels, *Physiol. Rev.*, 2009, **89**(1), 147–191.
- 10 S. Modica, R. M. Gadaleta and A. Moschetta, *Nucl. Recept. Signaling*, 2010, **8**, e005.
- 11 Intercept Pharmaceuticals, Inc., press release, Intercept Pharmaceuticals announces completion of enrollment in phase 3 primary biliary cirrhosis POISE trial, 19 December 2012, <http://ir.interceptpharma.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=727718>.
- 12 Phenex Pharmaceuticals AG, press release, Phenex reports successful completion of Phase I Studies with FXR-Agonist Px-102 and publishes research progress in two independent papers, 31 October 2012, [http://www.phenexpharma.com/pdf/PR-Phenex-Phase%20I%20finished\\_5%20M%20Euros\\_engl.pdf](http://www.phenexpharma.com/pdf/PR-Phenex-Phase%20I%20finished_5%20M%20Euros_engl.pdf).
- 13 A. Akwabi-Ameyaw, J. Y. Bass, R. D. Caldwell, J. A. Caravella, L. Chen, K. L. Creech, D. N. Deaton, S. A. Jones, I. Kaldor, Y. Liu, K. P. Madauss, H. B. Marr, R. B. McFadyen, A. B. Miller, F. N. Iii, D. J. Parks, P. K. Spearing, D. Todd, S. P. Williams and G. B. Wisely, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 4339–4343.
- 14 P. Chiang, D. C. Thompson, S. Ghosh and M. R. Heitmeier, *J. Pharm. Sci.*, 2011, **100**, 4722–4733.
- 15 D. L. Howarth, S. H. W. Law, J. M. Law, J. A. Mondon, S. W. Kullman and D. E. Hinton, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, **243**, 111–121.
- 16 B. Flatt, R. Martin, T. Wang, P. Mahaney, B. Murphy, X. Gu, P. Foster, J. Li, P. Pircher, M. Petrowski, I. Schulman, S. Westin, J. Wrobel, G. Yan, E. Bischoff, C. Daige and R. Mohan, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 904–907.
- 17 D. Merk, D. Steinhilber and M. Schubert-Zsilavecz, *Future Med. Chem.*, 2012, **4**, 1015–1036.
- 18 W. W. Cheatham, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2010, **91**, 262S–266S.
- 19 J. Kung and R. R. Henry, *Expert Opin. Drug Saf.*, 2012, **11**, 565–579.
- 20 C. Pirat, A. Farce, N. Lebègue, N. Renault, C. Furman, R. Millet, S. Yous, S. Specq, P. Berthelot, P. Desreumaux and P. Chavatte, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 4027–4061.
- 21 R. Steri, J. Achenbach, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz and E. Proschak, *Biochem. Pharmacol.*, 2012, **83**, 1674–1681.
- 22 H. G. F. Richter, G. M. Benson, D. Blum, E. Chaput, S. Feng, C. Gardes, U. Grether, P. Hartmann, B. Kuhn, R. E. Martin, J.-M. Plancher, M. G. Rudolph, F. Schuler, S. Taylor and K. H. Bleicher, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**(1), 191–194.
- 23 S. M. Soisson, G. Parthasarathy, A. D. Adams, S. Sahoo, A. Sitlani, C. Sparrow, J. Cui and J. W. Becker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 5337–5342.
- 24 U. Grienke, J. Mihály-Bison, D. Schuster, T. Afonyushkin, M. Binder, S. Guan, C. Cheng, G. Wolber, H. Stuppner, D. Guo, V. N. Bochkov and J. M. Rollinger, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 6779–6791.
- 25 M. A. Lill, *Biochemistry*, 2011, **50**, 6157–6169.
- 26 A. Gaulton, L. J. Bellis, A. P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani and J. P. Overington, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, D1100–D1107.
- 27 M. M. Mysinger, M. Carchia, J. J. Irwin and B. K. Shoichet, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 6582–6594.

