

# **Entwicklung und Charakterisierung neuer Farnesoid X Rezeptor-Modulatoren**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von  
Jurema Schmidt  
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main (2018)  
(D30)



*Para minha Mãezinha e meu Pai*





vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang von Goethe-Universität Frankfurt als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz  
Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Datum der Disputation: 27.11.2018



## Inhalt

1. Einführung.....	9
1.1 Farnesoid X Rezeptor.....	9
1.1.1 Struktur und Funktion.....	9
1.1.2.1 Gallensäurehomöostase.....	11
1.1.2.2 Lipid- und Glukosehomöostase.....	13
1.1.2.3 FXR und entzündliche Prozesse.....	14
1.1.3 Therapeutisches Potential des FXR.....	14
1.1.3.1 Cholestase.....	15
1.1.3.2 Gallensteine.....	15
1.1.3.3 Primäre biliäre Cholangitis (PBC).....	16
1.1.3.4 Kanzerogenese.....	16
1.1.3.5 Nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD) und Steatohepatits (NASH).....	17
1.1.4 FXR-Liganden.....	18
1.1.4.1 Natürliche Liganden.....	19
1.1.4.2 Synthetische Liganden.....	20
1.1.4.2.1 Agonisten.....	20
1.1.4.2.1.1 Partialagonisten.....	23
1.1.4.2.2 Antagonisten.....	23
1.2 Zielsetzung.....	26
2. Ergebnisse und Diskussion.....	29
2.1 Validierung nicht-steroidaler Antirheumatika als Farnesoid X Rezeptor-Liganden.....	29
2.2 Entwicklung von <i>N</i> -phenylbenzamidbasierten FXR-Antagonisten.....	38
2.3 Duale Modulatoren für den Farnesoid X Rezeptor und die lösliche Epoxidhydrolase.....	48
2.4 Nicht-azide Farnesoid X Rezeptor-Modulatoren.....	59
3. Zusammenfassung.....	62
4. Summary.....	67
5. Publikationsliste.....	69
6. Zusätzliche Publikationen.....	69
7. Literaturverzeichnis.....	70
7. Abkürzungsverzeichnis.....	79
8. Curriculum Vitae.....	85
9. Eidesstattliche Erklärung.....	87
10. Danksagung.....	88
11. Erstautor-Publikationen.....	89
11.1 NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor (Scientific Reports).....	89

<b>11.2 Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators (<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>).....</b>	<b>102</b>
<b>11.3 A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis (<i>Journal of Medicinal Chemistry</i>).....</b>	<b>110</b>
<b>11.4 Structural optimization and <i>in vitro</i> profiling of <i>N</i>-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists (<i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry</i>) .....</b>	<b>133</b>

## 1. Einführung

Nukleäre Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in vielen unterschiedlichen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Reproduktion, Entzündungen, metabolischen Vorgängen, sowie Vorgängen, in die das Immunsystem involviert ist.<sup>1</sup> Sie wirken innerhalb dieser Signalwege als ligandaktivierbare Transkriptionsfaktoren in der Genregulation.<sup>2</sup> Die Aktivierung erfolgt durch rezeptorspezifische Liganden, wodurch eine Expression eines Gens hervorgerufen oder unterdrückt wird. Diese Modulation von physiologischen Prozessen macht nukleäre Rezeptoren zu interessanten Zielstrukturen der Wirkstoffentwicklung. Viele Krankheitsbilder werden durch gestörte oder ungleichmäßige Stoffwechselwege hervorgerufen. In der modernen Gesellschaft nehmen Zivilisationskrankheiten, die mit dem metabolischen Syndrom assoziiert sind, wie beispielsweise Adipositas, ausgelöst durch einen Lebensstil mit ungesunder Ernährung und zu wenig Bewegung, immer mehr zu.<sup>3,4</sup> Daraus resultieren neben anderen Erkrankungen auch organspezifische Krankheitsbilder wie die nicht-alkoholische Fettleber (engl.: *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) und deren Komplikationen wie die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), Zirrhose oder Leberkarzinome.<sup>5,6</sup> Der Bedarf an neuen Wirkstoffen zur Behandlung solcher Metabolismus-assoziiierter Erkrankungen ist groß. Eine vielversprechende Zielstruktur für Arzneistoffe scheint hierbei der Farnesoid X Rezeptor (FXR) zu sein.<sup>3,7-10</sup> Er ist ein Gallensäurerezeptor, der auch in anderen Stoffwechselprozessen, die mit dem metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht werden, involviert ist.<sup>9,11</sup> Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung von unterschiedlichen neuen Modulatoren des Farnesoid X Rezeptors.

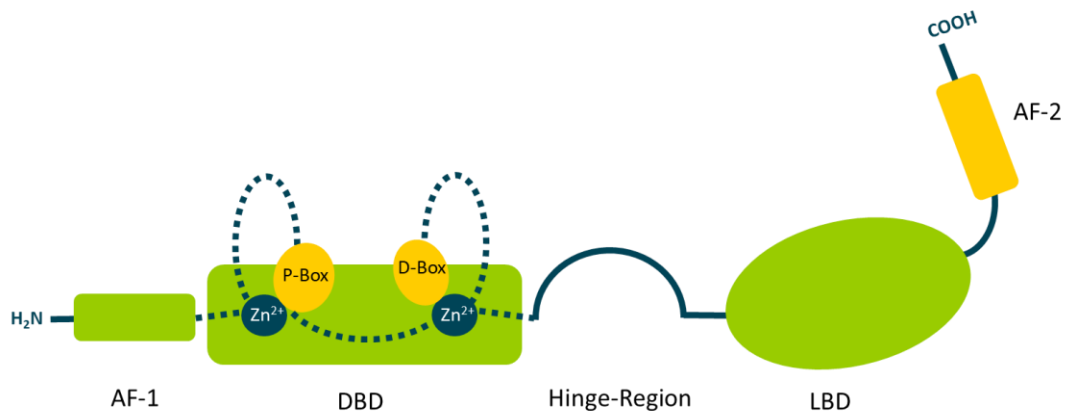
### 1.1 Farnesoid X Rezeptor

Der Farnesoid X Rezeptor (FXR) ist ein ligandaktivierter Transkriptionsfaktor, der als Gallensäuresensor agiert.<sup>2</sup> Er wird hauptsächlich in Leber, Niere und Darm exprimiert und ist beteiligt an den Selbstregulationsprozessen der Gallensäuren, was bedeutet, dass FXR bei hohen Leveln an Gallensäuren die Gallensäurebiosynthese blockiert und deren Metabolismus anregt.<sup>10,12</sup> Neben dieser Funktion ist FXR auch ein Regulator in der Glukose- und Lipidhomöostase und scheint an inflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein.<sup>12</sup>

#### 1.1.1 Struktur und Funktion

FXR gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren, die 48 Mitglieder umfasst. Die grundlegende Struktur der Mitglieder dieser Familie ist konserviert, weswegen auch FXR aus zwei großen Domänen besteht, die mit einer sogenannten Hinge-Region miteinander verknüpft sind (Abbildung 1).<sup>13</sup> Die erste große Domäne ist die zentrale DNA-Bindedomäne (DBD). Sie besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices und zwei asymmetrischen Zinkfingermotiven, welche von acht konservierten Cysteinresten umgeben sind. Am N-terminalen Zinkfingermotiv ist die sogenannte P-Box angelagert. Dieser Teil der Helix dient zur Erkennung von bestimmten DNA-Sequenzen, den Response-Elementen (engl.: *response elements*, RE).<sup>14</sup> RE sind für jeden Rezeptor spezifische Sequenzen der DNA in der Promotorregion. Die RE bestehen meist aus zwei Sequenz-Abfolgen, die jeweils aus sechs Basenpaaren aufgebaut sind.<sup>15</sup> Die Anordnung dieser Sequenzen kann sowohl als direkte, invertierte oder evertierte Wiederholung vorliegen. Eines der bekanntesten RE, das FXR bindet, ist die invertierte Wiederholung (engl.: *inverted*

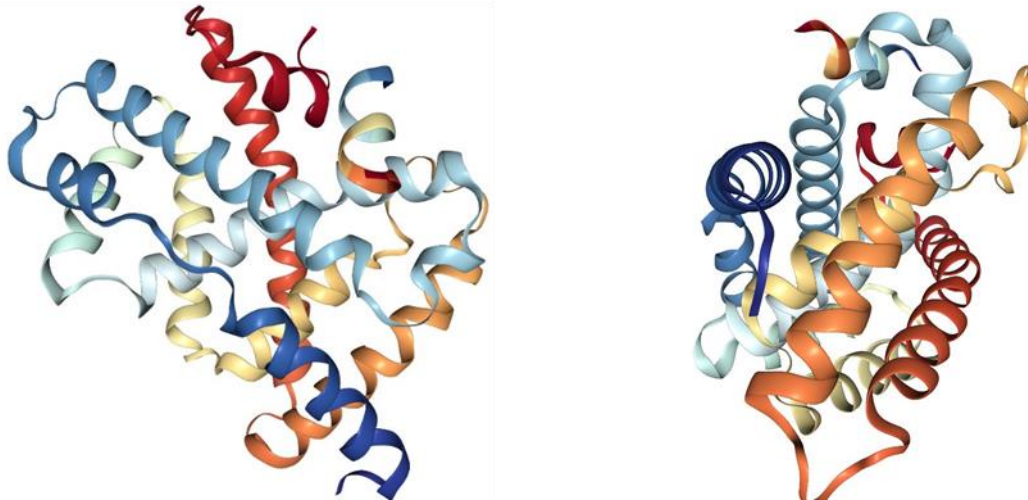
repeat, IR) der Basensequenz  $5'$ -AGGTCA- $3'$ , die durch ein Basenpaar voneinander getrennt sind (IR-1).<sup>16</sup> Es dient unter anderen zur direkten Regulation des Gallensäurenexportproteins (engl.: *bile salt export proteins*, BSEP). Lagert sich der Rezeptor an die DNA an, kommt es zur einer Konformationsänderung innerhalb der DBD. Hierbei wird am C-terminalen Zinkfingermotiv der D-Box die Möglichkeit zur Dimerisierung gegeben.<sup>17</sup> FXR bildet selten Homodimere, wie es beispielsweise bei Steroidrezeptoren, wie dem Östrogenrezeptor<sup>18</sup> vorkommt, sondern ein Heterodimer mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR). Durch eine Heterodimerbildung ist es dem Komplex möglich, an asymmetrische RE zu binden. Durch die ungleiche Struktur wird so der richtige Bindungsabstand an den unregelmäßig wiederholten Sequenzen erreicht. RXR liegt dabei am  $5'$ -Ende und FXR bindet am  $3'$ -Ende.<sup>15,19</sup> Auch wenn das Heterodimer von FXR und RXR an dem entsprechenden RE gebunden ist, kommt es noch nicht zu einer Transkription des Gens, da noch ein Co-Repressor, wie beispielsweise NCoR1 an den Komplex angelagert ist.<sup>15</sup> Erst bei der Aktivierung durch einen Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Freisetzung des Co-Repressors ermöglicht und die Rekrutierung eines Co-Aktivators auslöst, wodurch die Transkription gestartet wird.<sup>20</sup>



**Abbildung 1:** Struktur des nukleären Rezeptors. Der Rezeptor besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne, die eine Aktivierungsfunktion-1 (engl.: *activation function-1*, AF-1) besitzt und in dem Bereich zwischen zwei Zinkfingermodulen die P-Box und D-Box beinhaltet, sowie einer Ligandbindedomäne, in der sich die Bindetasche und die flexible Aktivierungsfunktion-2 (engl.: *activation function-2*, AF-2) befindet. Beide Domänen sind über die Hinge-Region miteinander verbunden.

Der Ligand bindet in der flexiblen Bindetasche der Ligandbindedomäne (LBD), welche C-terminal zur DBD liegt und mit dieser über die Hinge-Region verbunden ist.<sup>18</sup> Der Aufbau der LBD ist als sandwichartige Faltung (engl.: *sandwich fold*)<sup>21</sup> beschrieben worden (Abbildung 2). Drei antiparallele  $\alpha$ -Helices sind von einer Seite von zwei und von der anderen Seite von drei  $\alpha$ -Helices umgeben.<sup>21</sup> Die Bindetasche befindet sich innerhalb dieses Aufbaus und der Eingang ist direkt unterhalb der drei antiparallelen  $\alpha$ -Helices plaziert.<sup>22</sup> Sie besitzt ein Volumen von ca. 700 Å<sup>3</sup> und eine hydrophobe Oberfläche.<sup>22</sup> Lagert sich ein Agonist in die Bindungstasche an, findet die Konformationsänderung in die aktivierte holo-Form statt durch die Aktivierungsfunktion-2 (engl.: *activation function-2*, AF-2), die der Helix 12 (H12) entspricht.<sup>21</sup> H12 verschiebt sich dabei vor die Helices 3, 4 und 10 und schafft so Raum für eine Anlagerung von Co-Aktivatoren. Co-Aktivatoren, wie beispielsweise der Steroidrezeptor-Co-Aktivator 1 (SRC-1) besitzen eine Helix mit einem LxxLL-Motiv, wobei x hier für eine beliebige Aminosäure steht und L für Leucin, mit der sie sich an die erweiterte Bindungstasche der holo-Form des FXR-Komplexes binden können.<sup>22</sup> Diese holo-Form wird vor allem durch die Interaktion von drei Aminosäuren stabilisiert. Das Tryptophan W466 aus Helix 12, das Histidin H444 aus Helix H11 und das Tyrosin Y358 von Helix H10 agieren zwar dabei nicht direkt mit dem aktivierenden FXR-

Liganden, aber der Ligand führt zur korrekten Assemblierung der drei Aminosäuren, sodass die Konformation gehalten werden kann.<sup>21</sup>



**Abbildung 2:** Dreidimensionale Struktur der FXR-LBD von NCBI-MMDB.<sup>23</sup> Zwei unterschiedliche Winkel zur besseren Veranschaulichung des *sandwich fold*. In dunkelrot ist die AF-2 dargestellt.

#### 1.1.1.1 Subtypen

FXR wurde in vielen unterschiedlichen Spezies untersucht, wobei zwei Subtypen, FXR $\alpha$  und FXR $\beta$ , identifiziert wurden. Hierbei ist FXR $\beta$  im Menschen als Pseudogen einzustufen.<sup>21</sup> Das einzelne FXR $\alpha$ -Gen kodiert vier verschiedene Isoformen (hFXR $\alpha_{1-4}$ ), die durch unterschiedliche Spleißvarianten gebildet werden. Die meisten Zielgene von FXR können durch alle vier Isoformen aktiviert werden, einige bevorzugen jedoch eine bestimmte Isoform.<sup>24</sup>

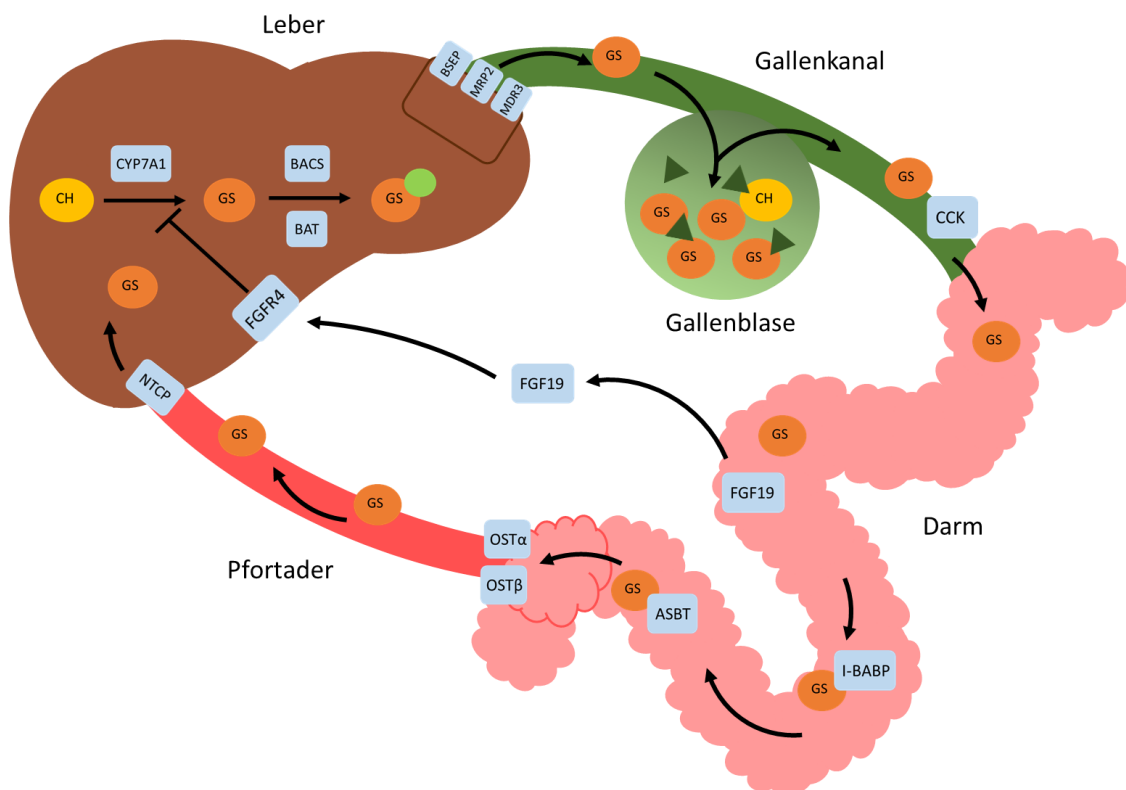
### 1.1.2 FXR-regulierte Stoffwechselwege

#### 1.1.2.1 Gallensäurehomöostase

Gallensäuren sind die natürlichen Liganden von FXR und besitzen eine steroidale Grundstruktur. Die verschiedenen Gallensäuren unterscheiden sich in der Anzahl und Position ihrer Hydroxylgruppen am Steroidgerüst. Die daraus resultierenden chemischen Eigenschaften bestimmen die unterschiedlichen biologischen Effekte.<sup>25</sup> Je hydrophober eine Gallensäure, desto höher ist ihre Toxizität und Lithogenese, während hydrophile Gallensäuren eine Exkretion der Gallensäuren aus der Leber und den Gallenfluss fördern.<sup>26,27</sup> Gallensäuren sind nicht nur Regulatoren ihrer eigenen Biosynthese oder Lösungsvermittler für Lipide, sondern auch Signalstoffe in vielen metabolischen Prozessen. Sie aktivieren FXR, aber auch G-protein-gekoppelte Rezeptoren wie TGR5.<sup>25-27</sup>

Cholesterin ist ein wichtiges Biomolekül für viele unterschiedliche Zellfunktionen, zu denen etwa Membranbiogenese oder die Biosynthese von Steroidhormonen und Gallensäuren gehören. Im Überschuss kommt es aber zu krankhaften Veränderungen, wie beispielsweise Arteriosklerose oder Bildung von Gallensteinen. Etwa die Hälfte der Exkretion von Cholesterin aus dem Körper wird durch die Umwandlung zu Gallensäuren erreicht.<sup>28</sup> Der erste und limitierende Schritt dieser Transformation wird durch das leberspezifische Cytochrom P-450-Enzym Cholesterin 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)

katalysiert.<sup>29</sup> Um eine Überproduktion von Gallensäuren zu verhindern, wird CYP7A1 indirekt von FXR supprimiert. Das kann über zwei unterschiedliche Reaktionswege passieren. Der Hauptweg führt über die direkte Induktion des orphanen nukleären Rezeptors kleiner Heterodimer-Partner (engl.: *small heterodimer partner*, SHP, NROB2). SHP ist ein direktes Zielgen von FXR und besitzt keine DBD.<sup>2,30</sup> SHP inhibiert seinerseits den ebenfalls orphanen nukleären Rezeptor Leberrezeptor-Homolog-1 (engl.: *liver receptor homologue-1*, LRH-1, NR5A2), welcher CYP7A1 positiv reguliert.<sup>28</sup> Eine SHP-unabhängige Inhibition von CYP7A1 erzielt FXR durch die Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-19 (engl.: *fibroblast growth factor-19*, FGF19) im Darm. FGF19 wandert anschließend aus den Enterozyten in die Leber und bindet dort am FGF-Rezeptor 4 (FGFR 4), wodurch die CYP7A1-Expression ebenfalls gehemmt wird.<sup>31</sup> Neben solchen indirekten Signalwegen besitzt FXR außerdem noch klassisch direkt regulierte Zielgene. FXR reguliert die Expression der Sterol-12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1), die im zweiten Katalyseschritt die relative Produktion von primären Gallensäuren kontrolliert.<sup>2,16</sup> Außerdem reguliert FXR auch die Konjugation von Gallensäuren mit Taurin oder Glycin für einen erleichterten Transport durch die kanalikuläre Membran der Hepatozyten durch die Gallensäure-CoA-Synthase (engl.: *bile acid-CoA synthase*, BACS) und die Gallensäure-CoA-Aminosäuren-N-Acetyltransferase (engl.: *bile acid-CoA amino acid N-acetyltransferase*, BAT).<sup>32</sup> Die drei wichtigsten hepatischen Transporter für Gallensäuren, deren Transkription direkt durch FXR-Aktivierung ausgelöst wird, sind das Gallensäuren-exportprotein (engl.: *bile salt export protein*, BSEP), der kanikuläre multispezifische Transporter für organische Anionen (engl.: *multidrug resistance protein 2*, MRP2) und die Phospholipid-exportierende Pumpe (engl.: *multidrug resistant-associated p-glycoprotein*, MDR3).<sup>33-35</sup>



**Abbildung 3:** Enterohepatischer Kreislauf der Gallensäuren. Die Biosynthese von Gallensäuren (GS) aus Cholesterin (CH) findet in der Leber statt. Anschließend werden die GS durch membranständige Transporter aus den Hepatozyten in die Gallenkanalikululi sezerniert und in der Gallenblase gelagert. Nach fetthaltiger Nahrungsaufnahme werden sie aus der Gallenblase in den Darm transportiert. Dort steigern GS die Löslichkeit und Resorbierbarkeit von Fetten bis sie über membranständige Transporter aus den Enterozyten in die Pfortader geschleust werden, um wieder zur Leber zurückzugelangen.  $\Delta$ =Phospholipide,  $\bullet$ =Konjugation.



Diese Transporter sind alle in der kanalikulären Membran der Hepatozyten lokalisiert und sezernieren Gallensäuren aus den Zellen in die Gallenkanalikuli. Zusammen mit Phospholipiden, Cholesterol und anderen Proteinen entsteht Galle, die anschließend in der Gallenblase gespeichert wird.<sup>32</sup> Durch Nahrungsaufnahme wird Cholecystokin (CCK) im Darm freigesetzt, was eine Exkretion von Gallensäuren in Form von Galle aus der Gallenblase bewirkt um die Löslichkeit der Nahrungsfette zu erhöhen und dadurch Lipidverdau und -absorption zu unterstützen.<sup>35</sup>

Der Großteil der im Körper befindlichen Gallensäuren, nämlich 95%, werden im Darm vom apikalen natriumabhängigen Gallensäuretransporter (engl.: *apical sodium-dependent bile acid transporter*, ASBT) und dem ilealen Gallensäurebindepotein (engl.: *ileal bile acid-binding protein*, I-BABP) wieder aufgenommen.<sup>21,32,35</sup> Der Rücktransport aus den Enterozyten in die Leber erfolgt zunächst über die Transporter für organische gelöste Stoffe  $\alpha/\beta$  (engl.: *organic solute transporter  $\alpha/\beta$* , OST $\alpha/\beta$ ) in die Pfortader um von dort über das Natriumtaurocholat-Co-Transporterprotein (NTCP) in die Leber aufgenommen zu werden und damit den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren zu vervollständigen (Abbildung 3).<sup>36</sup> OST $\alpha/\beta$  sind ebenfalls direkte Zielgene von FXR. Sie liegen in der basolateralen Plasmamembran vor und sorgen so für weniger zytotoxische Nebeneffekte durch Gallensäuren.<sup>10,32,35,37</sup>

### 1.1.2.2 Lipid- und Glukosehomöostase

In Mäusen, in denen spezifisch die Expression von FXR ausgeschaltet wurde (engl.: *knockout*) konnte nicht nur ein Anstieg der Konzentration von Cholesterol im Plasma beobachtet werden, auch erhöhte Triglyceridwerte wurden nachgewiesen, was auf einen Einfluss von FXR auf den Lipidstoffwechsel schließen lässt.<sup>38</sup> Die Biosynthese von Triglyceriden (TG) erfolgt in der Leber und wird durch die Fettsäuresyntheserate bestimmt.<sup>39</sup> Ein Regulationsfaktor davon ist der Subtyp 1c des Sterol-Regulator-element-Bindeprotein (engl.: *sterol regulatory element-binding protein*, SREBP-1c). Es besteht aus 1150 Aminosäuren und gehört zur Familie der membrangebundenen Transkriptionsfaktoren. SREBP-1c ist der Hauptregulator des hepatischen Fettsäurestoffwechsels. Darunter fällt die Transkription der ATP-Citratlipase, die Acetyl-CoA als Grundbaustein der Fettsäuresynthese produziert, sowie der Acetylcarboxylase, der Fettsäuresynthase (FAS) und der Glycerol-3-phosphatase, welches das erste Enzym der TG- und Phospholipidsynthese ist.<sup>10,39</sup> In Maushepatozyten konnte *in vitro* durch Zugabe von Chenodesoxycholsäure (engl.: *chenodesoxycholic acid*, CDCA, **3a**), einem natürlichen FXR-Agonisten, beobachtet werden, dass die Aktivität von SREBP-1c gemindert wurde.<sup>40</sup> Die Verbindung von FXR-Aktivierung durch CDCA und der Hemmung von SREBP-1c kann, ähnlich wie die Signalwege bei CYP7A1, durch die Wirkung von SHP erklärt werden. FXR löst hier wieder eine erhöhte Expression von SHP aus und dieses wiederum inhibiert SREBP-1c, was zu einem niedrigen TG-Spiegel führt.<sup>40</sup> Auch FXR-*Knockout*-Mäuse bestätigen diesen Signalpfad, da bei ihnen nur eine reduzierte SHP-Expression stattfinden kann und erhöhte Werte von TG sowohl im Serum als auch in Hepatozyten gemessen wurden.<sup>41</sup> Ein weiterer Regulationsfaktor der Fettsäuresyntheserate ist der Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ , NR1C1), der die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren anregt.<sup>42</sup> Die Hauptexpressionsgewebe von PPAR $\alpha$  sind Leber, Niere und braunes Fettgewebe, aber auch der Darm. FXR ist in den gleichen Geweben vorhanden und aufgrund von einer großen Vielzahl an Übereinstimmungen in den Regulationen unterschiedlicher metabolischer Reaktionswege wurde festgestellt, dass PPAR $\alpha$ -Expression direkt durch FXR positiv reguliert wird.<sup>43</sup>

Innerhalb der unterschiedlichen Reaktionswege, in denen PPAR $\alpha$  aktiv ist, wird auch die Pyruvatdehydrogenasekinase 4 (PDK4) von PPAR $\alpha$  reguliert, was bedeutet, dass eine Aktivierung von FXR eine erhöhte Expression von PDK4 zur Folge hat.<sup>44</sup> PDK4 ist ein wichtiges Enzym in der Glykolyse und dient zur Inaktivierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (engl.: *pyruvate dehydrogenase complex*, PDC). PDC sorgt für die Umwandlung von Glukose zu Acetyl- und Malonyl-CoA und führt letztendlich zur Fettsäuresynthese.<sup>45</sup>

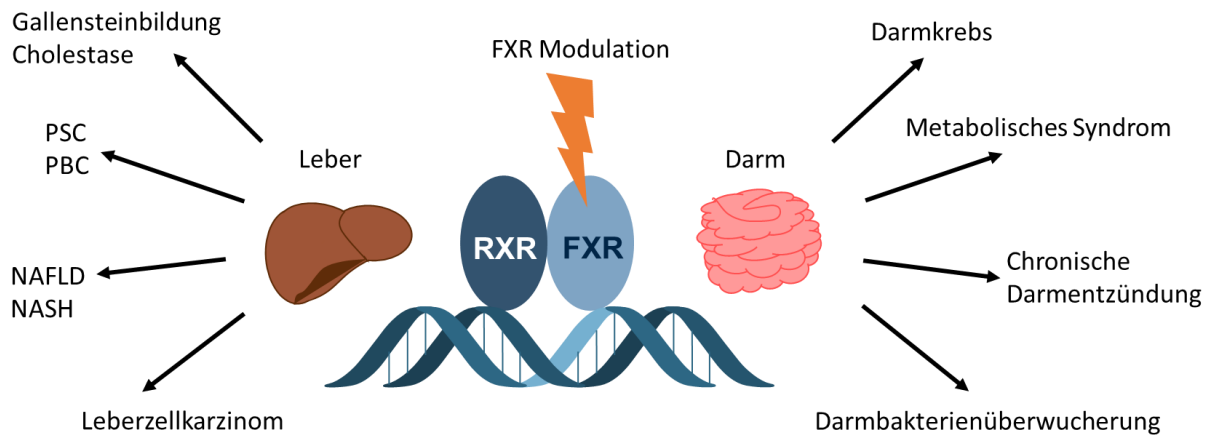
Hepatische Glukoneogenese spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase. Die Aufgabe der Leber besteht in der Kontrolle der Glukoselevel im Blut und daraus resultierend die entsprechende Modulation der Glukoneogenese, sowie der Glykogensynthese. Der erste Schritt der Glukoneogenese wird katalysiert durch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK), während der letzte Schritt durch die Glukose-6-phosphatase (G6Pase) bestimmt wird. Eine FXR-Aktivierung durch einen Agonisten führt hierbei zu einer Induktion von PEPCK und zu einer Repression von G6Pase. Daraus folgen reduzierte Glukoselevel im Plasma, sowie eine Erhöhung des Glykogenspiegels und der Glykogensynthese in der Leber.<sup>46,47</sup>

### 1.1.2.3 FXR und entzündliche Prozesse

FXR besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften durch die negative Regulation der Expression von pro-inflammatorischen Genen.<sup>48</sup> Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des natürlichen FXR-Liganden CDCA (**3a**) eine Minderung des inflammatorischen Schadens in der Leber erreicht werden konnte. Innerhalb dieser Untersuchungen konnten auch verminderte Transaminaseaktivitäten und eine abgeschwächte Expression von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und TNF- $\alpha$  festgestellt werden.<sup>49</sup> Eine Schlüsselfigur in entzündlichen Prozessen stellt der nukleäre Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) dar, da er in vielen inflammatorischen Krankheitsbildern in erhöhter Konzentration detektiert wurde. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als Antwort auf Lipopolysacchride (LPS) oder pro-inflammatorische Zytokine, die als Schutzmechanismus gegen eine Infektion gebildet werden, hat eine verminderte transkriptionale Aktivität von vielen nukleären Rezeptoren zur Folge.<sup>50</sup> FXR wirkt NF- $\kappa$ B entgegen, indem die Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B mit der zu transkribierenden DNA-Sequenz minimiert und so die Zielgene von NF- $\kappa$ B supprimiert werden.<sup>50</sup>

### 1.1.3 Therapeutisches Potential des FXR

Die Vielfalt der regulatorischen Mechanismen, in die FXR eingreift, sowie die unterschiedlichen Expressionsorte, die über den ganzen Körper verteilt sind, machen FXR zu einem möglichen Therapieangriffspunkt in vielerlei Krankheiten. In zahlreichen Studien konnte eine Dysfunktion von FXR in Zusammenhang mit hepatischen, systemischen und gastrointestinalen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Abbildung 4).<sup>51</sup>



**Abbildung 4:**FXR-Modulation in hepatischen und intestinalen Erkrankungen.

### 1.1.3.1 Cholestase

Ein Symptom vieler chronischer Lebererkrankungen ist die Cholestase, hierbei ist der normale Gallenfluss gestört. Der Auslöser kann entweder in einer funktionalen Störung innerhalb der Hepatozyten oder in einer Verstopfung der Gallenkanalikuli liegen.<sup>12</sup> Das führt zu erhöhten Gallensäurekonzentrationen, die Leberschäden oder Gelbsucht hervorrufen können.<sup>10</sup> In FXR-*Knockout*-Mausmodellen mit abgebandenen Gallenkanal konnte beobachtet werden, dass die komplette Auslöschung von FXR leberprotektive Effekte erzeugt. Durch eine fehlende Aktivität von FXR wird die Expression der Transporter inhibiert, die Gallensäuren in die Gallenkanalikuli sezernieren, beispielsweise BSEP oder MDR2. Im Gegensatz dazu wird die Expression des Transporters MRP4 begünstigt, was eine erhöhte Freisetzung von Gallensäuren in den Blutkreislauf zur Folge hat. Von dort werden sie dann über die Niere ausgeschieden.<sup>52</sup> Auf dieser Grundlage sind FXR-Antagonisten eine mögliche Behandlungsstrategie für Cholestase.<sup>52,53</sup>

### 1.1.3.2 Gallensteine

In der Gallenflüssigkeit ist Cholesterol mit Gallensäuren und Phospholipiden innerhalb von Mizellen solubilisiert. Bei einer Übersättigung wird die Löslichkeit von Cholesterol innerhalb von Flüssigkristallen mit Phospholipiden erzeugt. Kristallisiert Cholesterol innerhalb dieses Gefüges und fällt aus, entstehen Gallensteine und daraus folgend eine Gallenblasenentzündung.<sup>54</sup> FXR-Agonisten führten im Mausmodell über die direkt von FXR regulierten Transporter zu einem gesteigerten Transport von Gallensäuren und Phospholipiden in die Leber. Die dadurch verbesserte Löslichkeit von Cholesterol reduziert dessen Präzipitation in Form von Gallensteinen.<sup>54</sup> Die tatsächliche Anwendung ist jedoch beschränkt, da durch eine Aktivierung von FXR eine Inhibition von CYP7A1 stattfindet, was zu einer verminderten Gallensäuresynthese aus Cholesterol führt. Das bedeutet, weniger Gallensäuren stehen zur Solubilisierung von mehr Cholesterol zur Verfügung, was wiederum zur Bildung von Cholesterolkristallen führen kann.<sup>12</sup>

### 1.1.3.3 Primäre biliäre Cholangitis (PBC)

Primäre biliäre Cholangitis (PBC) ist eine progressive Autoimmunkrankheit, die hauptsächlich bei Frauen im mittleren Alter auftritt. Sie ist charakterisiert durch die Zerstörung von Gallengängen, was zu Fibrose führt.<sup>55</sup> Wie bei einer gewöhnlichen chronischen Cholestase schreitet die Krankheit mit stetig abnehmendem Gallenfluss voran, wodurch die toxische Gallensäurekonzentration innerhalb der Hepatozyten zunimmt, was zu Leberschäden führt. Die Entwicklung der PBC durchläuft zwei Phasen. Während in der ersten Phase über einen längeren Zeitraum nur wenige und reversible Entzündungen sowie Cholestase zu beobachten sind, ist die zweite Phase im Wesentlichen von irreversibler Zerstörung gekennzeichnet.<sup>56</sup> Unbehandelt kann sich PBC zur Zirrhose entwickeln und tödlich verlaufen.<sup>55,57</sup> Zur Behandlung wird die nicht-zytotoxische Gallensäure Ursodeoxycholsäure (engl.: *ursodeoxycholic acid*, UDCA, **1**) eingesetzt. UDCA ist ein Epimer zu CDCA (**3a**), aber kein Ligand von FXR.<sup>9</sup> Auch wenn eine Behandlung einer durch Gallensäureanstauung ausgelösten Symptomatik durch die Gallensäure UDCA (**1**) zunächst widersprüchlich erscheint, ist es ein möglicher Therapieansatz, da die wesentlich hydrophilere UDCA (**1**) mit den physiologischen Gallensäuren um die Bindung an FXR konkurriert und so anti-apoptische und anti-entzündliche Eigenschaften besitzt.<sup>56</sup> Ein großer Patientenanteil von fast 40% spricht jedoch nicht auf UDCA (**1**) an und hat ohne eine Lebertransplantation geringere Überlebenschancen im Vergleich zu Patienten, bei denen UDCA (**1**) wirksam ist.<sup>58</sup> Der semisynthetische FXR-Agonist Obeticholsäure (OCA, **5**) erwies sich in dieser Patientengruppe als wirksame Ersatztherapie.<sup>9,58</sup> Es konnten bei der Gabe von OCA (**5**) im Vergleich zur Placebogruppe um 25% reduzierte Konzentrationen der alkalischen Phosphatase und 35% reduzierte Konzentrationen der Alaninaminotransferase beobachtet werden. Signifikante Verbesserungen konnten auch bei unterschiedlichen Leberenzymen wie Gamma-Glutamyltransferase festgestellt werden.<sup>59</sup> Auch die Werte von Entzündungsmarkern wie TNF- $\alpha$  und Immunglobulin M (IgM) konnten durch OCA (**5**) optimiert werden.<sup>9</sup> Seit 2016 ist OCA (**5**) zur Behandlung von PBC als Zweitlinientherapie zugelassen.<sup>60</sup>

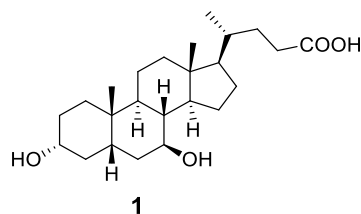


Abbildung 5: Ursodeoxycholsäure UDCA (**1**).

### 1.1.3.4 Kanzerogenese

Zusätzlich zur wichtigen regulatorischen Rolle von FXR innerhalb von Gallensäurehomöostase, Lipid- und Glukosemetabolismus gibt es immer mehr Hinweise, dass FXR auch Einfluss auf die Krebsentstehung in Leber, Darm und Speiseröhre besitzt.<sup>36</sup> Gerade ein Leberzellkarzinom zählt nicht nur zu den fünf am weitesten verbreiteten Krebserkrankungen, sondern steht auch auf Platz zwei der am häufigsten tödlich verlaufenden Krebsarten. Meist ist der Entwicklung eines Leberzellkarzinoms eine chronisch entzündliche Lebererkrankung vorausgegangen. Dazu gehören Hepatitis B und C, sowie die alkoholische und nicht-alkoholische Fettleber und Cholestase. Durch eine chronisch erhöhte Gallensäurekonzentration innerhalb der Hepatozyten kommt es zu oxidativen Schäden der DNA, Entzündungen, Apoptoseresistenz und einer erhöhten Proliferation der Zellen.<sup>61</sup> FXR ist der Hauptregulator der Gallensäuren sowie ein Inhibitor von NF- $\kappa$ B und moduliert die Expression von SHP,

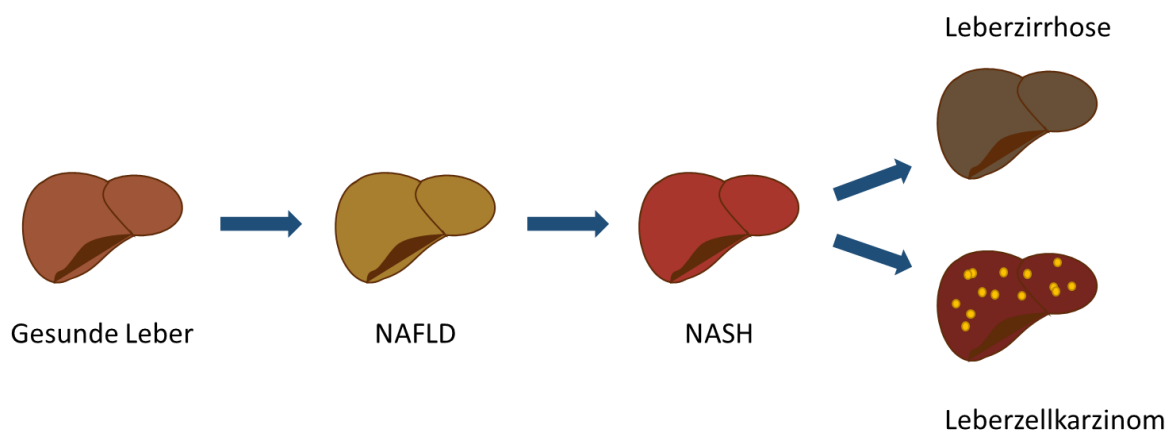
welches seinerseits ebenfalls ein Tumorsuppressor ist. All das macht FXR zu einem interessanten Therapieweg, um hepatische Entzündungen und krankhafte Hyperproliferation der Leberzellen zu adressieren.<sup>62</sup>

Eine Darmkrebserkrankung ist die vierthäufigste tödlich verlaufende Krebsart und ist neben genetischen Faktoren auch stark mit einem bewegungsarmen Lebensstil und einer fett- und kohlenhydratreichen Ernährung verknüpft. Eine solche Ernährung führt zu erhöhten Konzentrationen an Gallensäuren im Darm, was zu einer chronischen Entzündung des Darmes und in Kombination mit Hyperproliferation zu Darmkrebs führen kann.<sup>63</sup> In FXR-*Knockout*-Mäusen konnte eine erhöhte Zellwachstumsrate und ein Tumorwachstum im Darm festgestellt werden und bei der Aktivierung von intestinalem FXR wurde ein vermindertes Karzinomaufreten, sowie eine erhöhte Apoptoserate beobachtet.<sup>64</sup> In Barrett-Ösophagus und den daraus resultierenden Ösophaguskarzinomen kommt es, als Folge von chronischem Sodbrennen durch toxische Gallensäurelevel und Magensäure, zu Schädigungen der Speiseröhrenschleimhaut.<sup>65</sup> In gesunden Speiseröhrenzellen kommt es zu keiner Expression von FXR, doch in Patienten mit Barrett-Ösophagus und den daraus resultierenden Tumoren wurden hohe Konzentration von FXR und dessen Zielgenen SHP und I-BABP beobachtet. Guggulsteron (**4**), einem natürlichen FXR-Antagonisten, konnte *in vitro* eine Minderung der Entzündung in Barrett-Ösophagus und Ösophaguskarzinomen hervorgerufen werden, woraus sich eine therapeutische Anwendung für FXR-Antagonismus entwickeln lässt.<sup>53,65</sup>

### 1.1.3.5 Nicht-alkoholische Fettleber (NAFLD) und Steatohepatits (NASH)

Unter dem Begriff des metabolischen Syndroms sind eine Reihe von unterschiedlichen Stoffwechselstörungen zusammengefasst. Darunter fallen beispielsweise Übergewicht und Bluthochdruck, Insulinresistenz und Hypertriglyceridämie. Die nicht-alkoholische Fettleber (engl.: *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) gilt als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms.<sup>6</sup> Die hepatologische Histologie kann dabei sehr unterschiedlich sein. NAFLD geht einher mit Fettakkumulationen in der Leber, zentraler Adipositas, chronischer Leberentzündung, Insulinresistenz und als Folge Diabetes Mellitus Typ 2.<sup>12,51,66</sup> Mittlerweile ist NAFLD die am häufigsten auftretende chronische Lebererkrankung mit einer Prävalenz von 20-40% in der Bevölkerung in Industrieländern.<sup>9</sup> Aus der anfänglichen NAFLD kann sich die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) entwickeln. Das Krankheitsbild von NASH beinhaltet neben den Symptomen der NAFLD Schädigung der Hepatozyten durch Fettakkumulation, hohe Entzündungswerte und oxidativen Stress. In schweren Fällen kommt es zur Fibrose, was wiederum zu einer Leberzirrhose oder zum Leberzellkarzinomen führen kann (Abbildung 6).<sup>4,9</sup> Der Schlüssel für die Therapie der Symptome liegt hierbei in der Behandlung der chronischen Entzündung, durch die NAFLD sich zur schwerwiegenderen NASH entwickelt.<sup>67</sup> Bis heute sind eine gesunde Ernährung und Sport noch nicht durch eine medikamentöse Therapie zu ersetzen.<sup>5,68</sup> Im irreparablen Zustand hilft letztendlich nur eine Lebertransplantation.<sup>51,69</sup> Glitazone galten als vielversprechende Möglichkeit in der Therapie des Diabetes Mellitus Typ 2, da sie die Insulinsensitivität erhöhen. Glitazone zeigen aber auch klinische Wirksamkeit in der Behandlung von NAFLD und NASH. Der PPAR $\gamma$ -Agonist Pioglitazon erreichte innerhalb einer Phase-II Studie eine verminderte Steatose, niedrigere Entzündungswerte und auch gesenkte Nekrose in Folge verringerter Fettakkumulation innerhalb der Hepatozyten. Jedoch hatte es keinerlei Einfluss auf die Fibrose der Patienten und führte zu einer Gewichtszunahme.<sup>70</sup> Eine andere Behandlungsstrategie sind daher FXR-Agonisten, da sie nicht nur antientzündliche, sondern auch anti-fibrotische Effekte aufweisen.<sup>27</sup> FXR wird durch Agonisten nicht nur im Zusammenhang des Gallensäuremetabolismus moduliert, sondern kann auch in den Lipid-

und Glukosehaushalt eingreifen.<sup>9,27</sup> Bei einem Defizit an FXR konnte eine erhöhte Kollagenexpression festgestellt werden, was ein erstes Anzeichen einer Fibroseentwicklung darstellt.<sup>51</sup> In diesem Zusammenhang hat die Obeticholsäure (OCA, **5**), ein semisynthetisches Derivat der primären Gallensäure Chenodesoxycholsäure (CDCA, **3a**), innerhalb einiger Studien nicht nur die Insulinsensitivität erhöht und regulatorisch auf Glukose- und Lipidmetabolismus eingewirkt, sondern auch die Entzündungswerte und den Fortschritt der Fibrose beeinflusst.<sup>9</sup> Diese Studien, ausgehend von den vielversprechenden Ergebnissen von OCA (**5**) zur Behandlung von PBC, wurden in Patienten mit NASH durchgeführt, die noch keine Zirrhose entwickelt hatten. Innerhalb der FLINT-Studie (steht für engl.: *Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic acid in NASH Treatment*) wurden die positiven Eigenschaften von OCA (**5**) auf die histologischen Auswirkungen von NASH dokumentiert und damit die Hypothese eines FXR-Agonisten als Behandlungsoption bekräftigt. Doch zum vollständigen Abklingen der Krankheit reichen die erlangten Verbesserungen durch die Therapie mit OCA nach aktuellen Daten wohl nicht aus.<sup>8</sup>



**Abbildung 6:** Fortschreiten der Fettlebererkrankungen.

#### 1.1.4 FXR-Liganden

Die Modulation von nukleären Rezeptoren kann durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Ligandenarten stattfinden. Strukturell gesehen stabilisiert ein Agonist die aktivierte holo-Form des Rezeptors durch seine Interaktion mit der Helix 12 (AF-2). Die daraus resultierende Konformationsänderung setzt die Transkriptionskaskade in Gang. Eine gegenteilige Wirkung erzielt ein Antagonist, da dadurch eine aktive Konformation verhindert wird. Ein Antagonist kann Einfluss auf die Aktivierung, die Dimerisierung oder sogar die Interaktion des Rezeptors mit seinen *response elements* haben. Durch Kristallisationsversuche der LBD mit unterschiedlichen Ligandenarten konnte festgestellt werden, dass die Helix 12 immer unterschiedliche ligandeninduzierte Positionierungen einnehmen kann und sich nicht nur ein klassisches Schalterprinzip von aktiver und inaktiver Form hervorrufen lässt.<sup>71,72</sup> Während die Modulation eines Antagonisten nur in Konkurrenz mit einem Agonisten messbar ist, inhibiert ein inverser Agonist die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors auch ohne Anwesenheit eines Agonisten. Helix 12 wird hierbei zwischen einer agonistischen und antagonistischen Position stabilisiert.<sup>72,73</sup> Eine weitere Ligandenart stellen die partiellen Agonisten bzw. Antagonisten dar. Sie verfügen über eine große Affinität zum Rezeptor, aber nur moderate Aktivierungseffizienz im Vergleich zum Vollagonisten.<sup>72</sup>

### 1.1.4.1 Natürliche Liganden

Zunächst waren keine physiologischen Liganden für FXR bekannt und er wurde vorerst als orphaner Rezeptor bezeichnet (engl.: *orphan*, Waise). Auf der Suche nach natürlichen Liganden führten Formann *et al.*<sup>74</sup> ein Screening mit Farnesolmetaboliten in einem Luziferase-Reporterassay durch und erzielten mit dem Juvenilehormon (JH III) und Farnesol (**2**) gegenüber anderen Derivaten wie Farnesal oder Farnesylacetat eine Aktivierung von FXR. Jedoch konnte bei beiden Substanzen weder eine spezifische Bindung, noch eine Aktivierung aller FXR-Spezies nachgewiesen werden. Die physiologische Menge von JH III und Farnesol (**2**) innerhalb der Zelle liegt außerdem unter der benötigten Konzentration für eine Aktivierung und doch war diese Entdeckung namensgebend für den orphanen Rezeptor zum Farnesoid X Rezeptor.

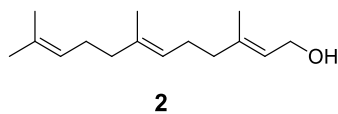


Abbildung 7: Farnesol (**2**).

Die Hypothese Gallensäuren als potentielle natürliche Liganden für FXR in Erwägung zu ziehen, wurde 1999 gleich von mehreren unterschiedlichen Arbeitsgruppen<sup>2,75,76</sup> publiziert. Nachdem die Umwandlung von Cholesterol in Gallensäuren von Leber X Rezeptor (LXR) reguliert wird, wurde angenommen, dass ein weiterer nukleärer Rezeptor an der Modulation der Umkehrreaktion beteiligt sein könnte. Eine Voraussetzung wäre die Fähigkeit Gallensäuren zu binden. Als möglicher Kandidat wurde FXR ausgewählt, weil Gallensäuren in den Geweben vorkommen, in denen er exprimiert wird, nämlich vor allem in Leber, Niere und Darm. Des Weiteren sind LXR und FXR nah miteinander verwandt, sie werden der gleichen Gruppe innerhalb der Thyroidhormonrezeptor-ähnlichen Unterfamilie zugeteilt. Beide Rezeptoren bilden Heterodimere mit RXR um an ihre *response elements* in der DNA zu binden. Mithilfe eines Luziferase-Reporterassay wurde ein Screening von unterschiedlichen Gallensäuremetaboliten durchgeführt. Die größte Aktivierung von FXR konnte bei der primären Gallensäure Chenodesoxycholsäure (engl.: *chenodesoxycholic acid*, CDCA, **3a**) detektiert werden. Die dazu benötigten Konzentrationen lagen sowohl beim murinen FXR mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 50 µM, als auch bei der humanen Spezies mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 10 µM innerhalb des zellulären Konzentrationsbereichs der Gallensäuren. Zusätzlich wurde überprüft, ob auch andere nukleäre Rezeptoren durch Gallensäuren aktiviert werden können. CDCA (**3a**) zeigte an HNF4, LXR $\alpha$  und RXR $\alpha$  im Vergleich zu FXR keine Modulation.<sup>2</sup> Die sekundären Gallensäuren Lithocholsäure (engl.: *lithocholic acid*, LCA, **3b**) und Desoxycholsäure (engl.: *desoxycholic acid*, DCA, **3c**) erzielten weit geringere Aktivierung an FXR als CDCA (**3a**).<sup>2</sup>

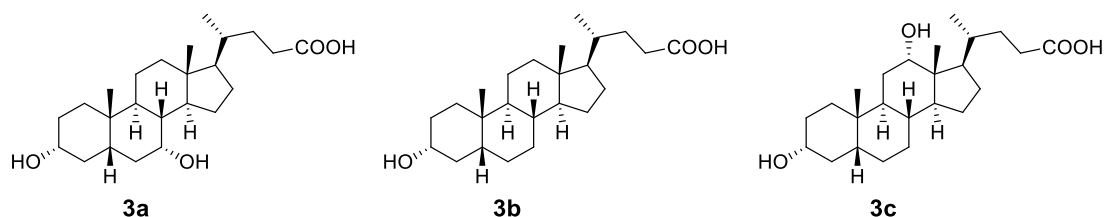
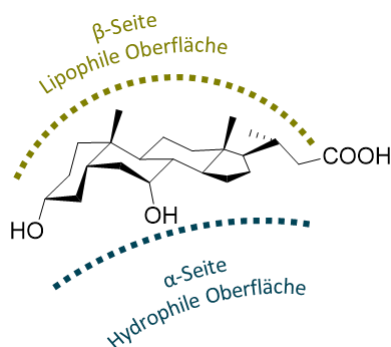


Abbildung 8: Natürliche FXR-Liganden: CDCA (**3a**), LCA (**3b**) und DCA (**3c**).

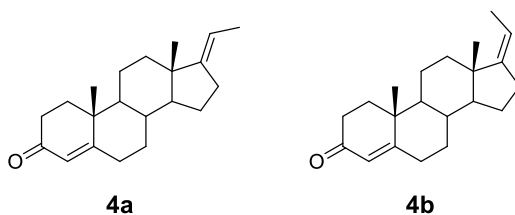
Wenn ein Ligand in die Ligandenbindungsdomäne eines nukleären Rezeptors bindet, kommt es innerhalb dieser Domäne zu einer Konformationsänderung, die die Rekrutierung von Co-Aktivatoren

begünstigt. Nur bei FXR konnte eine Interaktion mit dem Co-Aktivatoren SRC-1 in Folge einer Inkubation mit CDCA (**3a**) nachgewiesen werden.<sup>75</sup> Dadurch konnte die Hypothese, dass Gallensäuren als physiologische Liganden für FXR zu sehen sind, nachgewiesen werden. Gallensäuren sind trotz ihrer steroidal Grundstruktur selektiv für FXR. Dessen Bindetasche beinhaltet eine konvexe hydrophobe Oberfläche und parallel dazu eine konkave hydrophile Oberfläche. Bei einem genaueren Blick auf die Gallensäuren fällt auf, dass das scheinbar planare Steroidgerüst abgerundet ist und dadurch eine optimale Passform für die sichelförmige Bindetasche von FXR besitzt (Abbildung 9). Zusätzlich kommt es neben der räumlichen Nähe zu einer starken Bindung, da auch die amphiphilen Seiten von Ligand und Rezeptor aufeinander abgestimmt sind.<sup>12</sup>



**Abbildung 9:** Räumliche Ausrichtung der amphiphatischen Eigenschaften der Gallensäuren am Beispiel von CDCA (**3a**).

Ein natürlicher FXR-Antagonist ist Guggulsteron (**4**), welches aus dem Extrakt des Harzes von *Commiphora mukul* gewonnen wird. Der Extrakt besteht aus vielen unterschiedlichen Komponenten, aber nur die isolierten Stereoisomere *E*-(**4a**) und *Z*-Guggulsteron (**4b**) konnten im Nagermodell eine Senkung von Cholesterin in der Leber bewirken. Des Weiteren konnte eine CDCA (**3a**)-induzierte FXR-Aktivierung von Guggulsteron (**4**) inhibiert werden, indem es die Rekrutierung eines Co-Aktivatoren verhindert. Der Mechanismus einer solchen Wirkung von Guggulsteron (**4**) konnte jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt werden und aufgrund seiner Modulation an anderen nukleären Rezeptoren ist Guggulsteron (**4**) nicht selektiv an FXR. Der therapeutische Nutzen von Guggulsteron (**4**) ist daher fragwürdig.<sup>77</sup>



**Abbildung 10:** Struktur der aktiven Bestandteile des Guggul-Extraktes: *E*-(**4a**) und *Z*-Guggulsteron (**4b**).

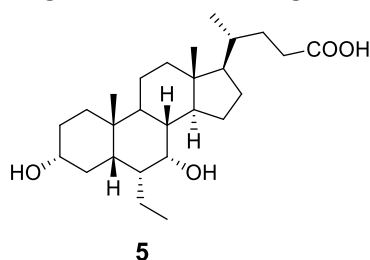
## 1.1.4.2 Synthetische Liganden

### 1.1.4.2.1 Agonisten

Der semi-synthetische FXR-Ligand Obeticholsäure (OCA, INT-747, **5**) ist ein 6 $\alpha$ -Ethylderivat von CDCA (**3a**) und besitzt eine fast 100-fach potentere Wirkung an FXR.<sup>3,9,58,78</sup> OCA (**5**) besitzt anti-cholestatistische, anti-entzündliche und anti-fibrotische Effekte durch seine selektive agonistische Wirkung an FXR.<sup>58</sup> Direkt und indirekt wird durch die Zugabe von OCA (**5**) die Gallensäurensynthese

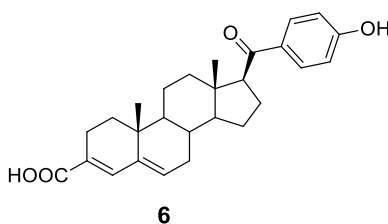


gehemmt und der Transport von Gallensäuren aus der Leber gefördert, wodurch die Leber vor einer Intoxikation durch zu hohe Gallensäurekonzentrationen geschützt wird.<sup>60</sup> OCA (**5**) erhöht die Insulinsensitivität und beeinflusst die Glukosehomöostase und den Lipidmetabolismus.<sup>9</sup> Diese Eigenschaften von OCA (**5**) machen es zu einem Kandidaten zur Therapie von PBC<sup>58</sup> und NAFLD<sup>3,78</sup> bzw. NASH.<sup>8,9</sup> In Patienten mit PBC wurde nach der Einnahme von OCA (**5**) eine Verbesserung der alkalischen Phosphatasewerte und verschiedenen anderen Leberenzymen, wie Gamma-Glutamyl-Transpeptidase (GGT) und Alaninaminotransferase (ALT), festgestellt.<sup>58</sup> Inflammatorische Marker wie das C-reaktive Protein (CRP) und Immunglobulin M (IgM) wurden im Vergleich zur Placebogruppe reduziert und die Aktivierung von FXR wurde durch eine erhöhte Konzentration von FGF19 bewiesen.<sup>60</sup> Juckreiz wurde als einzige Nebenwirkung innerhalb dieser Studien festgestellt.<sup>58,60,79</sup> Seit 2016 ist OCA (**5**) zur Behandlung von PBC als Zweitlinientherapie auf dem Markt.<sup>60</sup> Aufgrund der Ergebnisse der klinischen Studien mit PBC-Patienten wurde OCA (**5**) auch als mögliche Therapie für andere hepatische Erkrankungen untersucht. In der FLINT-Studie (steht für engl.: *Farnesoid X Receptor Ligand Obeticholic acid in NASH Treatment*) wurde der Einfluss von OCA (**5**) auf NASH untersucht.<sup>8</sup> Es konnte beobachtet werden, dass, signifikant im Vergleich zur Placebokontrollgruppe, eine Verbesserung der hepatischen Steatose und einer Verkleinerung der Fetteinlagerungen innerhalb der Hepatozyten durch die Behandlung mit OCA (**5**) eingetreten ist. Die Entzündungswerte wurden gesenkt und die Fibrose gemindert. Jedoch reichten die histologischen Verbesserungen nicht aus, um NASH zurückzubilden.<sup>8</sup>