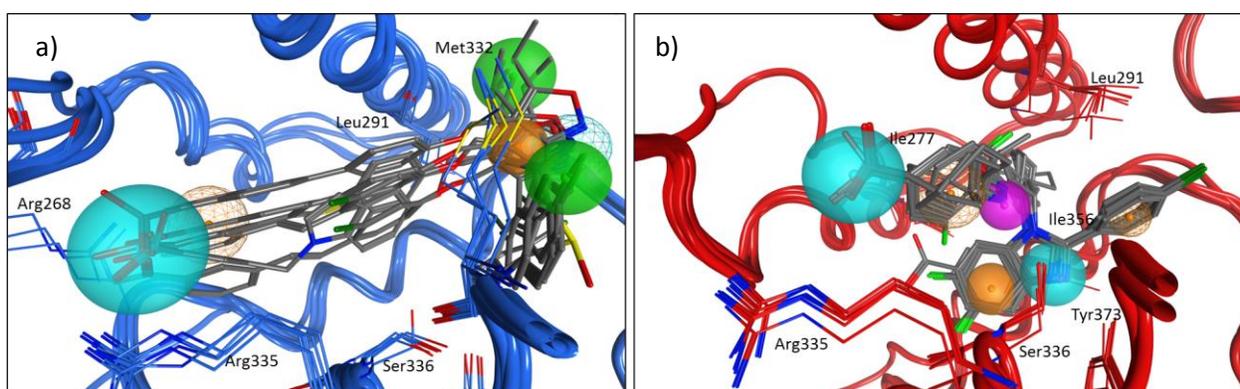
<p><b>ID: JA1</b></p>  <p>BAS 15389900</p>	<p><b>ID: JA2</b></p>  <p>BAS 07296920</p>	<p><b>ID: JA3</b></p>  <p>BAS 00659282</p>	<p><b>ID: JA4</b></p>  <p>ASN 08221997</p>	<p><b>ID: JA5</b></p>  <p>SFA 21721203</p>
<p><b>ID: JA6</b></p>  <p>SYN 23022781</p>	<p><b>ID: JA7</b></p>  <p>SYN 20002365</p>	<p><b>ID: JA8</b></p>  <p>ASN 12346579</p>	<p><b>ID: JA9</b></p>  <p>BAS 02859452</p>	<p><b>ID: JA10</b></p>  <p>BAS 01816803</p>
<p><b>ID: JA11</b></p>  <p>BAS 01936958</p>	<p><b>ID: JA12</b></p>  <p>SYN 17740348</p>	<p><b>ID: JA13</b></p>  <p>ASN 02915086</p>	<p><b>ID: JA14</b></p>  <p>SYN 22983720</p>	<p><b>ID: JA15</b></p>  <p>ADM 11770432</p>
<p><b>ID: JA16</b></p>  <p>AEM 14465584</p>	<p><b>ID: JA17</b></p>  <p>ADM 20135495</p>	<p><b>ID: JA18</b></p>  <p>LMK 13076249</p>	<p><b>ID: JA19</b></p>  <p>AEM 19281468</p>	<p><b>ID: JA20</b></p>  <p>AEM 17680239</p>
<p><b>ID: JA21</b></p>  <p>AEM 17679914</p>	<p><b>ID: JA22</b></p>  <p>SYN 20051355</p>	<p><b>ID: JA23</b></p>  <p>BAS 02072581</p>	<p><b>ID: JA24</b></p>  <p>BAS 07396174</p>	<p><b>ID: JA25</b></p>  <p>ASN 05397230</p>

<p><b>ID: JA26</b></p>  <p>BAS 09727997</p>	<p><b>ID: JA27</b></p>  <p>ASN 06481610</p>	<p><b>ID: JA10.1</b></p>  <p>BAS 01816752</p>	<p><b>ID: JA25.1</b></p>  <p>BAS 02235141</p>	<p><b>ID: JA25.10</b></p>  <p>BAS 03929640</p>
<p><b>ID: JA25.11</b></p>  <p>ASN 05397030</p>	<p><b>ID: JA25.2</b></p>  <p>ASN 05397220</p>	<p><b>ID: JA25.3</b></p>  <p>ASN 03654349</p>	<p><b>ID: JA25.4</b></p>  <p>ASN 05345967</p>	<p><b>ID: JA25.5</b></p>  <p>ASN 05397250</p>
<p><b>ID: JA25.6</b></p>  <p>ASN 05397330</p>	<p><b>ID: JA25.7</b></p>  <p>ASN 05397260</p>	<p><b>ID: JA25.8</b></p>  <p>ASN 05397232</p>	<p><b>ID: JA25.9</b></p>  <p>ASN 05397229</p>	<p><b>ID: JA10.2</b></p> 
<p><b>ID: JA10.3</b></p> 				

```
1  in_fname = 'D:/projekte/0000 - Datasets/FXR-DUD/fxr_dud.mdb';
2  in_ftype = 'moe_mdb';
3
4  opt = [
5      outputFile:'D:/projekte/0000 - Datasets/FXR-DUD/fxr_dud_conf.mdb',
6      outputFileSplit:0,
7      outputFileOpenDBV:0,
8      outputRefine:0,
9      outputStrainLimit:6,
10     outputConformationLimit:100,
11     logmdb:'',
12     logFilteredCompounds:0,
13     logOpenDBV:0,
14     newFragmentFile:'',
15     newFragmentReset:0,
16     mode:'normal',
17     logmdbkey:0,
18     filterTransitionMetal:0,
19     filterWeightLimit:0,
20     filterBigRing:0,
21     filterDHybridization:0,
22     filterDonorAcceptorLimit:0,
23     filterChiralLimit:0,
24     filterFreeChiralLimit:0,
25     filterLogPLow:-100,
26     filterLogPHigh:100,
27     filterReactive:0,
28     filterAcidBase:0,
29     filterSingleChainLimit:0,
30     filterRotatableBondLimit:0,
31     forceTransAmide:1,
32     forceTransEster:1,
33     forceChair:0,
34     forceTransConjugatedEster:1,
35     forceTransVinyl:1,
36     forceOriginalCC:0,
37     forceOriginalCN:0,
38     forceOriginalNN:0,
39     forceOriginalChirality:0,
40     fragStrainLimit:6,
41     skelStrainLimit:6,
42     mmStrainLimit:7,
43     mmFailureLimit:30,
44     mmIterationLimit:500,
45     mmIterationLimitMM:200,
46     mmGradientTestMM:0.01,
47     mmSuperposeRMSD:0.80,
48     mmConformationLimit:300,
49     saveFragmentSkeleton:0,
50     noStochasticSearch:0,
51     sampleFailures:1,
52     timeout:600,
53     silent:0
54 ];
55
56 conf_Import [in_fname, in_ftype, opt];
```



Ligand-based consensus pharmacophore for cluster 1 (a) and cluster 2 (b).



Combined PLIF- and ligand-based consensus pharmacophore for cluster 1 (a) and 2 (b).

Pharmacophore features colored accordingly: cyan = hbond-acceptor, orange = aromatic, green = hydrophobic, magenta = hbond-donor. Wireframed pharmacophore features represent not essential features, derived only from ligand-based pharmacophore model.

ROC analysis: (FXR MOE Docking)