**Abbildung 11:** CDCA-Derivat Obeticholsäure (OCA, **5**)

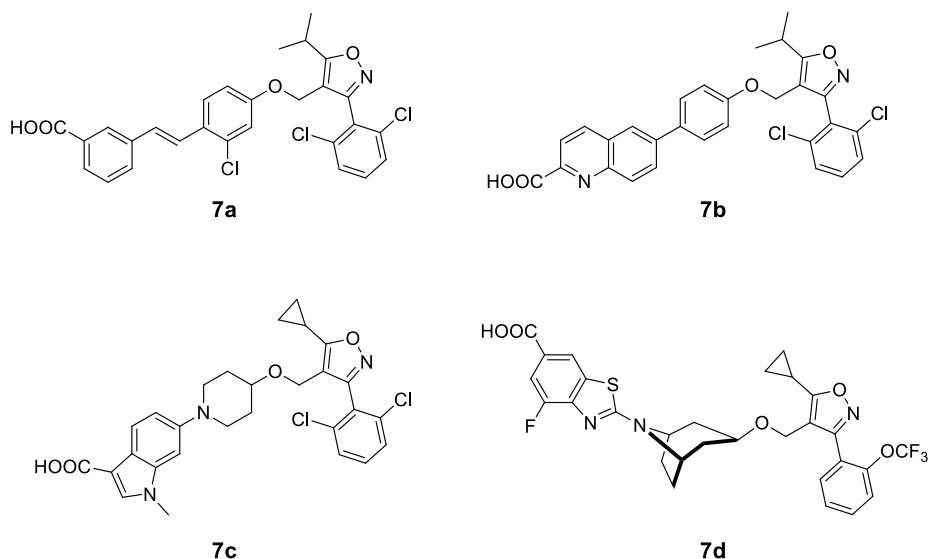
Im Vergleich mit CDCA (**3a**) besitzt der synthetische Ligand Merck-FXR-Agonist (MFA-1, **6**) eine potentere Wirkung an FXR.<sup>12</sup> Durch die steroidale Grundstruktur liegt die Vermutung nahe, dass MFA-1 (**6**) sich ähnlich wie OCA (**5**) in der Bindetasche von FXR anordnen sollte. Doch im Vergleich zu Gallensäureliganden liegt MFA-1 (**6**) 180° rotiert vor.<sup>80</sup>



**Abbildung 12:** Synthetischer Ligand MFA-1 (**6**).

Das Isoxazol GW4064 (**7a**) wurde bei einem Screening einer Substanzbibliothek als potenter synthetischer, nicht-steroidaler FXR Agonist identifiziert. Auffallend ist neben dem Isoxazol-Strukturelement auch die Stilben-Funktion. GW4064 (**7a**) besitzt einen EC<sub>50</sub>-Wert von 70 nM und bindet an FXR und an viele G-protein-gekoppelte Rezeptoren wie TGR5.<sup>12,81</sup> Bis heute wird GW4064 (**7a**) als Standardreferenzsubstanz zur Aufklärung der physiologischen Funktion von FXR benutzt.<sup>10</sup> Eine therapeutische Anwendung ist aufgrund seiner geringen Selektivität, seiner potentiellen Zelltoxizität, seiner Lichtempfindlichkeit und seiner schlechten Bioverfügbarkeit ausgeschlossen.<sup>12,82</sup> Da das Stilben als

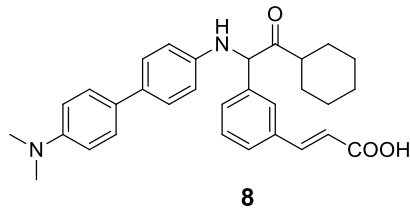
toxisches Pharmakophor identifiziert wurde, folgten eine Reihe von Analoga (**7b-7d**) von GW4064 (**7a**) ohne dieses Strukturelement.



**Abbildung 13:** GW4064 (**7a**) und seine Derivatisierungen GSK2324 (**7b**), LY2562175 (**7c**) und Tropifexor (**7d**).

Die Wasserlöslichkeit dieser Substanzklasse wurde durch den Austausch des Stilbens durch eine Quinolin-Struktur in GSK2324 (**7b**) deutlich verbessert. Dabei wurde die Wirksamkeit nicht gemindert. Innerhalb eines Mausmodells konnte ein Rückgang an Glukose- und Triglyceridkonzentrationen beobachtet werden.<sup>82</sup> Um die physikalisch chemischen Eigenschaften weiter zu verbessern und eine wirkstoffähnlichere Struktur zu erzielen, wurde in LY2562175 (**7c**) der mittlere Phenylring durch eine Piperidin-Funktion ersetzt. Diese Modifikation führte zu einem teilweisen Verlust an FXR-Aktivierungseffizienz.<sup>83,84</sup> Die Synthese von Tropifexor (LJN452, **7d**) mit einem Nortropinylbenzothiazol-Strukturelement führte zu einem potenten Isoxazolderivat, das nicht nur FXR in unterschiedlichen Expressionsorten aktiviert, sondern auch aufgrund seiner günstigen Pharmakokinetik in Phase 2 klinischen Studien in Patienten mit PBC und NASH untersucht wird.<sup>83</sup>

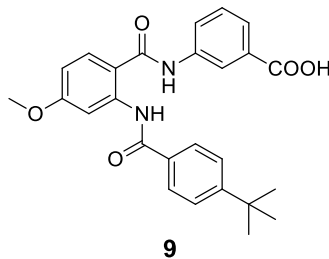
Einen potenten synthetischen Vollagonist mit einem  $EC_{50}$ -Wert von 25 nM stellt Fexamin (**8**) dar. Es wurde zur Validierung der physiologischen Funktionen von FXR benutzt und wurde dafür als erster synthetischer FXR-Ligand in der aktivierten Form von FXR co-kristallisiert.<sup>22</sup> Fexamin (**8**) unterscheidet sich strukturell stark von CDCA (**3a**) oder GW4064 (**7a**), was ein Grund für das unterschiedliche Expressionsprofil der Zielgene im Vergleich mit diesen beiden Liganden sein kann, das auf eine Genselektivität hindeutet. Durch die unterschiedliche Struktur kommt es zu einem anderen Verbund mit der LBD, was Einfluss auf die Konformationsänderung hat. So wird durch Fexamin (**8**) die Anlagerung von anderen Co-Faktoren begünstigt, als das bei GW4064 (**7a**) der Fall ist.<sup>22</sup> Zurzeit wird Fexamin (**8**) als potentieller darmspezifischer FXR-Agonist untersucht, da die Substanz kaum aus dem Darm resorbiert wird.<sup>85</sup>



**Abbildung 14:** Fexaramin (**8**).

#### 1.1.4.2.1.1 Partialagonisten

Innerhalb der unterschiedlichen Krankheiten, für die FXR-Modulation als potentieller Therapieansatz denkbar ist, sind gerade die metabolischen Dysfunktionen für eine stabile Langzeitbehandlung prädestiniert. Dafür werden Wirkstoffe benötigt, die bei einer solchen Therapiedauer sicher und gut anwendbar sind. Viele FXR-Agonisten weisen aber noch negative Eigenschaften wie Toxizität und eine schlechte Bioverfügbarkeit auf.<sup>86</sup> Zusätzlich kann eine volle Aktivierung eines nukleären Rezeptors wie FXR, der in metabolischen Prozessen involviert ist, über einen längeren Behandlungszeitraum zu einer Vielzahl an Nebenwirkungen führen.



**Abbildung 15:** Potentester Partialagonist (**9**) der Anthranilsäurederivate nach Merk *et al.*<sup>87</sup>

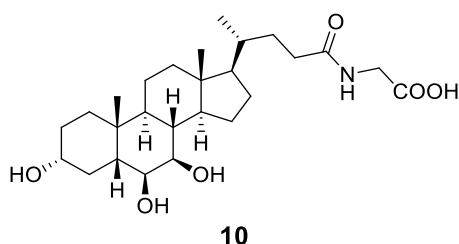
Außerdem muss eine maximale Aktivierung des Rezeptors für einen positiven Behandlungseffekt nicht zwingend vorhanden sein, wodurch Partialagonisten als eine neue Therapieoption erscheinen.<sup>88</sup> Eine neue Klasse von Partialagonisten stellen die Anthranilsäurederivate von Merk *et al.*<sup>87,89</sup> dar. Durch computerchemische Berechnungen der Substanzstruktur in der LBD von FXR erscheinen die azide Kopfgruppe, sowie der lipophile Acylsubstituent als essenziell für die FXR-Aktivierung.<sup>87,89</sup> Der potenteste Partialagonist (**9**) dieser SAR-Studien besitzt einen  $EC_{50}$ -Wert von  $0,008 \pm 0,003 \mu\text{M}$  mit einer Maximalaktivierung an FXR von  $17,5 \pm 0,7\%$ .<sup>87</sup>

#### 1.1.4.2.2 Antagonisten

Während die Anzahl an FXR-Agonisten groß ist und deren therapeutischer Nutzen stetig steigt, müssen FXR-Antagonisten und ihre Anwendung noch genauer untersucht werden. FXR-Aktivierung stellt in vielen metabolischen Erkrankungen eine Behandlungsoption dar, aber auch eine Überaktivität von FXR kann schädlich sein. Eine ausgewogene Modulation von FXR innerhalb der unterschiedlichen Stoffwechselprozesse ist wünschenswert und bedarf daher auch die Entwicklung von Antagonisten.<sup>53</sup> FXR-Antagonismus führt zu einer erhöhten Gallensäurekonzentration und verminderten Cholesterolverwerten innerhalb der Leber. Dieser Vorgang kann sich vorteilhaft auf Hypercholesterinämie auswirken.<sup>53,90</sup> Dabei wird die Lipidhomöostase optimiert und so Übergewicht reduziert.<sup>53</sup> Der Ort der FXR-Modulation scheint aber auch einen großen Einfluss auf dessen Wirkung zu haben. Die Inhibition

von FXR im Darm kann sich beispielsweise positiv auf Insulinresistenz, Übergewicht und NAFLD auswirken.<sup>91</sup>

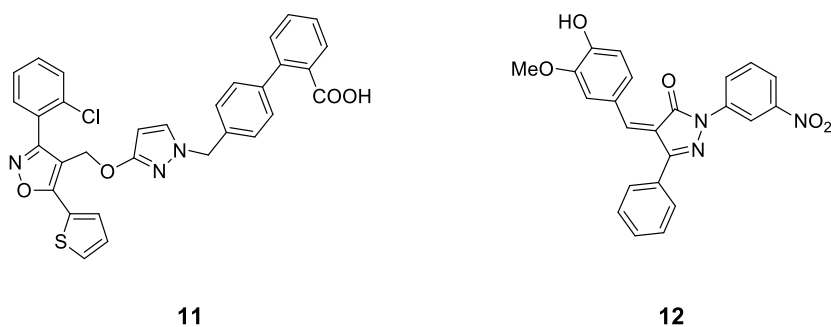
Innerhalb dieser Hypothese wurde Glycin- $\beta$ -Muricholsäure (engl.: *glycine- $\beta$ -muricholic acid*, Gly-MCA, **10**) auf seine darmspezifische FXR-Modulation untersucht.<sup>92</sup> Gly-MCA (**10**) ist eine synthetische Gallensäure, die FXR-antagonistisch wirkt und im Darm nicht hydrolysiert wird. In übergewichtigen Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von Gly-MCA (**10**) zu verbesserter Insulinsensitivität, gemindertem Übergewicht und zurückgehender Steatose führt. Im Umkehrschluss konnte in einem Mausmodell mit spezifischem FXR-*Knockout* im Darm keine Verbesserung der metabolischen Parameter durch Fütterung mit Gly-MCA (**10**) beobachtet werden. Der Vorteil einer gewebespezifischen FXR-Inhibitor liegt hierbei in der Prävention von toxischen Effekten durch erhöhte Gallensäurelevel in anderen FXR-exprimierenden Geweben.<sup>92</sup>



**Abbildung 16:** Struktur von Glycin- $\beta$ -Muricholsäure (**10**).

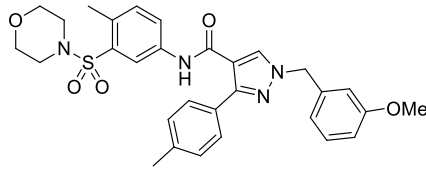
Eine steroidale Grundstruktur wie in Gly-MCA (**10**) hat jedoch eine fragliche Selektivität gegenüber anderen nukleären Rezeptoren, da dieses Grundgerüst häufig in unterschiedlichen Liganden vorkommt.<sup>93</sup> Die Entwicklung von nicht-steroidalen Antagonisten steht daher im Fokus zur Untersuchung der konformellen und physiologischen Auswirkungen von FXR-Antagonismus.<sup>53</sup>

Ausgehend von GW4064 (**7a**) wurden nicht nur Agonisten, sondern auch Antagonisten entwickelt. Dabei wurde der mittlere Phenylring mit einem Pyrazolelement in **11** ersetzt.<sup>93</sup> Ein ähnliches Pharmakophor verwenden auch die substituierten Pyrazol-4-carbamide wie **12**.<sup>53,90</sup>



**Abbildung 17:** FXR-Antagonisten **11** und **12**, die auf dem Isoxazolstrukturelement von GW4064 basieren.

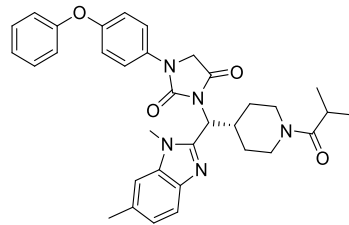
Beide Klassen zeigen *in vitro* und *in vivo* moderate antagonistische Modulation an FXR mit einem IC<sub>50</sub>-Wert um 4  $\mu$ M. Basierend auf den Pyrazol-4-carbamid (**12**) wurde innerhalb von Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung die Klasse der 1,3,4-trisubstituierten Pyrazolone<sup>94</sup> als eine der potentesten nicht-steroidalen FXR-Antagonisten eingeführt.<sup>53</sup> Der potenteste Kandidat **13** besitzt einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,47 $\pm$ 0,008  $\mu$ M in Konkurrenz mit 0,4  $\mu$ M GW4064 (**7a**).



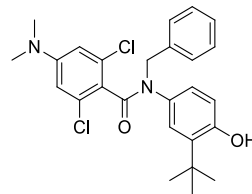
13

Abbildung 18: 1,3,4-substituiertes Pyrazolcarboxamid **13**.

Eine strukturelle Diversität ist bei stetig gleichen Pharmakophor aber nicht gegeben. Mehr Diversität bieten teilweise die nicht-aziden Benzimidazole<sup>95</sup> wie **14** oder NBD (**15**).<sup>96</sup> Das potenteste Derivat (**14**) der nicht-aziden Benzimidazole besitzt in einem FXR-FRET-Bindungsassay einen  $IC_{50}$ -Wert von  $0,095 \pm 0,002 \mu M$  und reguliert die Expression der FXR-Zielgene BSEP, SHP und  $OST\alpha$  herunter.<sup>95</sup> NBD (*N*-Benzyl-*N*-(3-*tert*-butyl)-4-hydroxyphenyl)-2,6-dichloro-4-(dimethylamino)benzamid, **15**) hat einen etwas höheren  $IC_{50}$ -Wert mit  $2,6 \mu M$  gegen  $0,5 \mu M$  GW4064 (**7a**).<sup>96</sup> Die LBD von FXR konnte im Komplex mit NBD (**15**) kristallisiert und analysiert werden. Dabei wurde festgestellt, dass NBD (**15**) mit Helix 11 und 12 wechselwirkt und die Bildung von FXR-Homodimeren fördert.<sup>96</sup>



14



15

Abbildung 19: Nicht-azider FXR-Antagonist **14** und NBD (**15**).

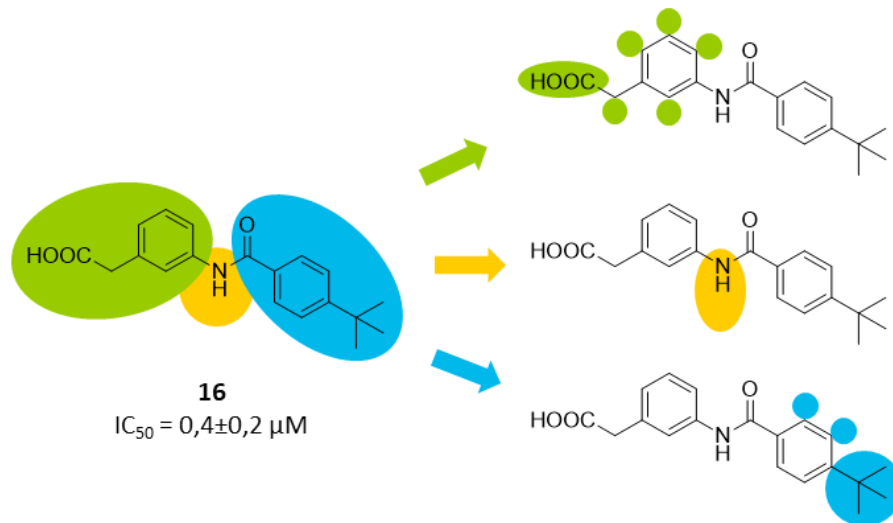
## 1.2 Zielsetzung

Die mögliche therapeutische Anwendung von FXR-Liganden ist sehr breit und vielversprechend.<sup>9,38,50,60,79</sup> Doch bis heute ist nur die Obeticholsäure (OCA, **5**) als Zweitlinientherapie der primären biliären Cholangitis (PBC) auf dem Arzneimittelmarkt angekommen.<sup>60</sup> Viele andere verfügbare FXR-Liganden weisen zwar eine hohe Potenz auf, ihnen fehlt es aber häufig an geeigneten pharmakokinetischen Eigenschaften oder Selektivität gegenüber anderen Rezeptoren, weswegen viele klinische Studien frühzeitig abgebrochen werden.<sup>8,12,86,97</sup> Die strukturelle Diversität verfügbarer FXR-Liganden, insbesondere FXR-Antagonisten, ist noch begrenzt. Eine sichere und selektive Validierung der physiologischen Effekte und strukturellen Mechanismen von FXR wird außerdem benötigt, um neue Wirkstoffkonzepte für hepatische und metabolische Krankheitsbilder zu entwickeln.<sup>86</sup> Um dem Mangel an strukturell neuartigen FXR-Liganden zu begegnen, wurden innerhalb dieser Arbeit neue Modulatoren des Farnesoid X Rezeptors entwickelt und hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften untersucht.

FXR-Antagonismus ist neben einigen möglichen Behandlungsoptionen für Krankheitsbilder, die aus einer Überexpression von FXR resultieren, ein wichtiger Bestandteil für das Verständnis der FXR-Modulation. Von Lu *et al.*<sup>98</sup> wurde die These aufgestellt, dass nicht-steroidale Antirheumatika (engl: *non-steroidal anti-rheumatic drugs*, NSAIDs) wie Ibuprofen (**19**) oder Diclofenac (**21**) als FXR-Antagonisten wirken und daher bei chronischer Einnahme zu Leberschäden führen könnten. Basierend auf dieser Hypothese sollten neue Leitstrukturen für sichere und anti-inflammatorisch wirkende NSAIDs entwickelt werden, die nicht mit FXR interagieren. Des Weiteren erschienen NSAIDs als kleine Moleküle mit günstigen Stoffeigenschaften strukturell geeignet, als neue Leitstrukturen für nicht-steroidale FXR-Antagonisten weiterentwickelt zu werden, um FXR-Antagonismus und dessen Auswirkungen besser untersuchen zu können. Für die Weiterentwicklung dieser Hypothesen galt es im Rahmen dieser Arbeit die von Lu *et al.* veröffentlichten Ergebnisse<sup>98</sup> zunächst zu reproduzieren und anschließend weiterzuentwickeln. Da sich innerhalb der ersten Charakterisierungen der NSAIDs keinerlei antagonistische Aktivität an FXR feststellen ließ, wurde die Entwicklung von Leitstrukturen aus NSAIDs eingestellt und eine vollständige biochemische Evaluation der NSAIDs und ihrer vermeintlichen Wirkung an FXR durchgeführt.<sup>99</sup> Die Ergebnisse sind in Kapitel 2.1 *Validierung nicht-steroidaler Antirheumatika als Farnesoid X Rezeptor-Liganden* zusammengefasst. Die daraus entstandene Veröffentlichung ist im Kapitel 11.1 *NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor (Scientific Reports)* zu finden.<sup>99</sup>

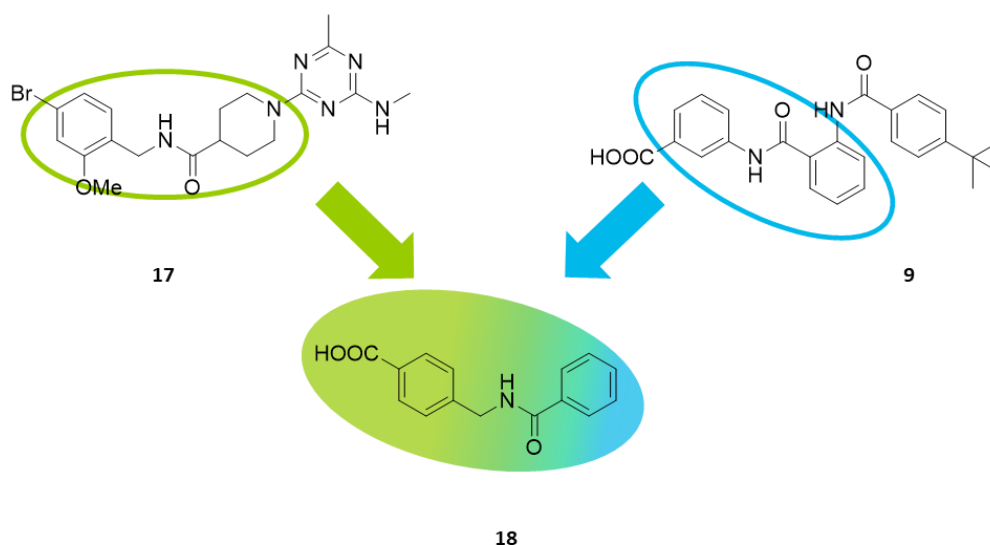
Um die physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von FXR-Antagonismus zu untersuchen, werden strukturell diverse und potente FXR-Antagonisten benötigt. Auch wenn NSAIDs wie oben beschrieben keinen Ausgangspunkt für diese Entwicklung mehr boten, sollte eine potentielle Leitstruktur gefunden und durch systematische Studien der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (engl: *structure activity relationship*, SAR) optimiert werden. Eine geeignete Leitstruktur (**16**) wurde während der Entwicklung von Anthranilsäurederivaten als FXR-Partialagonisten innerhalb der Arbeitsgruppe identifiziert.<sup>87,89</sup> Die ersten SAR-Schritte an der Molekülgrundstruktur dieses *N*-Phenylbenzamidderivates **16** sollten sich damit beschäftigen, inwieweit die Variation der Position der Carboxylfunktion und die Länge der Seitenkette in dem Strukturelement der Phenylelessigsäure Einfluss auf die Aktivität haben. Anschließend war es geplant weitere möglichen Substituenten in diesem Teil des Moleküls einzuführen. Mittels einer *N*-Alkylierung sollte eine Kompatibilität von großen und beweglichen Substituenten in dieser Position überprüft werden. Als letztes Strukturelement sollte der Benzamidteil auf die Auswirkungen unterschiedlich sterisch anspruchsvoller Gruppen und deren Geometrie auf die

Aktivität gegenüber FXR untersucht werden (Abbildung 20). Ein abschließendes Ziel war es von der optimierten Struktur eine genaue biochemische Charakterisierung ihrer FXR-Modulation durchzuführen.<sup>100</sup> In Kapitel 2.2 *Entwicklung von N-phenylbenzamidbasierten FXR-Antagonisten* befindet sich die Zusammenfassung dieses Projektes. Die daraus entstandene Publikation befindet sich in Kapitel 11.4 *Structural optimization and in vitro profiling of N-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists (Bioorganic & Medicinal Chemistry)*.<sup>100</sup>



**Abbildung 20:** Weiterentwicklung der Leitstruktur (**16**) für FXR-Antagonisten im Zuge einer mehrstufigen SAR-Untersuchung.

Wie viele andere metabolische Erkrankungen beruhen NAFLD und NASH auf einem multifaktoriellen Zusammenspiel vielfältiger Prozesse. Obwohl FXR als therapeutische Zielstruktur für diesen Krankheitskomplex gilt, muss eine erfolgreiche Therapie möglicherweise nicht nur einen Rezeptor modulieren, sondern das Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren zur Behandlung einbeziehen. Sowohl die lösliche Epoxidhydrolase (sEH)<sup>101</sup> als auch FXR<sup>9</sup> wurden als vielversprechende Angriffspunkte zur Behandlung von NASH beschrieben. Duale Modulation könnte hierbei zu einer gesteigerten therapeutischen Effizienz führen. Um dies zu realisieren wurde durch geeignete strukturelle Vereinigung des sEH-Inhibitors GSK2188931B (**17**)<sup>102</sup> und des partiellen FXR-Agonisten<sup>87</sup> **9** die Leitstruktur **18** entwickelt (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Leitstrukturentwicklung für duale FXR/sEH-Modulatoren.

Ein Teil der Synthese der unterschiedlichen Strukturoptimierungen dieser Leitstruktur **18** wurde im Zuge der SAR innerhalb des translationalen Projektes über mehrere Arbeiten studiert. In der vorliegenden Arbeit sollten diese ersten bereits vorliegenden Ergebnisse interpretiert und intensiv vertieft werden, um die Entwicklung hochpotenter dualer FXR/sEH-Modulatoren zu ermöglichen.

Aufbauend aus den vorherigen Daten sollte ein neues mögliches Substitutionsmuster und das Einführen neuer funktioneller Gruppen zur signifikanten und ausgewogenen Potenzverbesserung an beiden molekularen Zielstrukturen dargestellt werden. Hierfür zeigten sich in vorherigen Ergebnissen, dass die FXR-Bindetasche große lipophile Substituenten wie Biphenyl-derivate in der Benzamidhälfte des Moleküls bevorzugt. Das sollte durch sterisch anspruchsvolle Substituenten wie einer *tert*-Butylgruppe untersucht werden. Des Weiteren sollten, ausgehend von Methylierungen am Benzoesäurestrukturelement, Halogensubstituenten eingeführt werden. Die Carboxylfunktion sollte durch unterschiedliche polare Gruppen und Bioisostere ausgetauscht werden, um eine ausgewogene Potenz an FXR und sEH zu erreichen. Daraus folgend sollten die so erhaltenen und vielversprechendsten Pharmakophorelemente miteinander zu einer hochpotenten Molekülstruktur verknüpft werden. Abschließend galt es die pharmakologischen Eigenschaften der optimierten Substanz durch eine umfangreiche biochemische Evaluation *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.<sup>103</sup> Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist im Kapitel 2.3 *Duale Modulatoren für den Farnesoid X Rezeptor und die lösliche Epoxidhydrolase* beschrieben. Die daraus resultierende Publikation ist im Kapitel 11.3 *A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis (Journal of Medicinal Chemistry)* zu finden.<sup>103</sup>

Die meisten publizierten FXR-Agonisten besitzen eine azide funktionelle Gruppe innerhalb ihrer Molekülstruktur. Dadurch können nicht nur Selektivitätsprobleme, sondern auch eine erhöhte Toxizität hervorgerufen werden, da Carboxylfunktionen durch Phase-II-Metabolismus leicht in Glukuronide umgewandelt werden. Durch einen nicht-aziden FXR-Agonisten soll diese Metabolisierung unterbunden werden. In dieser Arbeit sollte die intensive *in vitro*-Charakterisierung von FXR-Agonisten durchgeführt werden, die eine nicht-azide Kopfgruppe besitzen.<sup>104</sup> Die Ergebnisse sind im Kapitel 2.4 *Nicht-azide Farnesoid X Rezeptor-Modulatoren* dargestellt. Die dazu gehörende Publikation befindet sich im Kapitel 11.2 *Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators (Journal of Medicinal Chemistry)*.<sup>104</sup>



## 2. Ergebnisse und Diskussion

### 2.1 Validierung nicht-steroidaler Antirheumatika als Farnesoid X Rezeptor-Liganden

Lu *et al.*<sup>98</sup> beschreiben für nicht-steroidale Antirheumatika (engl.: *non-steroidal anti-rheumatic drugs*, NSAIDs) eine antagonistische Wirkung an FXR, die sie auf Beobachtungen aus *in silico* und *in vitro* Untersuchungen mit einer großen Zahl von Vertretern dieser Arzneistoffklasse stützen. Dabei wird postuliert, dass dieser FXR-Antagonismus zu Leberschädigung beiträgt, die bei einer chronischen Einnahme von NSAIDs auftreten kann. Diese Aussagen von Lu *et al.*<sup>98</sup> erschienen einerseits vielversprechend, um neue Leitstrukturen für nebenwirkungsärmere NSAIDs zu entwickeln, die FXR nicht modulieren. Andererseits ließen sich so auch NSAID-basierte FXR-Antagonisten entwickeln. Irritierend waren aber die niedrige FXR-Maximalaktivierung der von Lu *et al.*<sup>98</sup> publizierten Testsysteme, sowie die gleiche vermeintliche Aktivität aller NSAIDs an FXR trotz deren großer struktureller Unterschiede.

Um die von Lu *et al.*<sup>98</sup> publizierten Ergebnisse innerhalb validierter Testsysteme zu untersuchen und einordnen zu können, wurden drei nicht-steroidale Antirheumatika mit hoher struktureller Diversität ausgewählt; Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**).

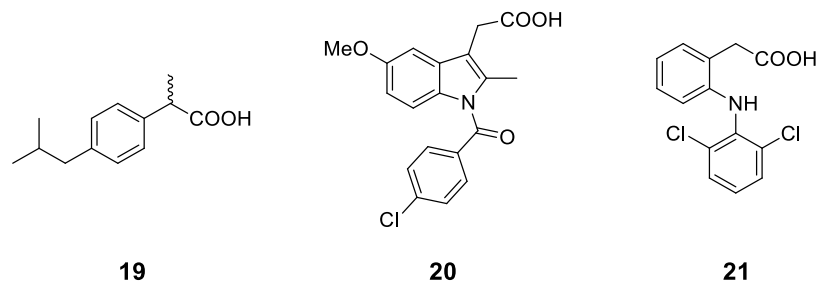
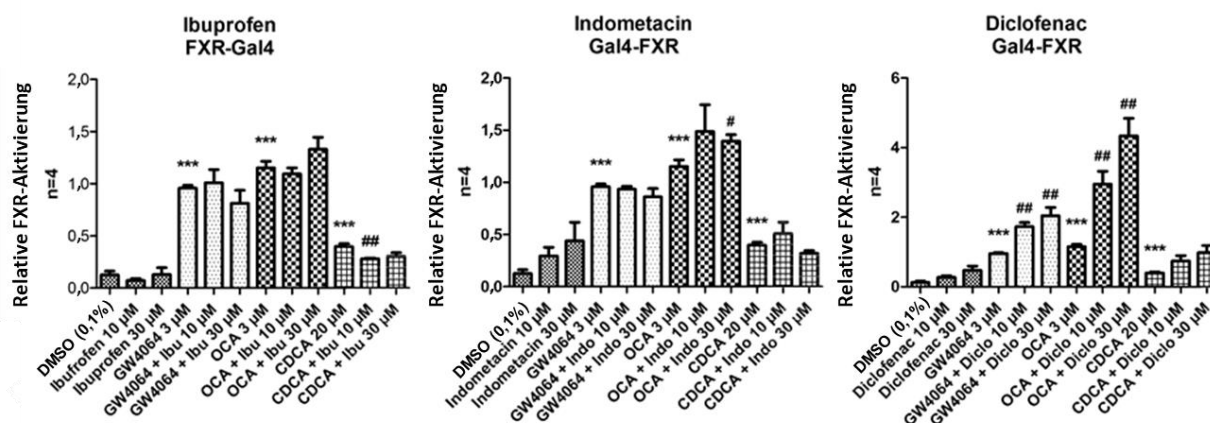


Abbildung 22: NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**).

Die Testung innerhalb der im Arbeitskreis etablierten Assaysysteme beinhaltete für alle drei Substanzen die Charakterisierung der Aktivität an FXR durch einen Vollängenreportergenassay und einen Gal4-Hybridreportergenassay. Die Quantifizierung der Boten-RNA (engl.: *messenger RNA*, mRNA) von FXR-Zielgenen wurde durch quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (engl.: *quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) durchgeführt und zusätzlich die Ligand-FXR-Wechselwirkung durch einen thermischen Verschiebungssassay (engl.: *thermal shift assay*) bewertet. Schlussendlich wurden noch Zelltoxizitätsassays durchgeführt. Alle Zelllinien wurden transient transfiziert. Jedes der Experimente wurde viermal wiederholt (n=4).

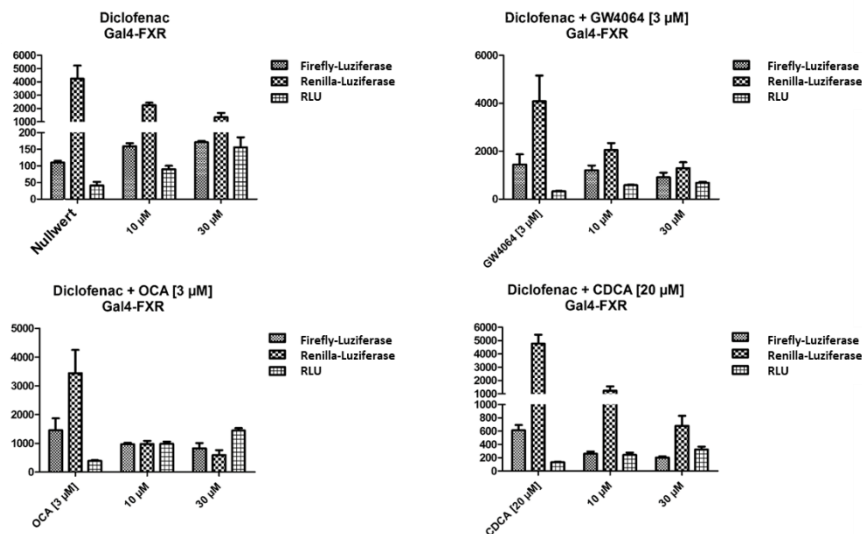
Der erste Testungsschritt wurde mit dem im Arbeitskreis etablierten Gal4-Hybridreportergenassay in Cos-7-Zellen, einer immortalisierten Nierenzelllinie aus *Chlorocebus aethiops*, durchgeführt, dessen genaue Methodenbeschreibung ausführlich in der Publikation (Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, 5, 14782.)<sup>99</sup> dargestellt ist. Die humane FXR-LBD liegt hierbei als Fusionskonstrukt mit der Gal4-DBD der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (pFA-CMV-hFXR-LBD) vor.<sup>105</sup> Die Gal4-DBD lagert sich an seine Response-Elemente (RE) an, die sich auf einem weiteren Plasmid befinden. Diese Gal4-RE sind dem eigentlichen Reporter gen dieses Assays, der Firefly-Luziferase vorgeschaltet (pFR-Luc, *Stratagene*). Das bedeutet, bei einer Aktivierung der FXR-LBD durch einen Liganden kommt es zu einer Expression der Firefly-Luziferase, die im Anschluss durch eine Lumineszenz emittierende Enzymreaktion detektiert werden kann. Zur Normalisierung und als Transfektionskontrolle wird ein drittes Plasmid verwendet, auf dem sich eine konstitutiv exprimierte Renilla-Luziferase befindet (pRL-SV40, *Promega*). Während der Lyse mit dem Dual Glo™-Kit (*Promega*) wird das darin enthaltene Luziferin durch die Firefly-

Luziferase in Oxyluziferin umgewandelt. Durch diese Reaktion wird bei einer Wellenlänge von 560 nm Lumineszenz detektiert. Anschließend wurde ein Puffer hinzugefügt, der zum einen diese durch die Firefly-Luziferase hervorgerufene Lumineszenz stoppt und zum anderen Coelenterazin enthält. Coelenterazin wird durch die Renilla-Luziferase in das Coelenteramid umgewandelt, welches eine Lumineszenz bei 480 nm besitzt (*Herstellerprotokoll Dual Glo™-Kit, Promega*). So können zwei unterschiedliche Signale aus einer Probe erhalten werden. Die detektierten Werte der Firefly-Luziferaselumineszenz werden durch die gemessenen Werte der Renilla-Luziferaselumineszenz dividiert und anschließend mit dem Faktor 1000 multipliziert. Die so erhaltenen Daten werden als relative Lichteinheiten (engl.: *relative light units, RLU*) bezeichnet. Zur Berechnung der vielfachen Grundaktivierung (engl.: *fold activation*) werden die entsprechenden RLU eines Messpunktes durch die RLU der Negativkontrolle dividiert. Um anschließend die relative Aktivierung zu berechnen, wird die vielfache Grundaktivierung eines Messpunktes durch die vielfache Grundaktivierung der Positivkontrolle dividiert. Alle drei Plasmide wurden während der Transfektion mit Lipofectamin LTX (*Invitrogen*) in Cos-7-Zellen eingebracht. Das System wurde mit drei bekannten FXR-Agonisten validiert: CDCA (**3a**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 14,5±0,8 µM, OCA (**5**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,54±0,05 µM und GW4064 (**7a**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,22±0,04 µM erzielten hierbei Ergebnisse, die den Angaben der Literatur<sup>106–108</sup> entsprechen. Als antagonistische Referenzsubstanz wurde Guggulsteron (**4**) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 13,6±2,8 µM verwendet. Die drei NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) wurden sowohl agonistisch mit DMSO (0,1%), als auch antagonistisch in Konkurrenz mit CDCA (**3a**, 20 µM), OCA (**5**, 3 µM) oder GW4064 (**7a**, 3 µM) vermessen. Dabei wurden alle Analgetika in zwei unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Im Gal4-Hybridreportergenassay konnte aber sowohl bei 10 µM als auch bei 30 µM keinerlei agonistische oder antagonistische Aktivität beobachtet werden (vgl. Abbildung 23), obwohl bei Lu *et al.*<sup>98</sup> deutlich niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte in Konkurrenz mit deutlich höheren Agonistkonzentrationen (50 µM CDCA, **3a**) veröffentlicht wurden.



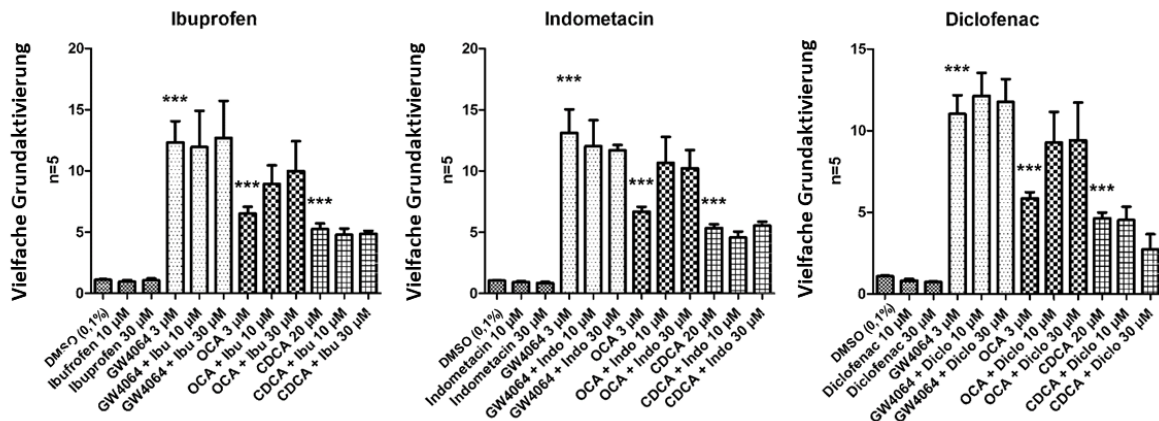
**Abbildung 23:** FXR-Gal4-Hybridreportergenassaydaten der NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) dargestellt als relative FXR-Aktivierung in Bezug zu den respektiven FXR-Agonisten CDCA (20 µM, **3a**), OCA (3 µM, **5**) und GW4064 (3 µM, **7a**). 24 Std nachdem die Cos-7-Zellen ausgesät wurden, wurde eine Transfektion mit Lipofectamin LTX (*Invitrogen, USA*) gemäß dem Herstellerprotokoll mit den Plasmiden pFR-Luc (*Stratagene*), pRL-SV40 (*Promega*) und pFA-CMV-hFXR-LBD<sup>105</sup> durchgeführt. Nach 5 Std wurde 12–14 Std mit den entsprechenden Substanzen **19**, **20** und **21** in den Konzentrationen 10 µM bzw. 30 µM sowohl alleine als auch mit dem Zusatz der unterschiedlichen FXR-Agonisten GW4064 (3 µM, **7a**), OCA (3 µM, **5**) und CDCA (20 µM, **3a**) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle wurden die FXR-Agonisten **3a**, **5** und **7a** in den entsprechenden Konzentrationen ohne Zusatz der Testsubstanzen **19**, **20** und **21** benutzt. Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde in vier Wiederholungen durchgeführt (n=4).<sup>99</sup> Keine der drei Substanzen zeigte alleine oder in Konkurrenz mit einem der drei Referenzagonisten eine antagonistische Wirkung auf FXR.

Auf den ersten Blick erscheinen hier die Gal4-Hybridreportergenassay-Daten von Diclofenac (**21**) mit zunehmender Konzentration eher einen agonistischen Effekt zu erzielen. Betrachtet man aber genauer die beiden Luziferasewerte in der Form der Rohdaten (vgl. Abbildung 24), fällt auf, dass die relative Aktivierung nicht erhöht ist, sondern aufgrund von Toxizität die Kontrollgenwerte verringert wurden.



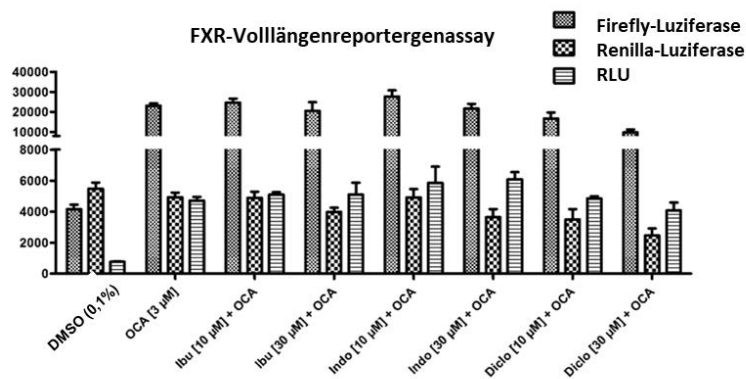
**Abbildung 24:** Darstellung der Lumineszenz-Rohdaten von Firefly- und Renilla-Luziferase der FXR-Gal4-Hybridreportergenassayexperimente aus Abbildung 23 für Diclofenac (**21**). Die erhöhte relative Aktivität von Diclofenac (**21**) im FXR-Gal4-Hybridreportergenassay resultiert nicht aus niedriger Firefly-Luziferaseaktivität, sondern geringen Renilla-Luziferasewerten aufgrund von Zelltoxizität. (RLU= *relative light units*, relative Lichteinheiten).

Aus der Vermutung, dass die Aktivität der NSAIDs an FXR den vollständigen humanen Rezeptor benötigt, wurden diese Experimente in einem im Arbeitskreis etablierten FXR-Vollängen-Reporterergenassaysystem in HeLa-Zellen, immortalisierte humanen Epitelzellen eines Gebärmutterhalskarzinoms, wiederholt. Das Messprinzip verhält sich ähnlich zu dem des Gal4-Hybrid-reportergenassays und dessen genaue Methodenbeschreibung ist ebenfalls ausführlich in der Publikation (Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, *5*, 14782.)<sup>99</sup> dargestellt. Auch hier wird zur Normalisierung und Transfektionskontrolle eine Renilla-Luziferase und als Reporter gen eine Firefly-Luziferase benutzt. Der Vollängenreportergenassay basiert auf zwei Konstrukten, die jeweils den gesamten FXR<sup>109</sup> bzw. den gesamten Retinoid X Rezeptor<sup>110</sup> kodieren, sodass beide konstitutiv gebildeten Proteine sich als Heterodimer zusammenschließen können und eine deutlich physiologischere Situation im Vergleich zum Gal4-Hybridreportergenassay entsteht. Die Firefly-Luziferase steht in diesem Assaysystem unter der Kontrolle eines verkürzten BSEP-Promotors<sup>34</sup> und wird im Falle einer Aktivierung des Heterodimers exprimiert. Das Testsystem wird in HeLa-Zellen durchgeführt und die Transfektion erfolgt im Gegensatz zum Gal4-Hybridreportergenassay über die Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode. Die Messung und die Datenverarbeitung erfolgt in gleicher Weise wie bei dem Gal4-Hybridreportergenassay. Der Vollängenreportergenassay wurde ebenfalls mit drei FXR-Agonisten validiert: CDCA (**3a**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 18±1 µM, OCA (**5**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,16±0,02 µM und GW4064 (**7a**) mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 0,51±0,16 µM stimmen ebenfalls mit den Literaturwerten<sup>106–108</sup> überein. Innerhalb des Vollängenreportergenassays wurden die Ergebnisse aus dem Gal4-Hybrid-reportergenassaydaten bestätigt, da sich für keine der ausgewählten NSAIDs eine agonistische oder antagonistische Aktivität an FXR nachweisen ließ (vgl. Abbildung 25). Auf den ersten Blick erscheinen die NSAIDs zwar eine agonistische Wirkung an FXR in der Kombination mit dem FXR-Agonisten OCA (**5**) zu zeigen, was aber durch die Untersuchung der Lumineszenzrohdaten widerlegt werden kann.



**Abbildung 25:** FXR-Vollängenreportergenassaydaten der NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) dargestellt als vielfache Grundaktivierung in Bezug zur Negativkontrolle mit DMSO (0,1%). 24 Std nachdem die HeLa-Zellen ausgesät wurden, wurde eine Kalzium-Phosphat-Präzipitations-Transfektion mit den Plasmiden pcDNA3-hFXR<sup>109</sup>, pSG5-hRXR<sup>110</sup>, BSEP-pGL3<sup>34</sup> und pRL-SV40 (*Promega*) durchgeführt. 24 Std nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen weitere 24 Std lang mit den entsprechenden Substanzen **19**, **20** und **21** in den Konzentrationen 10 µM bzw. 30 µM sowohl alleine als auch mit dem Zusatz der unterschiedlichen FXR-Agonisten GW4064 (3 µM, **7a**), OCA (3 µM, **5**) und CDCA (20 µM, **3a**) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle wurden die FXR-Agonisten **3a**, **5** und **7a** in den entsprechenden Konzentrationen ohne Zusatz der Testsubstanzen **19**, **20** und **21** benutzt. Die Luciferaseaktivität wurde über das Dual-Glo™-Luciferaseassaysystem (*Promega*) untersucht. Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens in fünf Wiederholungen durchgeführt (n=5).<sup>99</sup> Keine der drei Substanzen zeigte alleine oder in Kombination mit einem der drei Referenzagonisten eine antagonistische Wirkung auf FXR was die Ergebnisse des FXR-Gal4-Hybrid-Reporterergenassays aus Abbildung 23 bestätigt.

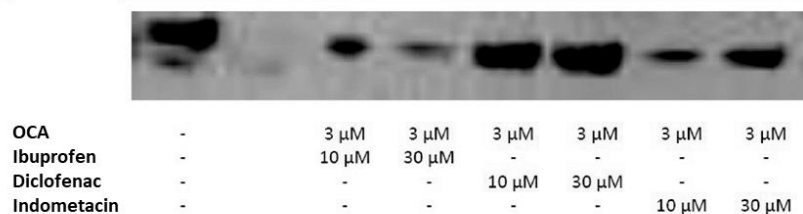
Bei genauer Betrachtung dieser Rohdaten von Firefly- und Renilla-Luziferase der Vollängenreportergenassayexperimente lässt sich eine vermeintlich agonistische Aktivität an FXR bei allen drei NSAIDs in Kombination mit OCA (**5**) durch den Abfall der Renilla-Luziferasewerte bedingt durch Toxizität erklären und nicht durch einen Anstieg der Firefly-Luziferasewerte (vgl. Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Darstellung der Lumineszenzrohdaten von Firefly- und Renilla-Luziferase der FXR-Vollängenreportergenassayexperimente aus Abbildung 25 für Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) in Kombination mit OCA (**5**). Die erhaltenen Werte sind auf geringe Renilla-Luziferasewerte durch Toxizität zurückzuführen.

Um die Toxizität zu bestätigen, wurde ein Westernblot durchgeführt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die NSAIDs in Kombination mit OCA (**5**) zu einer verminderten Expression des konstitutiv exprimierten Gen  $\beta$ -Aktin führen. Dafür wurden HeLa-Zellen zunächst wie bei den FXR-Vollängenreportergenassayexperimenten ausgesät, transfiziert und mit den entsprechenden NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) bei den zwei Konzentrationen von 10 µM und 30 µM in Kombination mit OCA (3 µM, **5**) inkubiert. Nach 24 Std Inkubation wurden die HeLa-Zellen abgelöst und gereinigt. Nach der Lyse der HeLa-Zellen wurde eine Auftrennung mittels SDS-PAGE ausgeführt.

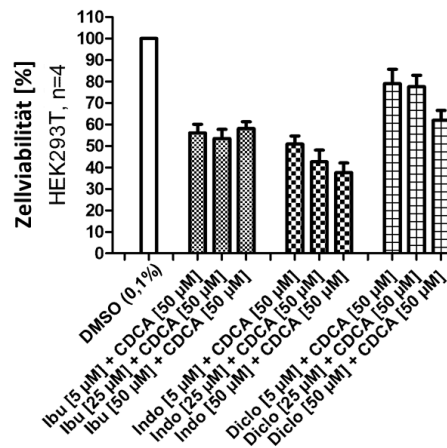
Anschließend wurde ein Westernblotting auf einer PVDF-Membran (*Merck Millipore*) mit Immundetektion durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde A5441 (Maus-Anti-Actin, *Sigma Aldrich*) verwendet und als sekundärer Antikörper wurde IRDye680LT (Esel-Anti-Maus, *Li-Cor*) ausgewählt. Die genauen Versuchsbedingungen wurden in der Publikation (Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, 5, 14782.)<sup>99</sup> beschrieben. Die NSAIDs haben einen verstärkten toxischen Einfluss auf HeLa-Zellen, wenn sie mit OCA (**5**) kombiniert werden (vgl. Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Westernblotanalyse mit  $\beta$ -Aktin. HeLa-Zellen wurden 24 Std, nachdem sie ausgesät wurden, über eine Kalzium-Phosphat-Präzipitation mit den Plasmiden pcDNA3-hFXR<sup>109</sup>, pSG5-hRXR<sup>110</sup>, BSEP-pGL3<sup>34</sup> und pRL-SV40 (*Promega*) transfiziert. 24 Std nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen mit Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) in den Konzentration 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M in Konkurrenz mit OCA (3  $\mu$ M, **5**) inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet. Nach der Inkubation wurden die HeLa-Zellen trypsinisiert und mehrfach gewaschen. Anschließend an die Lyse wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Für den Westernblot wurde eine PVDF-Membran (*Merck Millipore*) verwendet. Die Immunodetektion wurde mit dem primären Antikörper A5441 (Maus-Anti-Actin, *Sigma Aldrich*) und dem sekundären Antikörper IRDye680LT (Esel-Anti-Maus, *Li-Cor*) durchgeführt und zwischen 700 nm und 800 nm vermessen. Das Experiment wurde einmal durchgeführt (n=1).<sup>99</sup> Die Westernblotanalyse mit  $\beta$ -Aktin zeigt eine toxische Kombination der NSAIDs mit OCA (**5**).

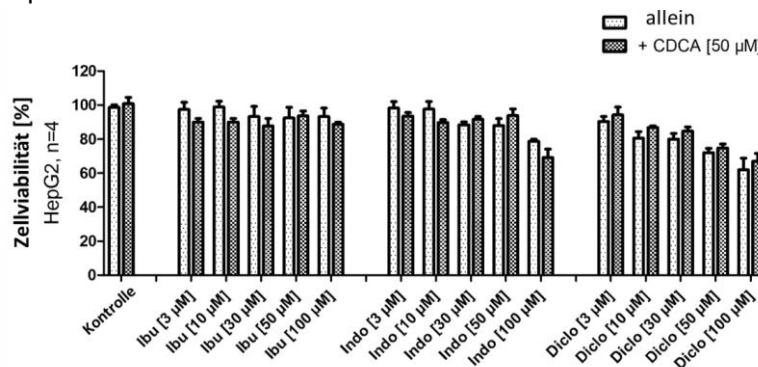
Nachdem in beiden Reportgensystemen Toxizität als Ursache für vermeintlichen Antagonismus nach Lu *et al* identifiziert wurde, wurden WST-1-Toxizitätsassays unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt, um die Proliferationsminderung der verwendeten Zellen genauer zu charakterisieren. Dafür wurden zunächst HepG2-Zellen mit Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) in den Konzentrationen 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M und 50  $\mu$ M für 48 Stunden inkubiert, dann mit WST-1-Reagenz (*Roche*) versetzt und nach weiteren 45 Minuten Inkubationszeit vermessen (Abbildung in Publikation Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, 5, 14782.)<sup>99</sup>. Der gleiche Versuchsaufbau wurde auch mit HEK293T-Zellen, humanen embryonalen Nierenzellen, durchgeführt. Besonders bei den HEK293T-Zellen, die Lu *et al.*<sup>98</sup> für ihre Reportgenassays verwendeten, konnte eine verminderte Proliferation beobachtet werden. Bei Ibuprofen (**19**) sind toxische Effekte erst bei Konzentrationen ab 50  $\mu$ M sichtbar gewesen, während bei Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) schon ab 10  $\mu$ M eine Abnahme der Proliferation der HEK293T-Zellen zu erkennen war. Im nächsten WST-1-Versuchsaufbau wurde die Toxizität der NSAIDs bei Konzentrationen von 5  $\mu$ M, 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M mit einem Zusatz von CDCA (50  $\mu$ M, **3a**) nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in HEK293T-Zellen vermessen (vgl. Abbildung 28). Hierbei stellte sich heraus, dass die Kombination einen wesentlich toxischeren Einfluss auf die HEK293T-Zellen hatte, als nur die NSAIDs. Es wurden ähnliche Dosis-Wirkungskurven erhalten, wie bei Lu *et al.*<sup>98</sup> beschrieben, obwohl der WST-1-Assay lediglich Zellproliferation abbildet und keinerlei direkte Interaktion mit FXR. Daraus lässt sich folgern, dass die veröffentlichten Ergebnisse der Reportergenassays von Lu *et al.*<sup>98</sup> nicht auf einen FXR-Antagonismus zurückzuführen sind, sondern auf eine verstärkte Toxizität durch die Kombination von CDCA (**3a**) mit NSAIDs. Um aussagekräftigere Daten in einem weiteren WST-1-Assay zu generieren, konnte in HepG2-Zellen, immortalisierte humanen Epithelzellen eines hepatozellulären Karzinoms, durch eine Verkürzung in der Inkubationszeit von 24 Stunden auf sechs Stunden eine geringere Ausprägung der toxischen Effekte der NSAIDs zusammen mit CDCA (**3a**) gezeigt werden. Diese Bedingungen erlaubten Experimente in HepG2-Zellen,

bei denen der Einfluss der Toxizität als untergeordnet betrachtet werden konnte. Es wurde mit den jeweiligen NSAIDs sowohl alleine, als auch in Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  CDCA (**3a**) in den Konzentrationen 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Innerhalb dieser verkürzten Zeit war Ibuprofen (**19**) nicht mehr toxisch und Indometacin (**20**), bzw. in einem größeren Ausmaß Diclofenac (**21**), erst ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  toxisch (vgl. Abbildung 29).



**Abbildung 28:** WST-1-Assay der NSAIDs in Kombination mit CDCA (**3a**) in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std mit Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  zusammen mit CDCA (50  $\mu\text{M}$ , **3a**) inkubiert. 24 Std nach der Inkubation wurde WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics International AG) aufgetragen und nach weiteren 45 min Inkubationszeit vermessen. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) und als Positivkontrolle wurde Revlotron (100  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Jede Konzentration wurde in Triplikaten vermessen. Jedes Experiment wurde viermal wiederholt (n=4).<sup>99</sup>

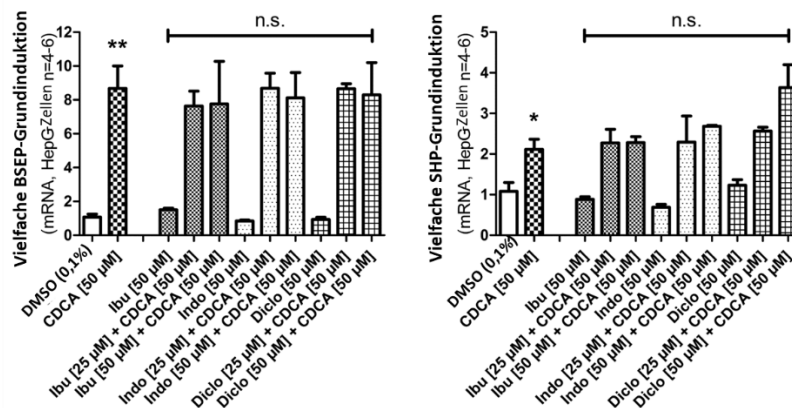
Die Aktivität eines Liganden an einem nukleären Rezeptor kann über die Expression seiner Zielgene *in vitro* beschrieben werden. Für FXR wurden HepG2-Zellen verwendet, die innerhalb der vorher evaluierten sechs Stunden mit den NSAIDs in Konzentrationen von 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  allein und in Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  CDCA inkubiert wurden.



**Abbildung 29:** Toxizität der NSAIDs allein und in Kombination mit CDCA (**3a**) in HepG2-Zellen nach sechs Stunden. HepG2-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std mit Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) in den Konzentrationen 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  allein und in Kombination mit CDCA (50  $\mu\text{M}$ , **3a**) inkubiert. 6 Std nach der Inkubation wurde WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics International AG) aufgetragen und nach weiteren 45 min Inkubationszeit vermessen. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) und als Positivkontrolle wurde Revlotron (100  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Jede Konzentration wurde in Triplikaten vermessen. Jedes Experiment wurde mindestens viermal wiederholt (n=4).<sup>99</sup>

So sollte ein doppelter Toxizitätsschutz erreicht werden, indem zum einen mit 25  $\mu\text{M}$  nicht-toxische Konzentrationen benutzt wurden, und zum anderen sollte auch bei einer Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  der NSAIDs innerhalb von sechs Stunden, wie im WST-1 Assay beobachtet, nur untergeordnete toxische Effekte auftreten. Anschließend wurden die HepG2-Zellen lysiert und ihre RNA extrahiert. 2  $\mu\text{g}$  der darin enthaltenen mRNA wurden in cDNA transkribiert und dann mithilfe der spezifischen Primern bei einer Konzentration von 0,34  $\mu\text{M}$  für das jeweilige Zielgen mit einer qRT-PCR quantifiziert. Als direkte

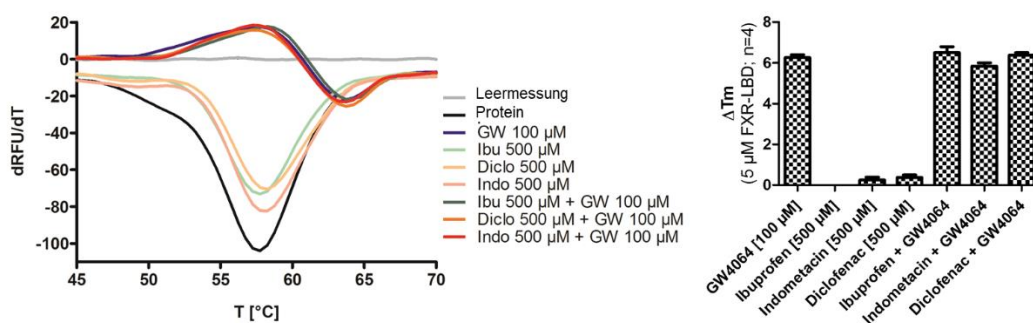
Zielgene von FXR wurden SHP und BSEP gewählt. SHP wurde schon von Lu *et al.*<sup>98</sup> verwendet, ist aber neben FXR auch durch andere Regulationsmechanismen kontrolliert. BSEP hingegen ist spezifisch von FXR reguliert. Als Referenz wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. GAPDH wird in fast allen Lebewesen exprimiert und eignet sich daher zur Normalisierung und Toxizitätskontrolle. Zur Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse wurde die  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode angewandt. Es wurden keine signifikant agonistischen oder antagonistischen Effekte innerhalb der Ergebnisse der qRT-PCR beobachtet (vgl. Abbildung 30), was die Ergebnisse der beiden Reportergerassays unterstreicht. Die genaue Methodenbeschreibung, sowie die Primersequenzen sind in der Publikation Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, 5, 14782.<sup>99</sup> veröffentlicht.



**Abbildung 30:** Quantifizierung der Expression FXR-regulierter Gene durch qRT-PCR. HepG2-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std wurde ein Mediumswechsel auf ein Minimalmedium durchgeführt, welches im Vergleich deutlich weniger Zucker enthält, um die basale Expression der FXR-regulierten Gene zu mindern, da sich dadurch dann die durch die Inkubation mit den Testsubstanzen hervorgerufenen Effekte besser beobachten lassen. Nach weiteren 24 Std wurden die HepG2-Zellen mit Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) oder Diclofenac (**21**) bei Konzentrationen von jeweils 25  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  in Kombination mit 50  $\mu\text{M}$  CDCA bzw. allein bei 50  $\mu\text{M}$  für 6 Std inkubiert. Anschließend wurde die RNA mittels Total RNA Mini Kit (*Omega Bio-Tek*) gemäß dem Herstellerprotokoll extrahiert. Die RNA wurde in die entsprechende komplementäre cDNA transkribiert, wofür das High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (*Thermo Fischer Scientific*) laut dem Herstellerprotokoll verwendet wurde. Die cDNA wurde mit geeigneten Primern und PowerSYBRGreen (*Life Technologies*) quantifiziert. Jede Konzentration wurde in Duplikaten pro Gen vermessen. Jedes Experiment wurde mindestens vier Mal wiederholt ( $n=4$ ).<sup>99</sup>

Neben den *in vitro*-Daten wurden von Lu *et al.*<sup>98</sup> auch *in silico*-Untersuchungen durchgeführt, die eine direkte Interaktion von NSAIDs an der FXR-LBD andeuten sollten. Durch einen thermischen Verschiebungssassay (engl: *thermal shift assay*) kann die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor gemessen werden, indem die Schmelztemperatur des Proteins mit und ohne Ligand mithilfe eines speziellen Fluoreszenzfarbstoffes (SYPRO-Orange) detektiert wird. In wässriger Lösung liegt das Protein nativ gefaltet vor und es wird ein niedriges Fluoreszenzsignal detektiert, da der Fluoreszenzfarbstoff durch Wasser gequencht wird. Erst wenn das Protein denaturiert und seine hydrophoben Kernregionen zugänglich sind, kann der Farbstoff daran binden und so ein messbares Fluoreszenzsignal erzeugen. Es wurden sowohl die NSAIDs allein als auch in der Kombination mit GW4064 (**7a**) am FXR-LBD-Protein vermessen. Dabei wurden hohe Konzentrationen von 500  $\mu\text{M}$  bei den NSAIDs und eine vergleichsweise geringe Konzentration von GW4064 (**7a**) mit 100  $\mu\text{M}$  verwendet, die ausreichend war, das Protein zu stabilisieren. Die genauen Versuchsbedingungen sind veröffentlicht in der Publikation Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, 5, 14782.<sup>99</sup> Auch in diesem Experiment konnte keinerlei Wechselwirkung der NSAIDs alleine mit FXR detektiert werden und auch eine Verdrängung des FXR-Agonisten **7a**, der zu einer deutlichen Stabilisierung der FXR-LBD führte, wurde für kein NSAID beobachtet. (vgl. Abbildung 31).





**Abbildung 31:** Ergebnisse des *Thermal Shift Assays*. Die Substanzen Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) werden bei einer Konzentration von 500 μM allein und in Kombination von 100 μM GW4064 (**7a**) mit 5 μM FXR-LBD-Protein versetzt und mit SYPRO Orange (*In vitro*) angefärbt. Die temperaturabhängige Fluoreszenz wird in Duplikaten vermessen und jedes Experiment wurde vier Mal wiederholt (n=4).<sup>99</sup>

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von Lu *et al.*<sup>98</sup> postulierten Ergebnisse in einem starken Kontrast zu den hier beschriebenen Daten befinden. Das lässt sich auf mehrere Faktoren zurückführen. Die Wahl von CDCA (**3a**) als Referenzagonist gestaltet sich innerhalb eines Reporterassays als relativ schwierig. CDCA (**3a**) besitzt im Vergleich mit anderen Referenzsubstanzen einen relativ hohen EC<sub>50</sub>-Wert von 18±1 μM, was dazu führt, dass eine hohe Konzentration für eine stabile FXR-Aktivierung benutzt werden muss. Der Nachteil, der sich daraus ergibt, ist die dabei auftretende Zelltoxizität, die im Reporterassay dazu führen kann, dass die Luziferasewerte des Reportergens und des Kontrollgens stark absinken. Die sich daraus ergebenden Daten lassen sich nicht mehr sinnvoll interpretieren, können auf den ersten Blick aber fälschlich als antagonistische Effekte aufgefasst werden. Durch Toxizitätsassays (WST-1) konnten wir in HEK293T-Zellen ähnliche Proliferationswerte reproduzieren, die Lu *et al.* in ihren HEK293T-Zellen während eines Reporterassays als Antagonismus interpretiert haben. Aus der Veröffentlichung war außerdem nicht ersichtlich, wie oft die Experimente wiederholt wurden und welche Replikate verwendet wurden, um diese Daten zu erhalten, wodurch eine statistische Analyse fehlt. Messschwankungen können so auch zu einer Missinterpretation des durch NSAIDs ausgelösten FXR-Antagonismus geführt haben. Innerhalb der robusten und sehr gut validierten Assaysysteme des Arbeitskreises konnte keinerlei Aktivität der drei NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) oder Diclofenac (**21**) allein oder in Konkurrenz mit CDCA (**3a**), OCA (**5**) oder GW4064 (**7a**) beobachtet werden. Eine Zielgenquantifizierung mittels qRT-PCR in untransfizierten HepG2-Zellen, die den entsprechenden nukleären Rezeptor natürlich exprimieren, und ebenfalls keine Effekte für die NSAIDs zeigten, war ein weiterer belastbarer Hinweis, dass die untersuchten NSAIDs FXR nicht modulieren. Die von Lu *et al.* beschriebenen Untersuchungen der Effekte auf die Expression FXR-regulierter Gene sind dagegen nicht optimal, da CYP7A1 indirekt von FXR über FGF19 oder SHP kontrolliert werden kann und SHP selbst nicht ausschließlich von FXR moduliert wird, sondern auch Response-Elemente von nukleären Rezeptoren wie unter anderem dem Leber X Rezeptor α (engl: *liver X receptor*, LXRA), PPARγ und dem Östrogenrezeptor α (engl: *estrogen receptor*, ERα) in seiner Promotorregion enthält. Die von Lu *et al.* gezeigten Ergebnisse sind daher nicht allein FXR-abhängig und schwer zu interpretieren. Mit dem Ziel, die Ergebnisse dennoch zu reproduzieren, wurde neben der Untersuchung der Expression von BSEP, welches ausschließlich direkt von FXR kontrolliert wird<sup>34</sup>, auch SHP wie von Lu *et al.* studiert. In beiden Fällen konnte keine antagonistische Modulation der NSAIDs festgestellt werden. Insgesamt widerlegen unsere *in vitro* Daten eindeutig die Ergebnisse von Lu *et al.* und charakterisieren diese als fehlinterpretierte Toxizität der NSAIDs.



Diese Ergebnisse wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Jurema Schmidt, Franca-Maria Klingler, Ewgenji Proschak, Dieter Steinhilber, Manfred Schubert-Zsilavec and Daniel Merk: NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 14782.

DOI: 10.1038/srep14782

Eigener Beitrag: *in vitro*-Charakterisierung in Reporter- und Toxizitätsassays und qRT-PCR, sowie Western Blotting.

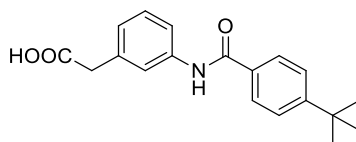
JS und DM führten sowohl die Reporter- und die Toxizitätsassays, als auch die qRT-PCR durch

FK und DM führten die *thermal shift*-Assays durch.

JS und FK führten das Western Blotting durch.

## 2.2 Entwicklung von N-phenylbenzamidbasierten FXR-Antagonisten

Für eine Vielzahl an Lebererkrankungen sind FXR-Agonisten als mögliche Therapie entwickelt und validiert worden. FXR-Antagonisten auf der anderen Seite bedürfen noch genauen Untersuchungen, um ihren therapeutischen Wert zu beurteilen und die generelle Wirkweise des FXR-Antagonismus zu erforschen. Da verfügbare steroidale FXR-Antagonisten wie Guggulsteron (**4**) oder Gly-MCA (**10**) zur Untersuchung von FXR-Antagonismus benutzt wurden, aber ihre Selektivität gegenüber anderen nukleären Rezeptoren fraglich ist,<sup>86,93</sup> sollte die Entwicklung von nicht-steroidalen FXR-Antagonisten angestrebt werden. Die bereits durch andere Arbeitsgruppen veröffentlichten nicht-steroidalen FXR-Antagonisten auf Basis von kleinen Molekülen besitzen ausbaubare IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 0,04-12,2 µM.<sup>90,93-96</sup> Innerhalb von Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung (engl.: *structure activity relationship*, SAR) von Anthranilsäurederivaten als FXR-Partialagonisten<sup>87,89</sup> konnte in der Arbeitsgruppe die N-Phenylbenzamidstruktur **16** mit antagonistischer Aktivität an FXR identifiziert werden. Gegenüber der Grundaktivierung des Rezeptors ohne Anwesenheit eines Agonisten besitzt sie einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,35±0,04 µM und in Konkurrenz mit 3 µM GW4064 (**7a**) konnte ein IC<sub>50</sub>-Wert von 0,44±0,15 µM festgestellt werden.

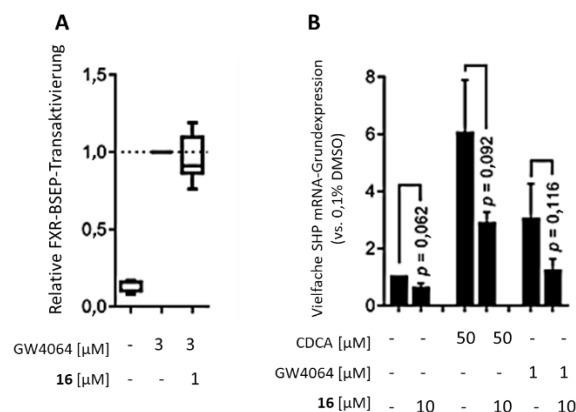


**16**

**Abbildung 32:** Leitstruktur (**16**) zur Entwicklung von FXR-Antagonisten basierend auf kleinen Molekülstrukturen.

Eine ähnliche Struktur wurde in einer Publikation als potentieller Firefly-Luziferase-Inhibitor identifiziert.<sup>111</sup> Damit keine Verfälschung der *in vitro*-Charakterisierung mit dem im Arbeitskreis etablierten FXR-Vollängenreportergenassay in HeLa-Zellen, der auf der Messung einer durch FXR-Aktivierung exprimierten Firefly-Luziferase und einer konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase als Normalisierung basiert, auftritt, wurde eine mögliche Inhibition durch die Substanz **16** überprüft, bevor sie als neue antagonistische Leitstruktur gewählt wurde. Im verwendeten FXR-Vollängenreportergenassay (dessen Methodenprotokoll in der Publikation Schmidt *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 26, 4240-4253.<sup>100</sup> genau beschrieben ist) wurden HeLa-Zellen 24 Stunden nachdem sie ausgesät wurden, mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode mit vier unterschiedlichen Plasmiden transient transfiziert. Zwei Plasmide beinhalten die Information für den gesamten humanen FXR (pcDNA3-hFXR<sup>109</sup>) bzw. humanen RXR (pSG5-hRXR<sup>110</sup>), die Firefly-Luziferase steht unter der Kontrolle eines verkürzten BSEP-Promoters (BSEP-pGL3<sup>34</sup>) und für die Normalisierung und Toxizitätskontrolle wird eine Renilla-Luziferase (pRL-SV40, *Promega*) verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion wurde mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle der Referenzagonist GW4064 in einer Konzentration von 3 µM. Die Lyse und Lumineszenzmessung der HeLa-Zellen erfolgen durch das Dual-Glo™-Kit (*Promega*) 24 Stunden nach der Inkubation. Dabei wird zunächst die Lumineszenz der Firefly-Luziferase detektiert, bevor die Renilla-Luziferase-Lumineszenz gemessen wird. Die Datenverarbeitung erfolgt über die Division der Firefly-Werte durch die Werte der Renilla und anschließende Multiplikation mit dem Faktor 1000. Die so erhaltenen relativen Lichteinheiten (engl.: *relative light units*, RLU) der gemessenen Verbindungen werden zur Berechnung der vielfachen Grundaktivierung (engl.: *fold activation*) durch die RLU der Negativkontrolle dividiert. Aus dieser vielfachen Grundaktivierung lässt sich dann anschließend die relative Aktivierung an FXR bestimmen, indem die vielfache Grundaktivierung der untersuchten Substanzen durch den Wert des Referenzagonisten geteilt wird. Jeder Messpunkt wurde in Triplikaten aufgetragen und jedes Experiment wurde

mindestens dreimal wiederholt ( $n \geq 3$ ). Zur Untersuchung, ob mit der Substanz tatsächlich ein Firefly-Luziferase-Inhibitor vorliegt und damit die Daten innerhalb eines FXR-Volllängenreportergenassays verfälscht werden würden, wurde zunächst eine Firefly-Luziferase-Expression durch den verwendeten Referenzagonisten GW4064 (**7a**) in einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  ausgelöst. Eine Stunde bevor die Zellen lysiert und vermessen werden, wurde Substanz **16** in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zugegeben. Dies hatte keinen Effekt auf die Firefly-Luziferasewerte im Vergleich zum Referenzagonisten ohne Zugabe der Substanz **16** (vgl. Abbildung 33). Würde mit Substanz **16** tatsächlich ein Inhibitor der Firefly-Luziferase vorliegen und somit eine Bindung zwischen **16** und der Firefly-Luziferase stattfinden, hätte es einen sichtbaren Abfall der Lumineszenz der Firefly-Luziferase geben müssen. Um diese Ergebnisse zu stützen, wurde eine Quantifizierung der mRNA von SHP durch qRT-PCR durchgeführt. Die genaue Vorgehensweise, sowie die Primersequenzen wurden veröffentlicht in der Publikation Schmidt *et al. Scientific reports* **2015**, 5, 14782.<sup>99</sup> Dafür wurden HepG2-Zellen mit den FXR-Agonisten CDCA (**3a**) mit 50  $\mu\text{M}$  und GW4064 (**7a**) mit 1  $\mu\text{M}$ , sowie mit der Substanz **16** bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  allein und auch in Kombination mit beiden Agonisten inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, um ein vergleichbares Zeitfenster wie beim FXR-Volllängenreportergenassay zu erzielen, wurden die HepG2-Zellen trypsinisiert und gewaschen. Die RNA-Extraktion erfolgte durch das Total RNA Mini Kit (*Omega Bio-Tek*) laut Herstellerprotokoll und die Transkription der komplementären cDNA wurde mittels High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (*Thermo Fischer Scientific*) gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mithilfe der entsprechenden Primer und PowerSYBRGreen (*Life Technologies*). Die Agonisten-induzierte Expression von SHP wurde von **16** gemindert (vgl. Abbildung 33).

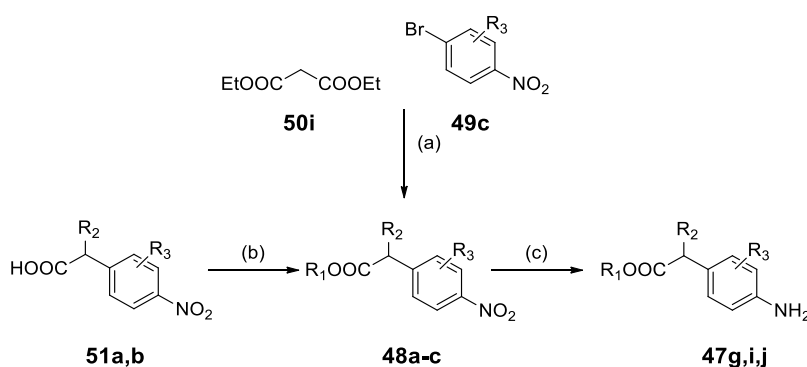


**Abbildung 33:** (A) Kontrollexperiment zur möglichen Firefly-Inhibition innerhalb des FXR-Volllängenreportergenassays. HeLa-Zellen wurden mittels der Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode mit den Plasmiden pcDNA3-hFXR<sup>109</sup>, pSG5-hRXR<sup>110</sup>, BSEP-pGL3<sup>34</sup> und pRL-SV40 (*Promega*) transfiziert. 24 Std nach der Transfektion wurde mit GW4064 (**7a**) bei einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet. 23 Stunden nach der Inkubation wurde Substanz **16** (1  $\mu\text{M}$ ) zu den mit GW4064 (**7a**) behandelten HeLa-Zellen zugegeben. Eine weitere Stunde später wurde mit Dual-Glo™ lysiert und die Lumineszenz vermessen. Jeder Messpunkt wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment sechsmal wiederholt ( $n=6$ ).<sup>100</sup> Es zeigte sich kein Einfluss der Leitstruktur **16** auf die Lumineszenz der Firefly-Luziferase. (B) Kontrollexperiment zur Quantifizierung der Expression des FXR-regulierten Gens SHP, um den Antagonismus von **16** in einem sekundären Assay zu bestätigen. HepG2-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std wurde ein Mediumswechsel auf ein Minimalmedium durchgeführt, welches im Vergleich deutlich weniger Zucker enthält, um die basale Expression der FXR-regulierten Gene zu mindern, da sich dadurch dann die durch die Inkubation mit den Testsubstanzen hervorgerufenen Effekte besser beobachten lassen. Nach 24 Std werden die HepG2-Zellen mit der Verbindung **16** in der Konzentration 10  $\mu\text{M}$  allein oder in Kombination mit den FXR-Agonisten CDCA (50  $\mu\text{M}$ , **3a**) und GW4064 (1  $\mu\text{M}$ , **7a**) für 24 Std inkubiert. Als Referenz wurden beide Agonisten allein verwendet. Die anschließende RNA-Extraktion erfolgte mit dem Total RNA Mini Kit (*Omega Bio-Tek*). Die RNA wurde mithilfe des High-Capacity cDNA Transkription Kit (*Thermo Fischer Scientific*) in komplementäre cDNA transkribiert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über PowerSYBRGreen (*Life Technologies*), die respektiven Primer und der komplementären cDNA. Jeder Messpunkt wurde in Dublikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde dreimal wiederholt ( $n=3$ ).<sup>100</sup> Leitstruktur **16** verminderte sowohl die intrinsische, als auch die durch Agonisten induzierte Expression von SHP.

Dadurch konnte auch in einem nicht-transfizierten System mit HepG2-Zellen gezeigt werden, dass die antagonistische Wirkung der Verbindung **16** im FXR-Vollängenreportergenassay nicht auf eine Inhibition der Firefly-Luziferase zurückzuführen ist, sondern auf eine direkte Modulation des Rezeptors.

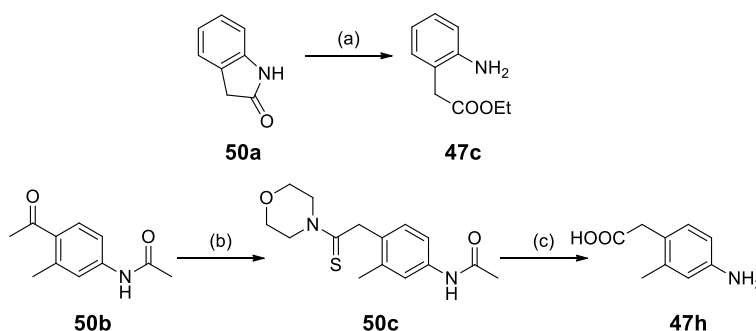
Nachdem eine Firefly-Luziferaseinhibition durch Substanz **16** ausgeschlossen und eine antagonistische Wirkung an FXR durch qRT-PCR nachgewiesen werden konnte, wurde **16** als Leitstruktur für die Entwicklung einer neuen Klasse von FXR-Antagonisten ausgewählt. Für die systematische Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser *N*-Phenylbenzamidbasierten Antagonisten wurde die Leitstruktur **16** in drei unterschiedliche Bereiche geteilt, die sukzessive verändert werden sollten.

Die Hauptsyntheseroute dieser Antagonistenklasse für die Substanzen **22-46** führt über die Amidbildung eines substituierten Anilins mit einem Benzoylchloridderivat unter Verwendung von Pyridin als Hilfsbase und THF als Lösungsmittel. Diese Schotten-Baumannsynthese lässt sich bei Raumtemperatur in guten Ausbeuten durchführen. Ein zweiter Syntheseweg wurde benutzt, wenn kein Säurechlorid, sondern eine freie Carbonsäure für die Verknüpfung vorhanden war. In diesem Fall wurde eine Amidkupplung mit EDC in CHCl<sub>3</sub> mit 4-DMAP bei 80 °C durchgeführt. Diese Syntheseroute lieferte gute Ausbeuten. Für die Synthese der in diesen beiden Reaktionswegen benötigten Substanzbausteine wurden unterschiedlichste Strategien verfolgt (Abbildungen **34-37**).



**Abbildung 34:** Reagenzien und Bedingungen: (a) NaH, DMF, 0 °C zu 80 °C, 16 Std (b) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C zu 80 °C, 2 Std (c) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, RT, 16 Std.

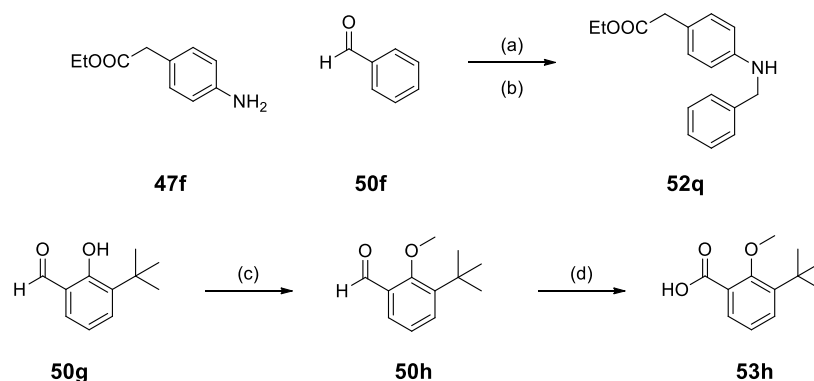
Während die Aniline **47a,b,d-f** käuflich zu erwerben waren, wurden **47c,g-j** synthetisch hergestellt. **48c** wurde ausgehend vom Bromnitrobenzen **49c** mit dem Enolat anion des Diethylmalonats **50i** dargestellt. Die Carbonsäuren **51a,b** wurden mit Thionylchlorid in Methanol zu den respektiven Methylestern **48a,b** verestert. Die Nitrofunktionen der Ester **48a-c** wurden mit Palladium auf Kohle unter Wasserstoffatmosphäre zu Amingruppen reduziert.



**Abbildung 35:** Reagenzien und Bedingungen: (a) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, EtOH, 80 °C, 16 Std (b) Schwefel, Morpholine, 135 °C, 6 Std (c) KOH, EtOH, 80 °C, 6 Std.

Der Ester **47c** wurde aus dem Lactam **50a** durch eine Ringöffnungsreaktion in Ethanol und konzentrierter Schwefelsäure dargestellt. Das Anilin **47h** wurde über eine Willgerodt-Kindler-Reaktion ausgehend von dem Methylacetophenon **50b** zusammen mit Schwefel und Morpholin erhalten.

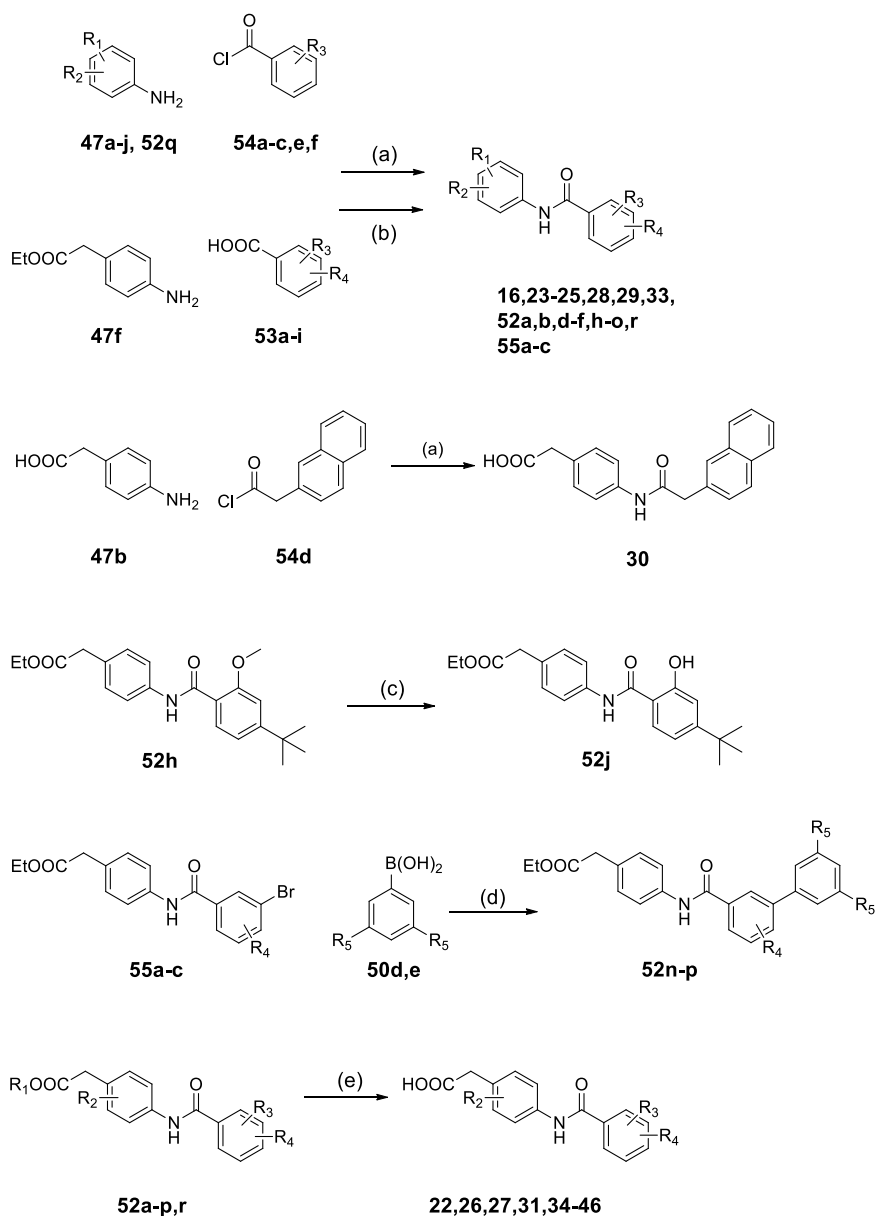
Für die Variationen am Stickstoffatom der Amidbindung wurde durch eine reduktive Aminierung des Esters **47f** und Benzaldehyd **50f** mit  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  das Derivat **52q** erhalten. Modifikationen am lipophilen Benzamid der Molekülklasse wurden durch unterschiedliche Carbonsäure- oder Säurechlorid-ederkte erzielt. So wurde die Alkoholfunktion des Salicylaldehyd **50g** zuerst durch Methyljodid als



**Abbildung 36:** Reagenzien und Bedingungen: (a) HOAc, DCE, RT, 2 Std (b)  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , RT, 16 Std (c) MeI,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, RT, 18 Std (d)  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , Aceton, RT, 18 h.

Methoxygruppe geschützt (**50h**) und anschließend der Aldehyd zur Carbonsäure durch  $\text{KMnO}_4$  oxidiert (**53h**). Ein Teil dieser Edukte konnte käuflich erworben werden, der Großteil dieser Modifikationen wurde jedoch nach der Fusion der *N*-Phenylbenzamide durch einen Aufbau mit palladiumkatalysierten Suzuki-Reaktionen oder Abspaltungsreaktionen von Schutzgruppen durch basische Hydrolyse oder  $\text{BBr}_3$  erreicht. Die Synthesebausteine **47a-j** und **52q** wurden mit den Säurechloriden **54a-f** unter den Bedingungen der Schotten-Baumann-Synthese in der Einhornvariante in THF als Lösungsmittel und Pyridin als Hilfsbase bei Raumtemperatur fusioniert. Der Ethylester **47f** wurde zur Kupplung mit den Carbonsäurederivaten **53a-i** unter Einsatz von EDC in  $\text{CHCl}_3$  und 4-DMAP eingesetzt. Dabei wurden die Endsubstanzen **19**, **23-25**, **28**, **29** und **33**, die Ester **52a,b,d-f,h-o** und **r**, sowie die Bromide **55a-c** erhalten. Die Bromide **55a-c** wurden in Ethanol und Toluol gelöst und mit den Boronsäuren **50d,e** innerhalb einer Suzuki-Reaktion unter Verwendung von Tetrakis(triphenylphosphin)palladium<sup>0</sup> als Katalysator gekuppelt. Der Methoxyether in Substanz **52h** wurde durch Umsatz mit  $\text{BBr}_3$  abgespalten um den freien Alkohol in **52j** zu erhalten. Schlussendlich wurden alle veresterten Funktionen am aziden Kopfbaustein (**52a-p,r**) durch eine basische Hydrolyse unter Verwendung von LiOH mit Wasser und THF bei 60 °C über Nacht in die respektiven Carbonsäuren (**22,26,27,31,34-46**) überführt.

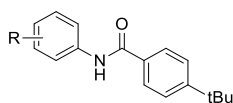
Für die biologische Evaluation wurde der FXR-Vollängenreportergenassay des Arbeitskreises, wie im Kapitel 2.1. beschrieben, verwendet. Nach der transienten Transfektion der HeLa-Zellen wurde mit den Testsubstanzen **22-46** in entsprechenden Konzentrationen in Konkurrenz zum FXR-Agonisten GW4064 (3  $\mu\text{M}$ , **7a**) inkubiert. 24 Stunden nach der Inkubation wurde mit dem Dual-Glo™ Kit lysiert und die Lumineszenz vermessen. Mithilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurde der  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt. Als Referenzsubstanz wurde GW4064 (**7a**) mit einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  verwendet. Jeder Messpunkt wurde in Triplikaten aufgenommen und jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt ( $n \geq 3$ ).



**Abbildung 37:** Reagenzien und Bedingungen: (a) Pyridin, DMF, THF, RT, 2 Std (b) EDC-HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 0 °C zu 80 °C, 4 Std (c) BBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C zu RT, 2 Std (d) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, Toluol, 80 °C, 16 Std (e) LiOH, THF, H<sub>2</sub>O, 60 °C, 16 Std.

Die ersten Untersuchungen waren auf die Position und Länge der Säurefunktion fokussiert (vgl. Tabelle 1). Dabei wurde das *tert*-Butylbenzamidstrukturelement nicht verändert. Innerhalb der Positionen sind *ortho*-(**22**) und *para*-Position (**23**) am Ring gegenüber *meta*-Stellung der Leitstruktur (**16**) überlegen. Da aber die *para*-Position einen noch besseren IC<sub>50</sub>-Wert von 0,076±0,009 µM vorwies, wurde entschieden an dieser Stelle die Säurekette zu verlängern. Im Vergleich zum Essigsäurederivat **23** konnte jedoch die Propion- (**24**) oder die Buttersäureverbindung (**25**) keine Veränderung der Potenz erzielen. Basierend auf dieser ersten SAR-Untersuchung wurde die 4-(4-(*tert*-Butyl)benzamido)-phenyllessigsäure (**23**) als neue Leitstruktur gewählt. Im nächsten Schritt wurden sterisch anspruchsvolle Substituenten am lipophilen Ende des Moleküls eingeführt (vgl. Tabelle 2). Die beiden Naphtylderivate **28** und **29** waren weniger aktiv als die Leitstruktur **23** und auch die Einführung einer Methylengruppe als bewegliche Brücke zwischen der Benzamidstruktur und dem Naphtylrest (**30**) führte zu keiner Potenzverbesserung, sondern vielmehr zu einem Aktivitätsverlust.

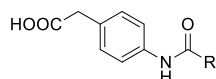
**Tabelle 1:** *In vitro* antagonistische Potenz an FXR der Verbindungen **16,22-25** in Konkurrenz mit **7a** (3  $\mu$ M), vermessen im FXR-Volllängenassay in HeLa-Zellen ( $IC_{50} \pm SEM$ ). Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens in drei Wiederholungen durchgeführt ( $n \geq 3$ ).<sup>100</sup>



ID	R =	$IC_{50}(hFXR)$ [ $\mu$ M]
<b>16</b>	3-CH <sub>2</sub> -COOH	0,4 $\pm$ 0,2
<b>22</b>	2-CH <sub>2</sub> -COOH	0,102 $\pm$ 0,007
<b>23</b>	4-CH <sub>2</sub> -COOH	0,076 $\pm$ 0,009
<b>24</b>	4-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	0,63 $\pm$ 0,03
<b>25</b>	4-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	0,7 $\pm$ 0,1

Durch die Biphenylderivate **31-33** konnte der Raum innerhalb der Bindungstasche von FXR durch diese Molekülklasse erforscht werden. Das 2-Biphenylderivat (**31**) war bei 30  $\mu$ M inaktiv und das 4-Biphenylderivat (**33**) erzeugte einen verschlechterten  $IC_{50}$ -Wert. Das 3-Biphenylderivat (**32**) besitzt eine äquivalente Aktivität wie die Leitstruktur (**23**). Da aus anderen SAR-Studien von FXR-Antagonisten innerhalb der Arbeitsgruppe eine 3-(3,5-Dichlorphenyl)-pyridinstruktur als potentes Strukturmotiv für FXR-Antagonisten bekannt war<sup>112</sup>, wurde die 3-Biphenylstruktur von **32** mit der 3,5-Dichlorsubstitution verbunden (**34**), doch die Potenz verschlechterte sich sichtlich.

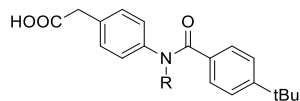
**Table 2:** *In vitro* antagonistische Potenz an FXR der Verbindungen **23,28-34** in Konkurrenz mit **7a** (3  $\mu$ M), vermessen im FXR-Volllängenassay in HeLa-Zellen ( $IC_{50} \pm SEM$ ). Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens in drei Wiederholungen durchgeführt ( $n \geq 3$ ).<sup>100</sup>



ID	R =	$IC_{50}(hFXR)$ [ $\mu$ M]
<b>23</b>	4-tBu-Ph	0,076 $\pm$ 0,009
<b>28</b>	1-naphthyl	0,81 $\pm$ 0,02
<b>29</b>	2-naphthyl	0,68 $\pm$ 0,01
<b>30</b>	-CH <sub>2</sub> -2-naphthyl	27 $\pm$ 1
<b>31</b>	2-biphenyl	inaktiv bei 30 $\mu$ M
<b>32</b>	3-biphenyl	0,28 $\pm$ 0,02
<b>33</b>	4-biphenyl	0,85 $\pm$ 0,01
<b>34</b>	3',5'-Cl <sub>2</sub> -3-biphenyl	9,1 $\pm$ 0,2

Die *N*-Alkylierung der Leitstruktur **23** durch kleine Reste wie die Methylgruppe (**26**) oder durch einen sterisch anspruchsvollen Rest wie die Benzylfunktion (**27**) führte zu keiner Verbesserung der Potenz (vgl Tabelle 3). Vielmehr verschlechterte sie sich so weit, dass weitere Substitutionen an dieser Position verworfen wurden.

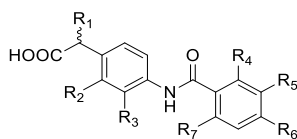
**Table 3:** *In vitro* antagonistische Potenz an FXR der Verbindungen **23,26-27** in Konkurrenz mit **7a** (3  $\mu\text{M}$ ), vermessen im FXR-Volllängenassay in HeLa-Zellen ( $\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$ ). Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens in drei Wiederholungen durchgeführt ( $n \geq 3$ ).<sup>100</sup>



ID	R =	$\text{IC}_{50}(\text{hFXR}) [\mu\text{M}]$
<b>23</b>	-H	0,076 $\pm$ 0,009
<b>26</b>	-CH <sub>3</sub>	8,1 $\pm$ 0,6
<b>27</b>	-CH <sub>2</sub> -Ph	2,2 $\pm$ 0,4

In weiteren SAR-Untersuchungen sollte der Raum eingegrenzt werden, der für Substituenten an den beiden Ringsystemen von **23** zur Verfügung steht (vgl. Tabelle 4). Innerhalb einer systematischen Methylierung der freien Positionen der aziden Kopfgruppe (**35-37**) konnte nur für die 2-Position zur

**Table 4** *In vitro* antagonistische Potenz an FXR der Verbindungen **23,35-46** in Konkurrenz mit **7a** (3  $\mu\text{M}$ ), vermessen im FXR-Volllängenassay in HeLa-Zellen ( $\text{IC}_{50} \pm \text{SEM}$ ). Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens in drei Wiederholungen durchgeführt ( $n \geq 3$ ).<sup>100</sup>



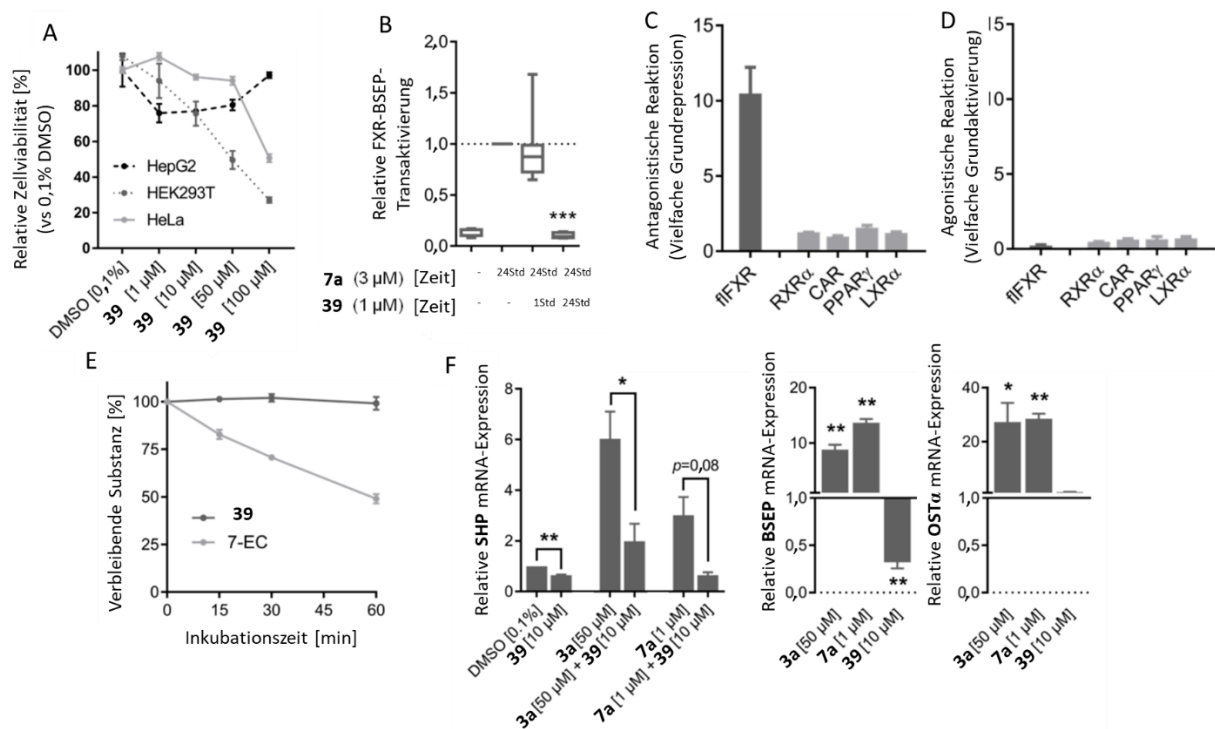
ID	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	$\text{IC}_{50}(\text{hFXR}) [\mu\text{M}]$
<b>23</b>	H	H	H	H	H	tBu	H	0,076 $\pm$ 0,009
<b>35</b>	-CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	tBu	H	0,97 $\pm$ 0,04
<b>36</b>	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	H	tBu	H	0,08 $\pm$ 0,01
<b>37</b>	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	tBu	H	1,5 $\pm$ 0,3
<b>38</b>	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	H	tBu	H	3,7 $\pm$ 0,2
<b>39</b>	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	tBu	H	0,0092 $\pm$ 0,0006
<b>40</b>	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	tBu	H	0,22 $\pm$ 0,01
<b>41</b>	H	H	H	-OH	H	tBu	H	0,14 $\pm$ 0,03
<b>32</b>	H	H	H	H	-Ph	H	H	0,28 $\pm$ 0,02
<b>42</b>	H	H	H	H	tBu	H	H	0,19 $\pm$ 0,02
<b>43</b>	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	tBu	H	H	3,3 $\pm$ 0,3
<b>44</b>	H	H	H	H	tBu	H	-OCH <sub>3</sub>	inaktiv bei 30 $\mu\text{M}$
<b>45</b>	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	-Ph	H	H	5 $\pm$ 1
<b>46</b>	H	H	H	H	-Ph	H	-OCH <sub>3</sub>	0,17 $\pm$ 0,02



Säurefunktion ein Potenziert beobachtet werden. Aber schon eine kleine Vergrößerung des Substituenten an dieser Position wie mit einer Methoxygruppe (**38**) führte zu einem Verlust der antagonistischen Potenz. Daraufhin wurden weitere Substitutionsänderungen im Vergleich zur Leitstruktur **23** an der aziden Kopfgruppe verworfen.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Derivat **32** wurde die *tert*-Butylfunktion von Position 4 auf Position 3 versetzt (**42**), wodurch sich eine Verbesserung der Potenz im Vergleich zu **32** ergab. Ähnlich zur Kopfgruppe wurden daraufhin auch alle freien Positionen des Benzamidsystems von **23** mit Methoxygruppen auf freien Raum für Substituenten untersucht. Hierbei konnte mit 4-*tert*-Butyl-2-methoxybenzamid **39** eine erhebliche Verbesserung des IC<sub>50</sub>-Wertes auf 0,0092±0,0006 µM in Konkurrenz gegen 3 µM GW4064 (**7a**) erreicht werden. Allein konnte Derivat **39** sogar einen IC<sub>50</sub>-Wert von 0,0013±0,0007 µM erzielen. Das 3-Methoxyderivat **40** dagegen konnte eine solche Potenz nicht erzielen. Die sich daraus ergebenden Derivate, mit einer Kombination einer Methoxygruppe in der 2-Position und einem Phenyl- oder *tert*-Butylrest in 3- oder 4-Position (**43-46**), führten nicht annähernd zu einem IC<sub>50</sub>-Wert wie bei **39**.

Daraufhin wurde die Substanz **39** *in vitro* auf ihre pharmakologischen Eigenschaften charakterisiert (vgl. Abbildung 38). Den gleichen Experimenten wie für die Leitstruktur **16** folgend, konnte keine Firefly-Luziferase-Inhibition innerhalb des FXR-Vollängenreportergenassays festgestellt werden und mit qRT-PCR-Experimenten konnte eine reduzierte intrinsische Expression von dem FXR-regulierten Gen SHP bewiesen werden. Die Toxizität der Substanz **39** wurde in WST-1-Assays bis hin zu Konzentrationen von 100 µM untersucht. Die Assays wurden in drei unterschiedlichen Zelltypen durchgeführt: HEK293T, HeLa, HepG2. Nach 24 Stunden Inkubationen mit der Verbindung **39** in den entsprechenden Konzentrationen 1 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM wurde WST-1-Reagenz (*Roche Diagnostic International AG*) nach dem Herstellerprotokoll hinzugefügt und nach weiteren 45 Minuten vermessen. Die genaue Methodenbeschreibung wurde veröffentlicht in der Publikation Schmidt *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 26, 4240-4253.<sup>100</sup> In HepG2-Zellen konnte bei einer Konzentration von 100 µM keine Toxizität bei einem WST-1-Assay beobachtet werden. In HeLa-Zellen wurde eine geminderte Zellviabilität bei 50 µM festgestellt und in HEK293T-Zellen erwies sich Substanz **39** als toxisch ab einer Konzentration von 10 µM. Des Weiteren konnte für **39** eine gute Wasserlöslichkeit von 16 mg/L festgestellt werden und nach 60 min Inkubation mit Mikrosomen der Rattenleber waren immer noch 95% der Substanz vorhanden, was eine gute metabolische Stabilität vermuten lässt (die Methodenbeschreibungen wurden genau beschrieben in der Publikation Schmidt *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 26, 4240-4253.<sup>100</sup>). Es wurde außerdem eine Selektivitätstestung von **39** in Gal4-Hybridreportergenassays bei einer Konzentration von 1 µM auf den FXR-verwandten nukleären Rezeptoren Retinoid X Rezeptor α (RXRα), Leber X Rezeptor α (LXRα), Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ (PPARγ) und konstitutiven Androstan-Rezeptor (CAR), die wie FXR durch Fettsäuremimetika aktiviert werden, durchgeführt. Der Gal4-Hybridreportergenassay basiert auf dem gleichen Prinzip wie der FXR-Vollängenreportergenassay und wurde wie in Kapitel 2.1 beschrieben in HEK293T-Zellen durchgeführt. Die Methodenbeschreibung wurde veröffentlicht in der Publikation Schmidt *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 26, 4240-4253.<sup>100</sup> Innerhalb der durchgeführten Gal4-Hybridreportergenassays in HEK293T-Zellen zur Selektivitätsprüfung konnte keine agonistische oder antagonistische Aktivität von **39** festgestellt werden.



**Abbildung 38:** (A) WST-1-Toxizitätsassay der Verbindung **39** in drei unterschiedlichen Zelllinien (HEK293T, HeLa, HepG2). Die jeweiligen Zelltypen werden für 24 Std mit Substanz **39** in den Konzentrationen 1 μM, 10 μM, 50 μM und 100 μM inkubiert. Anschließend wurde WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics International AG) aufgetragen und nach weiteren 45 min Inkubationszeit vermessen. Als Kontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet. Jede Konzentration wurde in Duplikaten vermessen. Jedes Experiment wurde dreimal wiederholt (n=3). Verbindung **39** besitzt keine Toxizität in HepG2-Zellen bei einer Konzentration von 100 μM, in HeLa-Zellen sind toxische Effekte ab einer Konzentration von 50 μM zu sehen, in HEK293T-Zellen sind Zellproliferationsminderungen schon ab 10 μM zu beobachten. (B) Kontrollelexperiment zur möglichen Firefly-Inhibition innerhalb des FXR-Volllängenreportergenassays in HeLa-Zellen. 24 Std nach der Transfektion wurden die HeLa-Zellen mit GW4064 bei einer Konzentration von 3 μM inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet. 23 Stunden nach der Inkubation wurde Substanz **39** (1 μM) zugegeben. Eine weitere Stunde später wurde mit Dual-Glo™ lysiert und die Lumineszenz vermessen. Jeder Messpunkt wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment sechsmal wiederholt (n=6). Es zeigte sich kein Einfluss von **39** auf die Lumineszenz der Firefly-Luziferase. (C/D) Selektivitäts-Gal4-Hybridreportergenassaydaten von Verbindung **39** in HEK293T-Zellen dargestellt als vielfache Grundaktivierung der Negativkontrolle. Die HEK293T-Zellen wurden 12-14 Std mit Substanz **39** in der Konzentration 1 μM sowohl alleine als auch mit dem Zusatz der respektiven Agonisten bei 1 μM inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle wurden die respektiven Agonisten (1 μM) benutzt. PPARγ: Pioglitazon, LXRα: T0901317, RARα: Tretinoin, CAR: CITCO. Jede Konzentration wurde in Duplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde dreimal wiederholt (n=3). Es konnte keine antagonistische oder agonistische Aktivität in der Selektivitätsüberprüfung festgestellt werden. (E) Die metabolische Stabilität von Verbindung **39** wurde über die Inkubation mit Rattenlebermikrosomen bestimmt. Nach 60 min wurden 95% der Substanz **39** detektiert. (F) Quantifizierung der Expression FXR-regulierter Gene. HepG2-Zellen wurden mit der Verbindung **39** in der Konzentration 10 μM allein oder in Konkurrenz mit den FXR-Agonisten CDCA (50 μM, **3a**) und GW4064 (1 μM, **7a**) für 24 Std inkubiert. Als Referenz wurden beide FXR-Agonisten allein verwendet. Die anschließende RNA-Extraktion erfolgte mit dem Total RNA Mini Kit (Omega Bio-Tek). Die RNA wurde mithilfe des High-Capacity cDNA Transkription Kit (Thermo Fischer Scientific) in komplementäre cDNA transkribiert. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über PowerSYBRGreen (Life Technologies), die respektiven Primer und der komplementären cDNA. Jeder Messpunkt wurde in Duplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde dreimal wiederholt (n=3). Die Substanz **39** reduziert die intrinsische und durch Referenzagonisten ausgelöste Expression von SHP und BSEP. Bei OSTα ist keine Modulation detektiert worden.<sup>100</sup>

Die Effekte von **39** auf die FXR-regulierten Gene SHP, BSEP und OSTα wurden durch die Quantifizierung der entsprechenden mRNA mittels qRT-PCR nach der Inkubation mit 10 μM **39** in HepG2-Zellen untersucht. Die experimentelle Vorgehensweise ist äquivalent wie bei Substanz **16** beschrieben bzw. ist veröffentlicht in der Publikation Schmidt *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2018**, 26, 4240-4253.<sup>100</sup> Die Expression von SHP und BSEP wurde gemindert, während die Expression von OSTα nicht beeinflusst wurde, was auf eine genselektive Modulation von **39** hinweist. Des Weiteren konnte Substanz **39** eine in Konkurrenz mit den FXR-Agonisten CDCA (**3a**) oder OCA (**5**) eine SHP-Expression mindern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine neue Klasse von FXR-Antagonisten entwickelt und über eine systematische und chemisch diverse SAR optimiert wurde. 2-(4-(4-(*tert*-Butyl)-2-methoxybenzamido)phenyl)essigsäure (**39**) zählt mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,0092±0,0006 µM in Konkurrenz gegen 3 µM GW4064 (**7a**) und allein mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 0,0013±0,0007 µM zu den potentesten FXR-Antagonisten in der Literatur. In Hepatozyten konnte keine Toxizität beobachtet werden und bei einer Quantifizierung der FXR-regulierten Gene SHP und BSEP durch qRT-PCR konnte eine antagonistische Wirkung von **39** nachgewiesen werden. Eine gute Wasserlöslichkeit und metabolische Stabilität, sowie die Selektivität gegenüber anderen nukleären Rezeptoren ebnet der Substanz **39** den Weg als Werkzeug zur *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung von FXR-Antagonismus.

Diese Ergebnisse wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Jurema Schmidt, Simone Schierle, Leonie Gellrich, Astrid Kaiser and Daniel Merk: Structural optimization and *in vitro* profiling of *N*-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26, 4240-4253.<sup>100</sup>

DOI: 10.1016/j.bmc.2018.07.017

Eigener Beitrag: Synthese aller beschriebenen Verbindungen, sowie *in vitro*-Charakterisierung in FXR-Vollängenreportergen- und Toxizitätsassays und qRT-PCR.

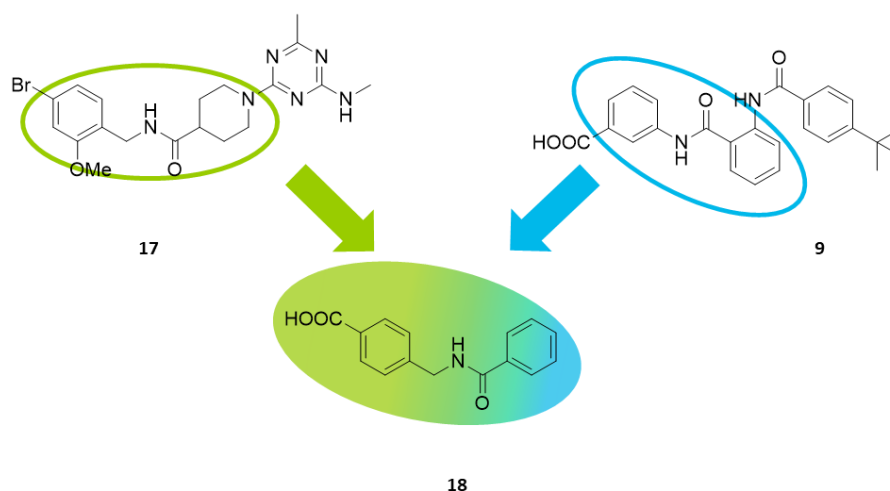
SS synthetisierte die Leitstruktur **16**.

LG führte die Selektivitätsuntersuchungen im Gal4-Hybridreportergenassay durch.

AK bestimmte die Reinheit der Testsubstanzen mittels HPLC und führte die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität und der Wasserlöslichkeit durch.

## 2.3 Duale Modulatoren für den Farnesoid X Rezeptor und die lösliche Epoxidhydrolase

Die beschriebene klinische Effizienz von FXR-Aktivierung zur Reduktion von fortschreitender NASH und hepatischer Fettakkumulation, sowie die nachweislichen antiinflammatorischen und antisteatotischen Effekte der sEH in der Leber<sup>101,113</sup> lassen eine duale Modulation von FXR und sEH als vielversprechende Strategie zur Behandlung von NAFLD und NASH erscheinen. Für die Entwicklung einer Leitstruktur solcher dualen Modulatoren wurden die Pharmakophore des sEH-Inhibitors GSK2188931B (**17**)<sup>102</sup> und einem FXR-Partialagonisten<sup>87</sup> **9**, der innerhalb der Arbeitsgruppe entwickelt wurde, miteinander verknüpft (Abbildung 39). Diese Leitstruktur **18** besitzt bei 50  $\mu\text{M}$  eine FXR-Aktivierung von  $12\pm 1\%$  und eine sEH-Inhibition von  $16\pm 2\%$ .

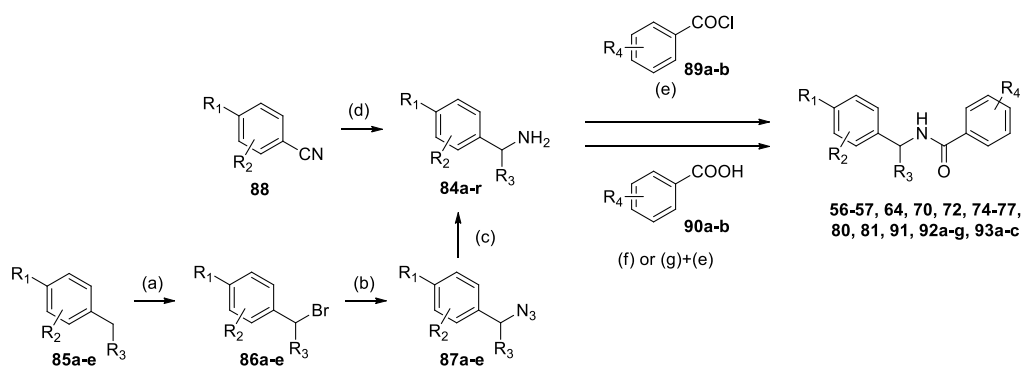


**Abbildung 39:** Leitstrukturbildung aus zwei unterschiedlichen Pharmakophoren von FXR und sEH.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden anhand dieser Leitstruktur erste systematische SAR-Untersuchungen innerhalb der Masterarbeiten von Marco Rotter und Tim Weiser durchgeführt. Dafür wurden die freien Positionen des Ringsystems des Benzamidsubstituenten zunächst methyliert und dann durch größere Biphenylreste ersetzt. Da eine doppelte Methylierung in 3- und 4-Position vorteilhaft erschien, wurden Naphthyl-, Halogen-, Methoxy- und Trifluormethyl-gruppen in dieser Position untersucht.

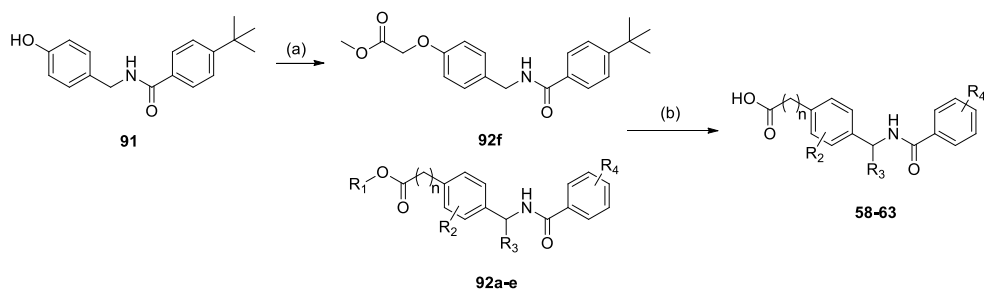
Anschließend wurde die Position und die Länge der Seitenkette der Carboxylfunktion variiert und die Methylierung der freien Positionen des aziden Ringsystems durchgeführt. Es folgten erste Substitutionen der sauren Kopfgruppe durch eine Aldehydfunktion, einer Alkoholgruppe und einem Methoxyelement. Basierend auf diesen Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Untersuchungen wurden die nachfolgenden Derivate **56-83** innerhalb der hier vorliegenden Arbeit synthetisiert (Abbildungen 40-44) und charakterisiert.

Die Synthese der Aminomethylbenzenvorstufen **84a-f** begann mit einer radikalischen Bromierung der entsprechenden Methylbenzenderivate **85a-f** mit NBS und AIBN um die Bromomethylbenzenderivate **86a-f** zu erhalten. Diese wurden in einer zweistufigen Staudingerreaktion mit Natriumazid zu den entsprechenden Aziden **87a-f** umgesetzt um dann mit Wasser und Triphenylphosphin reduziert zu werden. Das Aminomethylbenzenderivat **84g** wurde durch Reduktion des entsprechenden Nitrils (**88**) mit  $\text{LiAlH}_4$  erhalten. Die restlichen Aminomethylbenzenvorstufen **84h-r** waren käuflich erwerblich. Alle Aminomethylbenzene **84a-r** wurden entweder mit den Säurechloriden **89a-b** in einer Schotten-Baumann-Synthese als Einhornvariante mit Pyridin in THF bei Raumtemperatur oder mit den freien Carbonsäuren **90a-b** unter Verwendung von EDC und 4-DMAP zu den entsprechenden *N*-Benzylbenzamidinen umgesetzt (Abbildung 40).



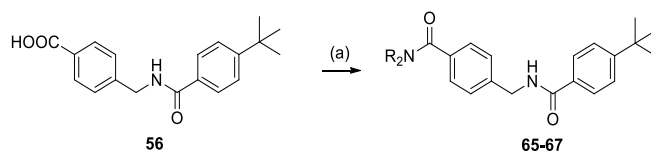
**Abbildung 40:** Reagenzien und Bedingungen: (a) NBS, AIBN, CHCl<sub>3</sub>, Reflux, 4 Std (b) NaN<sub>3</sub>, DMF, 80 °C, 16 Std (c) PPh<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, THF, RT, 12 Std (d) LiAlH<sub>4</sub>, THF, Reflux, 18 Std (e) Pyridin, THF, RT, 2 Std (f) EDC·HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 50 °C, 6 Std (g) SOCl<sub>2</sub>, DCM, DMF, Reflux, 4 Std.

Substanz **91** wurde mit Methyl 2-bromoacetat zum Methylester **92f** überführt. Alle Ester (**92a-f**) wurden unter alkalischen Bedingungen in die Endprodukte **58-63** hydrolysiert (Abbildung 41). Die freie Carbonsäure **56** wurde für die Synthese der Amide **65-67** verwendet (Abbildung 42).



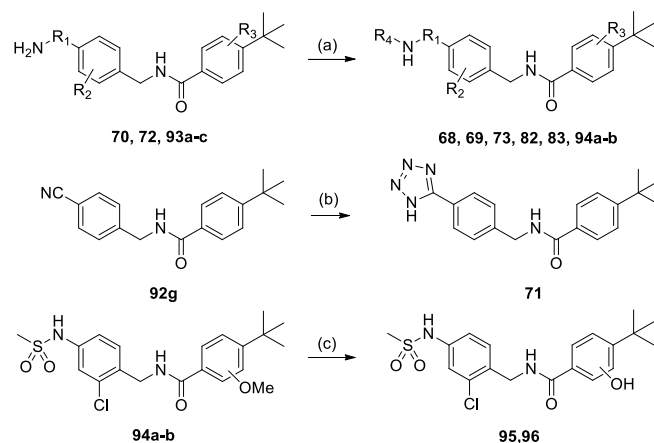
**Abbildung 41:** Reagenzien und Bedingungen: (a) BrCH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>, DMF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, RT, 18 Std (b) KOH, H<sub>2</sub>O, MeOH,  $\mu$ w, 15 min.

Die invertierten Amide **69**, **70** und **82**, sowie die invertierten Sulfonamide **73** und **83** wurden durch EDC, 4-DMAP und dem entsprechenden Alkohol oder Mesylchlorid aus den Substanzen **70**, **72** und **93a-c** dargestellt. Durch Zykoaddition mit Natriumazid und Kupferkatalyse wurde das Tetrazol **71** aus dem Nitrilderivat **92g** erhalten (Abbildung 43).



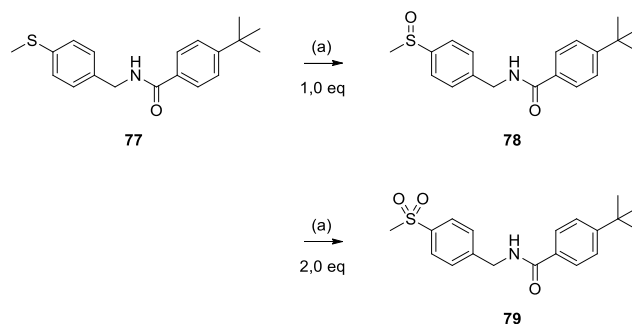
**Abbildung 42:** Reagenzien und Bedingungen: (a) R<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>Cl, EDC·HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 50 °C, 4 Std.

Die Methoxyderivate **94a,b** wurden mit der Standardvorgehensweise der Schotten-Baumann-Synthese in der Einhornvariante dargestellt und dann anschließend durch BBr<sub>3</sub> in die entsprechenden Hydroxyderivate **95** und **96** überführt (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** Reagenzien und Bedingungen: (a) R OH, EDC·HCl, DMAP,  $\text{CHCl}_3$ , 50 °C, 4 Std oder Mesylchlorid, THF, RT, 2 Std. (b)  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{NaN}_3$ , DMF, MeOH, 90 °C, 24 Std. (c)  $\text{BBr}_3$ , DCM, 0 °C zu RT, 2 Std.

Das Methylmercaptan **77** wurde durch die Wahl der passenden Äquivalente von *meta*-Chlorperbenzoesäure zum Sulfoxid **78** und dem Sulfon **79** oxidiert (Abbildung 44).



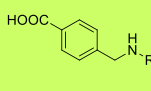
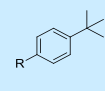
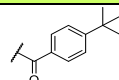
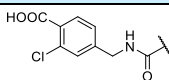
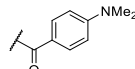
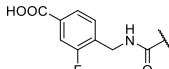
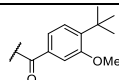
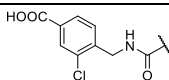
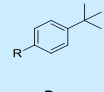
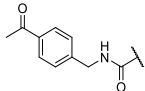
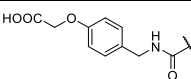
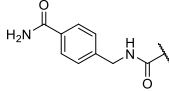
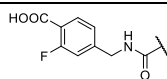
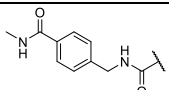
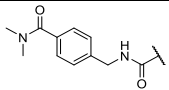
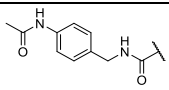
**Abbildung 44:** Reagenzien und Bedingungen: (a) mCPBA,  $\text{CHCl}_3$ , 0 °C für 2 Std oder RT für 18 Std.

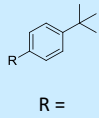
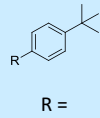
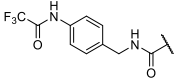
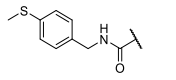
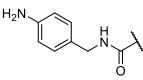
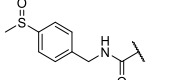
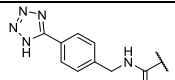
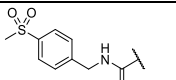
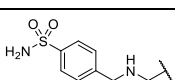
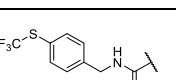
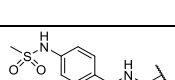
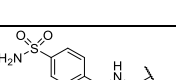
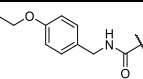
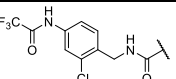
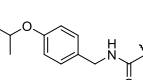
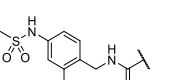
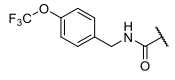
Die fast 60 Substanzen, die innerhalb der unterschiedlichen SAR-Studien vor und während dieser Arbeit zur Leitstruktur **18** dargestellt wurden, sind auf ihre Aktivität gegenüber FXR in dem in Kapitel 2.1 beschriebenen FXR-Vollängenreportergenassay des Arbeitskreises vermessen worden (vgl. Tabelle 5 für Substanzen **56-83**). Die Testung der Inhibition der sEH wurde durch innerhalb des Arbeitskreises Proschak in einem fluoreszenzbasierten Assay mit rekombinantem Enzym und dem fluorogenen sEH-Substrat PHOME<sup>114</sup> durchgeführt. Die exakte Methodenbeschreibung beider Assay-systeme wurde veröffentlicht in der Publikation Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup>

Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten SAR-Studien, die in der Benzamid-Teilstruktur eine Substitution in 4-Position und eine Kombination von 3- und 4-Position als vorteilhaft beschrieben, wurden noch sterisch anspruchsvollere Substituenten wie *tert*-Butyl- oder Dimethylamino-Gruppen an der *para*-Position eingeführt. Nur im Falle der *tert*-Butylfunktion **56** kam es zu einer Erhöhung der Potenz an FXR und sEH, wodurch Substanz **56** als neue Leitstruktur zur Optimierung des Benzoesäure-Strukturelementes ernannt wurde. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde der Austausch des *N*-Benzylbenzamid-Strukturbaues durch ein Harnstoffgerüst weder von FXR oder sEH toleriert und als wichtiges Element für die dualen Modulatoren identifiziert und daher hier nicht weiter modifiziert. Vorangegangene SAR-Studien zeigten, dass eine Variation der Position der Carboxylfunktion oder deren Seitenkettenverlängerung zu keinen deutlichen Verbesserungen gegenüber der Potenz der Leitstruktur **56** führten, worauf anschließend zusätzlich zur Carboxylfunktion in *para*-Position die freien Positionen des

Ringsystems methyliert wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurden diese Positionen mit Fluor- und Chlorsubstituenten besetzt. Hier ließ sich beobachten, dass die Positionen, die von FXR bevorzugt werden, im Gegensatz zu den von sEH favorisierten Stellungen stehen. Die hier folgende SAR-Studie beschäftigte sich daher ausgehend von Leitstruktur **56** mit der Carbonsäure des Benzoessäure-Systems. Unterschiedliche polare Gruppen und Bioisostere wurden als Ersatz der Carboxylfunktion eingeführt und auf ihre duale Modulation getestet. Einige der so erhaltenen Derivate konnten eine Verbesserung der Potenz der Leitstruktur **56** erzielen.

**Tabelle 5:** Tabellarische Zusammenfassung der Potenztestung an FXR und sEH von den Substanzen **56-83** über alle SAR-Schritte. EC<sub>50</sub>-Werte wurden über die im FXR-Vollängenreportergenassay erhaltenen Daten ermittelt. 24 Std nach der Transfektion wurden mit den entsprechenden Substanzen **56-83** in sinnvollen Konzentrationen inkubiert. Als Kontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle wurden der FXR-Agonist GW4064 (**7a**) in der Konzentration 3 µM benutzt. Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt (n≥3). Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch einen fluoreszenzbasierten Assay mit rekombinaten Enzym und dem fluorogenen sEH-Substrat PHOME<sup>114-116</sup> ermittelt. Als Blindkontrolle (engl.: *blank control*) wurde mit PHOME, aber ohne Enzym und Testsubstanzen vermessen, als Positivkontrolle wurde PHOME mit Enzym vermessen. Jede Konzentration wurde in Triplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt (n≥3).<sup>103</sup>

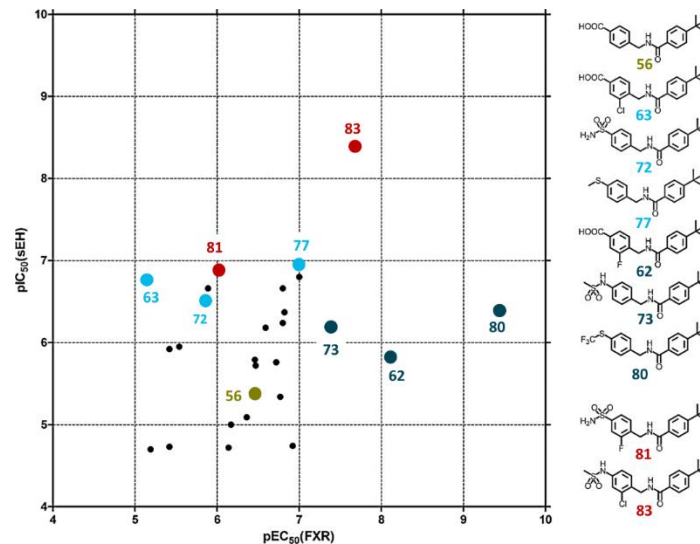
FXR-Aktivierung			sEH-Inhibition				
#		EC <sub>50</sub> (max. rel. Akt.) oder % Akt. bei bestimmter Konz.	IC <sub>50</sub> oder % Inhib. bei bestimmter Konz.	#		EC <sub>50</sub> (max. rel. Akt.) oder % Akt. bei bestimmter Konz.	IC <sub>50</sub> oder % Inhib. bei bestimmter Konz.
<b>56</b>		0,37±0,04 µM (13±1%)	4,2±0,8 µM	<b>61</b>		0,0088±0,0033 µM (21±2%)	50±1% inhibition (50 µM)
<b>57</b>		i. a. (50 µM)	19±1% Inhib. (50 µM)	<b>62</b>		0,0078±0,0007 µM (26±1%)	1,43±0,10 µM
<b>58</b>		1,2±0,4 µM (23±1%)	5,04±0,30 µM	<b>63</b>		7,5±0,4 µM (25±1%)	0,17±0,01 µM
FXR-Aktivierung			sEH-Inhibition				
#		EC <sub>50</sub> (max. rel. Akt.) oder % Akt. bei bestimmter Konz.	IC <sub>50</sub> oder % Inhib. bei bestimmter Konz.	<b>64</b>		0,10±0,01 µM (29±1%)	0,157±0,009 µM
<b>59</b>		0,73±0,18 µM (21±1%)	19,0±0,7 µM	<b>65</b>		3,8±0,3 µM (27±1%)	1,2±0,2 µM
<b>60</b>		0,14±0,06 µM (28±2%)	20,3±1,2 µM	<b>66</b>		0,34±0,03 µM (29±1%)	1,9±0,3 µM
<b>67</b>		0,17±0,01 µM (17±1%)	4,6±0,5 µM	<b>68</b>		2,9±0,2 µM (31±1%)	1,12±0,02 µM

#		<b>FXR- Aktivierung</b>	<b>sEH- Inhibition</b>	#		<b>FXR- Aktivierung</b>	<b>sEH- Inhibition</b>
	R =	EC <sub>50</sub> (max. rel. Akt.) oder % Akt. bei bestimmter Konz.	IC <sub>50</sub> oder % Inhib. bei bestimmter Konz.		R =	EC <sub>50</sub> (max. rel. Akt.) oder % Akt. bei bestimmter Konz.	IC <sub>50</sub> oder % Inhib. bei bestimmter Konz.
69		0,26±0,11 µM (20±1%)	0,66±0,01 µM	77		0,10±0,01 µM (33±1%)	0,12±0,01 µM
70		i. a. (50 µM)	3,5±0,2 µM	78		1,3±0,4 µM (24±1%)	0,22±0,03 µM
71		0,12±0,02 µM (23±1%)	18,2±3,2 µM	79		3,8±0,5 µM (34±1%)	1,2±0,1 µM
72		1,4±0,2 µM (16±1%)	0,28±0,12 µM	80		0,00040±0,00004 µM (19±1%)	0,39±0,05 µM
73		0,044±0,009 µM (22±1%)	0,65±0,04 µM	81		0,97±0,11 µM (34±1%)	0,137±0,018 µM
74		0,16±0,01 µM (31±1%)	0,57±0,05 µM	82		0,014±0,001 µM (21±1%)	0,0089±0,0016 µM
75		0,17±0,01 µM (26±1%)	nicht messbar aufgrund schlechter Löslichkeit	83		0,0204±0,0042 µM (35±1%)	0,0041±0,0004 µM
76		0,16±0,04 µM (26±1%)	0,22±0,06 µM				

Als Beispiele sind hierfür zu nennen: das Methylketonderivat **63** mit einem EC<sub>50(FXR)</sub>-Wert von 0,10±0,01 µM und 29±1% Aktivierung an FXR und einem IC<sub>50(sEH)</sub>-Wert von 0,157±0,009 µM an sEH, das inverse Sulfonamid **73** mit einem EC<sub>50(FXR)</sub>-Wert von 0,044±0,009 µM und 22±1% Aktivierung an FXR und einem IC<sub>50(sEH)</sub>-Wert von 0,65±0,04 µM an sEH oder das Trifluormethylmercaptan **80** mit einem EC<sub>50(FXR)</sub>-Wert von 0,00040±0,00004 µM und 19±1% Aktivierung an FXR und einem IC<sub>50(sEH)</sub>-Wert von 0,39±0,05 µM an sEH. Eine ausbalancierte duale Potenz im nanomolaren Bereich konnte aber dennoch nicht mit dieser SAR-Untersuchung erzielt werden. Deswegen sollten die am meisten bevorzugten Pharmakophorelemente miteinander kombiniert werden um synergistische Effekte in der Potenz sowohl an FXR als auch sEH zu erzielen. Um das zu erreichen wurden pEC<sub>50(FXR)</sub> und pIC<sub>50(sEH)</sub> der bisher potentesten Strukturen in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (Abbildung 45). Als potenteste FXR-Agonisten konnten das an dritter Position Fluor-substituierte Benzoesäurederivat **62**, das inverse Sulfonamid **73** und das Trifluormethylmercaptan **80** identifiziert werden. Das an dritter Stelle mit Chlor substituierte Benzylderivat **63**, das Sulfonamid **72** und das Mercaptan **77** erwiesen sich



als die potentesten sEH-Inhibitoren. Diese Strukturelemente wurden in den beiden Substanzen **81** und **83** miteinander kombiniert, wobei das *N*-(3-Chlorophenyl)methylsulfonamid **83** eine signifikante Verbesserung der Potenz sowohl an FXR als auch an der sEH erzielte. Sein  $EC_{50(FXR)}$ -Wert beträgt  $0,0204 \pm 0,0042 \mu\text{M}$  bei  $35 \pm 1\%$  Maximalaktivierung an FXR und erzeugte eine sEH-Inhibition mit einem  $IC_{50(sEH)}$ -Wert von  $0,0041 \pm 0,0004 \mu\text{M}$ . Die Wahl zur weiteren *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung einer dualen Modulation fiel auf Substanz **83**, aufgrund ihres herausragenden Aktivitätsprofils innerhalb dieser SAR-Untersuchung.

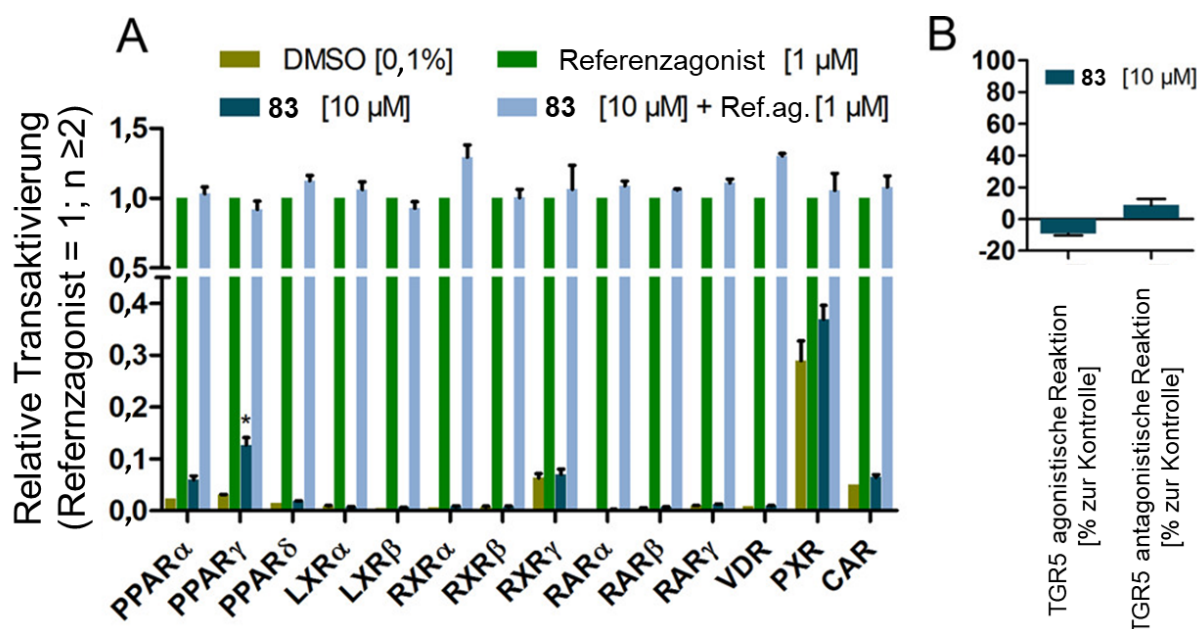


**Abbildung 45:** Das Potenzdiagramm der aktivsten Derivate führte zur Verschmelzung der Strukturelemente von **63** und **73** zur potentesten Substanz **83**.

Auch wenn in einem zellbasierten Reporterassay vielversprechende Ergebnisse einer Substanz in Struktur-Wirkungs-Beziehungsuntersuchungen erhalten wurden, benötigte es eine nachfolgende breite *in vitro*-Charakterisierung, um die Ergebnisse in einem weniger artifiziellen Rahmen zu bestätigen und damit den Weg für folgende *in vivo*-Experimente zu bereiten. Hierfür gibt es mehrere Bedingungen, die erfüllt werden müssen. In einem Reporterassay wird durch Transfektion nur das Rezeptorkonstrukt, das von Interesse ist, untersucht. Durch Selektivitätsmessungen gegenüber verwandten Rezeptoren wird im Vorfeld schon überprüft, ob in einem *in vivo*-Modell, in dem mehrere Rezeptoren vorkommen alle zu beobachtenden Effekte nur auf einen Rezeptor zurückverfolgen lassen. Um eine Aktivierung des Rezeptors durch eine Quantifizierung der exprimierten mRNA der entsprechenden Zielgene zu verifizieren bzw. auszuschließen, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Hierbei liegt der Vorteil auch darin, dass keine transfizierten HepG2-Zellen verwendet werden, was diesen Versuchsaufbau weniger artifiziell macht. Durch WST-1-Toxizitätsassays in HepG2-Zellen und Überprüfungen der metabolischen Stabilität mittels Rattenlebermikrosomen wird eine sichere Aufnahme der Substanz überprüft. Wenn es in diesen breiten biochemischen Evaluationen zu einem insgesamt positiven pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Profil kommt, kann die klinische Entwicklung der Substanz durch eine *in vivo*-Charakterisierung einen Schritt weitergehen.

In einem der ersten Schritte der *in vitro*-Untersuchungen wurde **83** auf Selektivität gegenüber anderen verwandten nukleären Rezeptoren studiert (vgl. Abbildung 46). Dazu wurde **83** bei einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  innerhalb des im Arbeitskreis etablierten Gal4-Hybridreporterassaysystems (Beschreibung in Kapitel 2.1) auf 14 verwandten nukleären Rezeptoren vermessen. Dazu wurden alle Subtypen der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs), Leber X Rezeptoren (LXRs), Retinoid X Rezeptoren (RXRs), Retinsäurerezeptoren (RARs), sowie der Pregnan X Rezeptor (PXR), der

konstitutive Androstan-Rezeptor (CAR) und der Vitamin D Rezeptor (VDR) ausgewählt. Hierzu werden in HEK293T-Zellen durch eine Transfektion mit Lipofectamin LTX (*Invitrogen*) die Plasmide pFR-Luc (*Stratagene*) für eine Firefly-Luziferase unter der Kontrolle des Gal4-RE, pRL-SV40 (*Promega*) als Renilla-Luziferase zur Normalisierung und für die jeweiligen Rezeptoren ein Fusionsplasmid aus der respektiven LBD und der Gal4-DBD eingebracht. Die Vorgehensweise, sowie die verwendeten Plasmide sind beschrieben in der Veröffentlichung Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup>

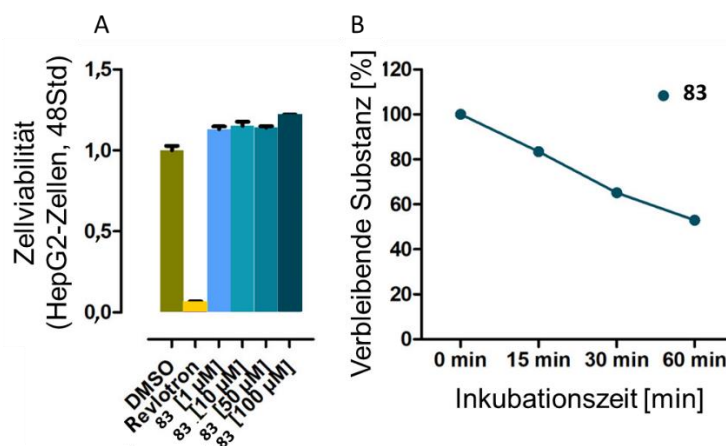


**Abbildung 46:** (A) Selektivitäts-Gal4-Hybridreportergenassaydaten von Verbindung **83** dargestellt als relative Transaktivierung bezogen auf die Aktivierung durch den respektiven Agonisten bei einer Konzentration von 1 μM. 5 Std nach der Transfektion wurde mit der Testsubstanz **83** in der Konzentration 10 μM sowohl alleine als auch mit dem Zusatz der entsprechenden Agonisten bei 1 μM inkubiert. Als Kontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle wurden die respektiven Agonisten (1 μM) benutzt. PPARα: GW7647, PPARγ: Pioglitazon, PPARδ: L165,041, LXRα/β: T0901317, RXRs: Bexaroten, RARs: Tretinoin, VDR: Calcitriol, PXR: SR12813, CAR: CITCO. Jede Konzentration wurde in Duplikaten durchgeführt und jedes Experiment wurde mindestens zweimal wiederholt (n ≥ 2). Es konnte, bis auf eine schwache partialagonistische Wirkung bei PPARγ, bei keinem der Rezeptoren eine antagonistische oder agonistische Aktivität in der Selektivitätsüberprüfung festgestellt werden (B) Verbindung **83** zeigte keine Aktivität an TGR5.

Dabei zeigte **83** keinerlei Aktivität gegenüber 13 der insgesamt 14 nukleären Rezeptoren. Einzige Ausnahme bildete hier PPARγ, an dem Substanz **83** eine schwach partialagonistische Aktivität mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 14,7 ± 0,9 μM aufweist. Weitere Selektivitätsuntersuchungen zeigten in einem Testsystem für TGR5, dass auch hier keine Aktivierung durch **83** gemessen werden konnte. Neben einer hohen Selektivität muss auch die Zelltoxizität einer Testsubstanz untersucht werden. Dafür wurden HepG2-Zellen im Zuge eines WST-1-Assays (wie beschrieben in Kapitel 2.1) mit der Verbindung **83** in den Konzentrationen 1 μM, 10 μM, 50 μM und 100 μM für 48 Stunden inkubiert. Es konnte keine Abnahme der Zellproliferation festgestellt werden. Anschließend wurde die metabolische Stabilität nach einer Inkubation mit Rattenlebermikrosomen bestimmt. Es wurde ein akzeptabler Wert von über 50% nach 60 Minuten erhalten (vgl. Abbildung 47). Die genauen Versuchsprotokolle für den WST-1-Assay und die Messung der metabolischen Stabilität wurden beschrieben in der Veröffentlichung Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup> Anschließend wurden die Umwandlung der Verbindung **83** in seine Metaboliten genauer untersucht. Die Charakterisierung der bei einer *in vitro*-Metabolisierung entstehenden Metaboliten durch LC-MS/MS ergab, dass **83** in das Anilinderivat **93a** zerfällt und durch Hydroxylierung des *tert*-Butylbenzamidelements in die möglichen Metaboliten **95**, **96** und **97** überführt werden kann. Die Synthese von **95** und **96** erlaubte den

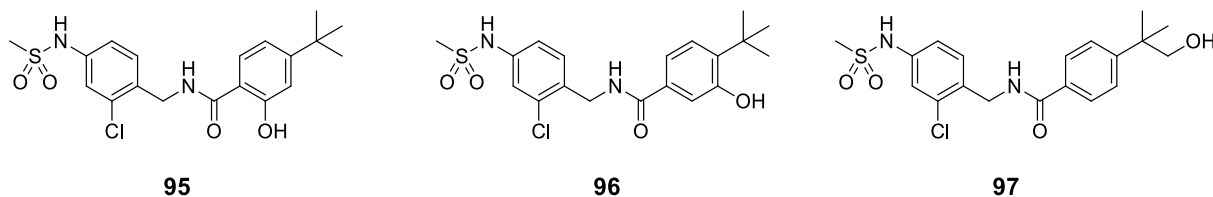
chromatographischen Vergleich mit den tatsächlich entstehenden Metaboliten, wobei Derivat **97** als zweiter Hauptmetabolit identifiziert werden konnte (Abbildung 48).

Der Einfluss der Substanz **83** auf die Expression von FXR-Zielgenen in einem weniger artifiziiellen System wurde mittels qRT-PCR (siehe wie in Kapitel 2.1) quantifiziert (vgl. Abbildung 49). Dafür wurden HepG2-Zellen mit **83**, in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ , inkubiert. Als Referenzsubstanzen wurden 50  $\mu\text{M}$  CDCA (**3a**), 1  $\mu\text{M}$  OCA (**5**) und 3  $\mu\text{M}$  GW4064 (**7a**) verwendet. Die genauen Primersequenzen, sowie die genauen Versuchsschritte sind beschrieben in Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup>

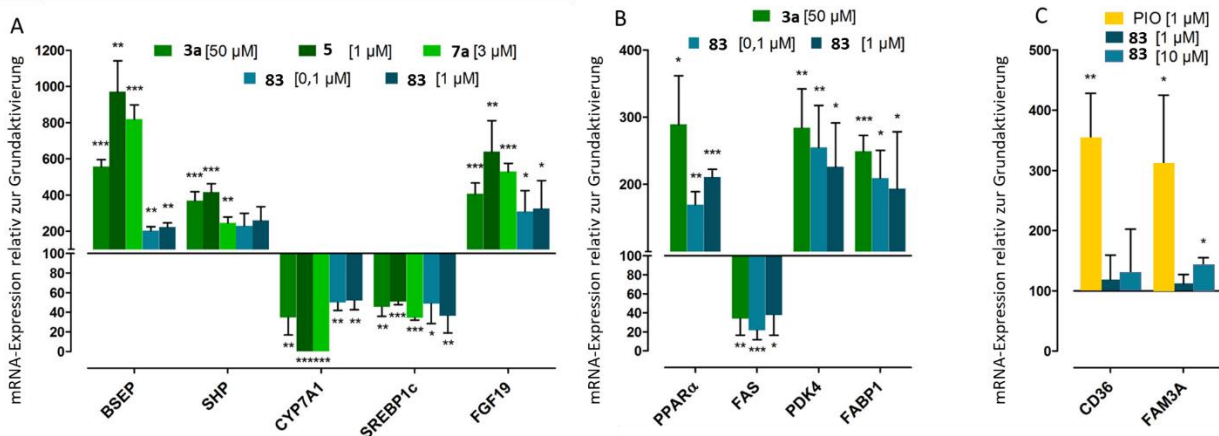


**Abbildung 47:** (A) WST-1-Toxizitätsassay in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std mit Verbindung **83** in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. 48 Std nach der Inkubation wurde WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics International AG) aufgetragen und nach weiteren 45 min vermessen. Als Kontrolle wurden DMSO (0,1%) und als Positivkontrolle Revlotron (100  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Jede Konzentration wurde in Duplikaten vermessen. Jedes Experiment wurde viermal wiederholt (n=4). Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  der Substanz **83** konnte keine Toxizität in HepG2-Zellen beobachtet werden. (B) Nach 60 min sind noch über 50% der Verbindung **83** nach Inkubation mit Rattenlebermikrosomen detektiert worden.<sup>103</sup>

In beiden verwendeten Konzentrationen erzeugte Substanz **83** die gleichen Effekte an allen getesteten Genen, woraus sich schließen lässt, dass schon bei 0,1  $\mu\text{M}$  eine Sättigungskonzentration eingetreten ist. Während BSEP durch **83** nur moderat induziert wurde, erreichte die Induktion von SHP, PPAR $\alpha$ , FGF19, PDK4 und FABP1 Werte, die 50-80% der Induktion durch 50  $\mu\text{M}$  CDCA (**3a**) entsprechen. Die Expression von CYP7A1, SREBP-1c und FAS, welche indirekt von FXR durch SHP reguliert werden, ist durch **83** gemindert. Insgesamt konnte Substanz **83** im Vergleich zu den Referenzsubstanzen OCA (**5**) und GW4064 (**7a**) eine partialagonistische Wirkung an FXR zeigen, während fast die gleiche Aktivität wie CDCA (**3a**) erreicht wurde (vgl. Abbildung 49). In Anbetracht der geringen Aktivierung von PPAR $\gamma$  durch Substanz **83** in der Selektivitätsmessung im Gal4-Reporterassay, wurde auch die Quantifizierung einiger Zielgene von PPAR $\gamma$  durchgeführt. Hierbei wurden der Scavenger-Rezeptor 3B (CD36) und das Zytokin-ähnliche Protein 2-19 (FAM3A) ausgewählt. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  der Substanz **83** konnte keine Modulation dieser Gene festgestellt werden (vgl. Abbildung 49).



**Abbildung 48:** Mögliche Hydroxylierungsmetabolite **95**, **96** und Hauptmetabolit **97**.

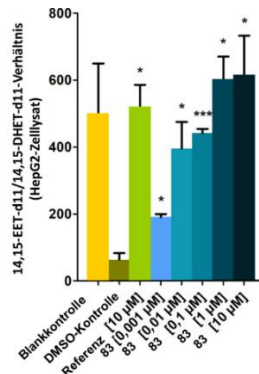


**Abbildung 49:** (A/B) Quantifizierung der Expression FXR-regulierter Gene. HepG2-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std wurde ein Mediumswechsel auf ein Minimalmedium durchgeführt, welches im Vergleich deutlich weniger Zucker enthält, um die basale Expression der FXR-regulierten Gene zu mindern, da sich dadurch dann die durch die Inkubation mit den Testsubstanzen hervorgerufenen Effekte besser beobachten lassen. Nach 24 Std werden die HepG2-Zellen mit der Verbindung **83** in den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM für 8-16 Std inkubiert. Als Negativkontrolle wurde mit DMSO (0,1%) und als Positivkontrollen die FXR-Agonisten CDCA (50 μM, **3a**), OCA (1 μM, **5**) und GW4064 (3 μM, **7a**) verwendet. Jede Konzentration wurde in Dublikaten pro Gen vermessen. Jedes Experiment wurde viermal wiederholt (n=4). qRT-PCR-Daten zeigen eine deutliche Modulation von direkten und indirekten FXR-Zielgenen durch Verbindung **83**. (C) Das gleiche Experiment wurde zur Selektivitätsüberprüfung anhand der Daten des Gal4-Hybridreportergenassays mit zwei PPARγ-Genen durchgeführt. **83** moduliert keine PPARγ-regulierte Gene.

Die Inhibition der sEH durch **83** wurde auch in einem weniger artifiziellen Rahmen im Vergleich zum fluoreszenzbasierten Assay an rekombinantem Protein vermessen (die genaue Beschreibung wurde veröffentlicht in Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup>) In HepG2-Zellen wurde die sEH-katalysierte Umwandlung von deuterierten 14,15-EET-*d*<sub>11</sub>-Substraten in die entsprechende DHET-Form untersucht. Aus dem Verhältnis von EET zu DHET konnte ein IC<sub>50(sEH)</sub>-Wert von ungefähr 1 nM bestimmt werden (vgl. Abbildung 50).

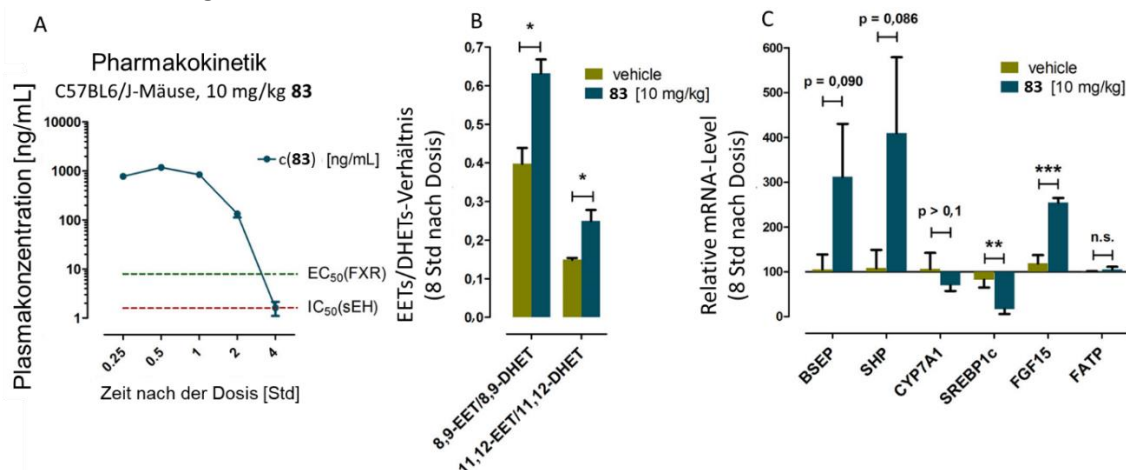
Antiinflammatorische Effekte konnten für Verbindung **83** in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen werden. In HepG2-Zellen konnte mittels qRT-PCR gezeigt werden, dass durch die Zugabe von **83** die Repression von NF-κB effizienter war, als durch die Zugabe von OCA (**5**), wodurch ein additiver Effekt von FXR-Aktivierung und sEH-Inhibition in Bezug zu antiinflammatorischen Eigenschaften angenommen wird.

In HuT-78 T-Helferzellen konnte 1 μM **83** nach 18 Stunden Inkubation zu einer Reduzierung von TNF-α führen, was mit Hilfe eines ELISA-Kit (*Invitrogen*) gezeigt werden konnte, während OCA (1 μM, **5**) keinen Effekt zeigte. In primären humanen Monozyten konnte **83** die Freisetzung von dem proinflammatorischen Zytokin, Interleukin-12 (IL-12), in einem größeren Maß inhibieren als OCA (**5**) und der sEH-Inhibitor *N*-Cyclohexyl-*N'*-(4-iodophenyl)-urea. Dafür wurden adhärenzte Monozyten in Makrophagen differenziert, indem über 7 Tage mit GM-CSF und in den letzten 48 Stunden mit IFNγ inkubiert wurde. Anschließend wurde mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert und für 16 Stunden mit der Verbindung **83** inkubiert. Die Messung erfolgte mit einem zytometrischen *Bead Array*. Ausgehend von diesen positiven *in vitro*-Untersuchungen wurde eine *in vivo*-Pilotstudie in männlichen Wildtypmäusen (C57BL6/J) durchgeführt (vgl. Abbildung 51). Die genauen Bedingungen der Studie sind dargelegt in der Publikation Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup> Sechs Tiere wurden mit einer Einzeldosis von 10 mg der Substanz **83** pro kg Körpergewicht gefüttert, während drei Tiere als Kontrollgruppe keine Zugabe von **83** erhielten. Eine gute orale Bioverfügbarkeit führt zu einer maximalen Plasmakonzentration von 1182 ng/mL. Eine schnelle Aufnahme ( $t_{max}=0,5$  Std), sowie eine moderate Halbwertszeit ( $t_{1/2}=0,7$  Std) konnten beobachtet werden.



**Abbildung 50:** Innerhalb des zellulären sEH-Assaysystem wurden HepG2-Zellen mit Substanz **83** in Konzentrationen von 0,001 µM bis 10 µM für 15 min bei 37 °C inkubiert. Als Referenzen wurden eine Negativkontrolle (DMSO) und *N*-Cyclohexyl-*N'*-(4-iodophenyl)urea (CIU) in einer Konzentration von 10 µM verwendet. Anschließend wurden 14,15-EET-*d*<sub>11</sub> zugegeben und weitere 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Verhältnis zur Umwandlung in 14,15-DHET-*d*<sub>11</sub> wurde anschließend mit LC-MS bestimmt. Das Experiment wurde dreimal wiederholt (n=3). Substanz **83** inhibiert die Umwandlung von EETs in DHETs in HepG2-Zellen.<sup>103</sup>

Den Versuchstieren wurden mehrere Plasmaproben nach der Gabe von Verbindung **83** entnommen, bis nach 8 Stunden eine finale Plasmaprobe, sowie die Lebern entnommen wurden. Aus dem Plasma wurde das Verhältnis von EET zu DHET bestimmt, woraus ersichtlich wurde, dass **83** im Vergleich zur Kontrollgruppe eine niedrige Umwandlungsrate der EETs zu DHETs erzeugte und **83** somit auch *in vivo* als sEH-Inhibitor fungiert.



**Abbildung 51:** (A) Pharmakokinetik von Substanz **83** in C57BL6/J-Mäusen. **83** wurde rasch aufgenommen und besitzt eine moderate Halbwertszeit *in vivo*. (B) Das Verhältnis von EET/DHET im Plasma der C57BL6/J-Mäuse wurde 8 Std nach der Aufnahme von Verbindung **83** mittels LC-MS/MS bestimmt. Dadurch konnte eine sEH-Inhibition durch Verbindung **83** *in vivo* nachgewiesen werden. (C) Quantifizierung der Expression FXR-regulierter Gene in Lebern aus C57BL6/J-Mäuse. C57BL6/J-Mäuse wurden 8 Std nach der Aufnahme von Verbindung **83** die Lebern entnommen. Als Negativkontrolle wurden die Lebern von nicht-behandelten C57BL6/J-Mäusen verwendet. Jede Konzentration wurde in Dublikaten pro Gen vermessen. Jedes Experiment wurde sechsmal wiederholt für die behandelten Lebern (n=6) und dreimal wiederholt für die nicht-behandelten Lebern (n=3). Die Daten zeigen eine deutliche partialagonistische FXR-Wirkung der Substanz **83**.<sup>103</sup>

Die Leberproben wurden zur Quantifizierung der exprimierten FXR-Zielgene verwendet. Hierfür wurden die Gewebeproben zunächst homogenisiert und die RNA mit dem Total RNA Kit (*Omega Bio-Tek*) extrahiert. Die Transkription von RNA zu cDNA erfolgte über das High Capacity cDNA reverse transcription-Kit (*Thermo Fischer Scientific*). Für die qRT-PCR wurde PowerSYBRGreen (*Life Technologies*) wie in Kapitel 2.1 beschrieben verwendet. Es wurden murine Primer eingesetzt. Die genauen Bedingungen, sowie die Primersequenzen sind dargelegt in der Publikation Schmidt *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60, 7703-7724.<sup>103</sup> Hierbei konnte bei BSEP, SHP und FGF15 ein Anstieg der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Expression von SREBP-1c und CYP7A1 wurde gemindert. Die synthetischen FXR-Agonisten OCA (**5**) und GW4064 (**7a**) erzeugen eine



deutlich stärkere Repression von CYP7A1 als **83**. Des Weiteren wurde auch das Fettsäuretransportprotein (engl: *fatty acid transport protein*, FATP) untersucht, welches ein Zielgen von PPAR $\gamma$  ist. Substanz **83** hatte *in vivo* keinen Einfluss auf die Expression von FATP.

Als Zusammenfassung der Ergebnisse wurde ausgehend von einer Leitstruktur, die aus den Pharmakophoren eines FXR-Partialagonisten<sup>87,89</sup> und eines sEH-Inhibitors<sup>102</sup> rational aufgebaut wurde, ein potenter dualer Modulator für FXR und sEH entwickelt. Über mehrere SAR-Untersuchungen an unterschiedlichen Bereichen der Leitstruktur wurde eine systematische aber im Vergleich geringfügige Strukturverbesserung erzielt. Um aber eine Potenz in einem nanomolaren Bereich an beiden Zielstrukturen zu erreichen, wurden die Daten der unterschiedlichen Substanzen als pEC<sub>50</sub>(FXR) und pIC<sub>50</sub>(sEH) in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen, um besonders wirkungsstarke Derivate zu identifizieren und in der Verbindung ihrer funktionellen Strukturelemente einen neuen potenteren dualen Modulator zu gewinnen. Dies ist in der Kombination bei Substanz **83** gelungen. **83** besitzt einen EC<sub>50</sub>(FXR)-Wert von 20,4 $\pm$ 4,2 nM und einen IC<sub>50</sub>(sEH)-Wert von 4,1 $\pm$ 0,4 nM. Die *in vitro*-Charakterisierungen von **83** zeigten eine Selektivität an FXR gegenüber anderen nukleären Rezeptoren und keine Toxizität in HepG2-Zellen bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M. In *in vitro*-Metabolisierungsversuchen war **83** ausreichend stabil, dies konnte auch mit *in vivo*-Daten bestätigt werden. Die Quantifizierung der Expression der FXR-Zielgene in HepG2-Zellen und in Wildtypmauslebern nach Gabe von Substanz **83** durch qRT-PCR zeigte eine partialagonistische Aktivierung von FXR, aber keinerlei Modulation an PPAR $\gamma$ -Zielgenen. Die sEH-Inhibition wurde *in vitro* und *in vivo* durch das Verhältnis von sEH-Substraten (EETs) zu sEH-Produkten (DHETs) bestätigt. Des Weiteren konnte ein additiver Effekt von FXR-Aktivierung und sEH-Inhibition durch **83** in der Reduktion von proinflammatorischen Faktoren beobachtet werden. Ausgehend von diesen Daten erscheint Substanz **83** geeignet in größeren Tiermodellen auf ihre therapeutische Effizienz untersucht zu werden, um das Konzept eines dualen Modulators von FXR und sEH zur Behandlung von NAFLD und NASH weiterzuentwickeln.

Diese Ergebnisse wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- Jurema Schmidt, Marco Rotter, Tim Weiser, Sandra Wittmann, Lilia Weizel, Astrid Kaiser, Jan Heering, Tamara Goebel, Carlo Angioni, Mario Wurglics, Alexander Paulke, Gerd Geisslinger, Astrid Kahnt, Dieter Steinhilber, Ewgenji Proschak and Daniel Merk: A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase To Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7703-7724.  
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00398
- Daniel Merk, Jurema Schmidt, Manfred Schubert-Zsilavec, Ewgenij Proschak: PCT/EP2017/062692 *Dual modulators of farnesoid X receptor and soluble epoxide hydrolase*. Filed 24.05.2017.

Eigener Beitrag: Synthese über der Hälfte der beschriebenen Verbindungen, sowie *in vitro*-Charakterisierung aller Verbindungen in Reporter- und Toxizitätsassays und qRT-PCR, *in vivo*-Charakterisierung aus einem Mausmodell mittels qRT-PCR.

MR und TW synthetisierten die ersten 25 Verbindungen innerhalb der Publikation.

SW und LW führten die sEH-Testungen *in vitro* und *in vivo* durch.

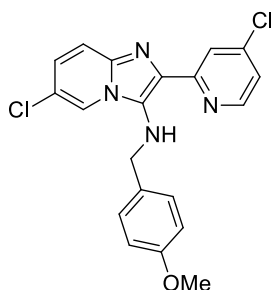
AK bestimmte die Reinheit der Testsubstanzen mittels HPLC und führte die Untersuchungen zur metabolischen Stabilität und der Wasserlöslichkeit durch.

TG führte die Quantifizierung von primären humanen Monozyten durch.

## 2.4 Nicht-azide Farnesoid X Rezeptor-Modulatoren

Zurzeit besitzen die meisten potenten nicht-steroidalen FXR-Agonisten eine negativ-ionisierbare funktionelle Gruppe. Dabei handelt es sich meist um eine Carbonsäure oder eine Esterfunktion, die *in vivo* leicht zur Carboxylgruppe hydrolysiert wird. Einige wenige nicht-azide gallensäureartige Alkohole wurden als FXR-Agonisten identifiziert, verfügten aber über eine geringe Potenz.<sup>117,118</sup>

Die weite Verbreitung eines aziden Strukturelements in FXR-Agonisten kann die zum Teil erheblichen Selektivitätsprobleme einiger dieser Substanzen erklären. Saure Verbindungen interagieren häufig mit unterschiedlichen fettsäurebindenden Zielstrukturen, wie beispielsweise nukleären Rezeptoren und G-proteingekoppelten Rezeptoren. Hinzu kommt, dass Carbonsäuren leicht in Glukuronide umgewandelt werden, die zum einen schnell über die Niere ausgeschieden werden und zum anderen ein gewisses toxisches Potenzial beinhalten. Durch einen nicht-aziden FXR-Aktivatoren sollen solche Nebeneffekte vermieden werden. Auch die Pharmakokinetik einer nicht-aziden Verbindung sollte eine erhöhte Resorption ermöglichen, da keine Protonierung wie bei einer Carbonsäure stattfinden muss, um im Darm aufgenommen zu werden.<sup>119</sup>



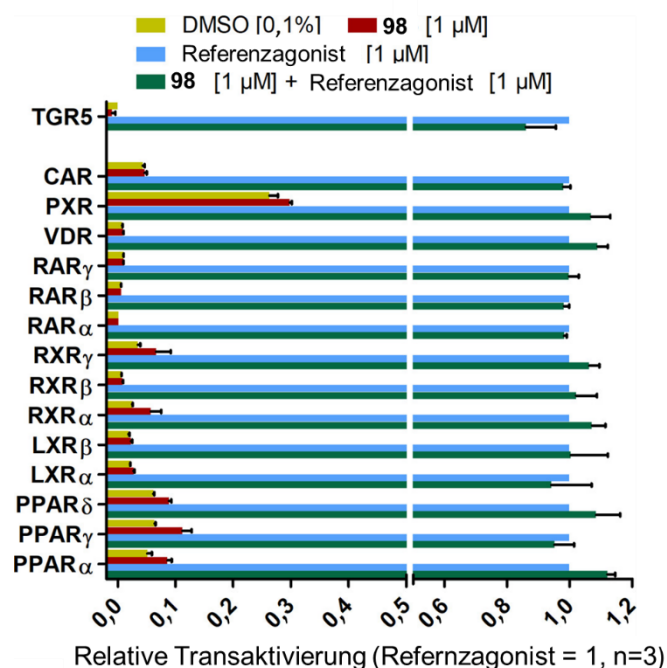
69

98

Abbildung 52: Testsubstanz 98.

In der Arbeitsgruppe wurde ein potenter FXR-Agonist entwickelt, der einen nicht-aziden Aufbau besitzt (Verbindung 98). In der hier vorliegenden Arbeit wurde durch umfangreiche *in vitro*-Charakterisierungen die Qualität dieser Verbindung 98 herausgearbeitet und evaluiert. Dabei wurden sowohl die Eigenschaften der Verbindung 98 in Toxizitätsmessungen durch WST-1-Assays in HepG2-Zellen, Metabolisierungsexperimente mit Rattenlebermikrosomen, Wasserlöslichkeitsbestimmungen und Selektivitätsmessungen durch Gal4-Hybridreportergenassays in HEK293T-Zellen untersucht, aber auch die Verbindung 98 in Bezug auf die Modulation von FXR-regulierter Genexpression in qRT-PCR-Experimenten aufgearbeitet.

Die Synthese des Imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyridins 98 wurde in einer Groebke-Blackburn-Drei-Komponenten-Reaktion im Arbeitskreis entwickelt und realisiert. Die Charakterisierung dieser Testsubstanz 98 wurde in dem im Arbeitskreis etablierten FXR-Vollängenreportergenassay (beschrieben in Kapitel 2.1) in HeLa-Zellen durchgeführt. Für die Substanz 98 konnte so ein EC<sub>50</sub>-Wert von 0,30±0,01 nM bei einer Maximalaktivierung von 23±1% an FXR bestimmt werden. Durch isotherme Titrationskalorimetrie (engl: *isothermal titration calorimetry*, ITC) wurde ein K<sub>d</sub> von 37 nM bestimmt, was auf eine hohe Bindungsaffinität des Liganden und FXR schließen lässt. Die Wasserlöslichkeit des Derivates 98 beträgt 63,7 ng/mL. Innerhalb eines WST-1-Toxizitätsassays in HepG2-Zellen wurden keine zytotoxischen Effekte bei einer Konzentration von 100 µM der Substanz 98 festgestellt. Dazu wurden HepG2-Zellen für 48 Stunden mit Verbindung 98 in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM inkubiert.



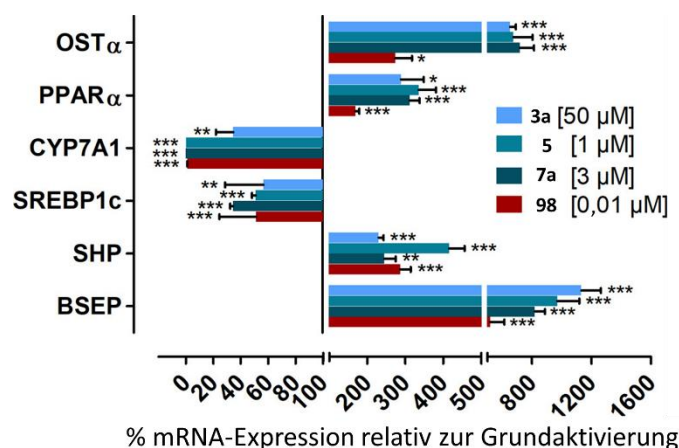
**Abbildung 53:** Selektivitätsprofil der Substanz **98** durch die Charakterisierung im Gal4-Hybridreportergenassay in HEK293T-Zellen dargestellt als relative Transaktivierung in Bezug zu den respektiven Positivkontrollen. 5 Std nach der Transfektion wurde mit der Substanz **98** in der Konzentration 1  $\mu$ M sowohl alleine als auch mit dem Zusatz der respektiven Agonisten bei 1  $\mu$ M inkubiert. Als Negativkontrolle wurde DMSO (0,1%) verwendet und als Positivkontrolle wurden die respektiven Agonisten (1  $\mu$ M) benutzt. PPAR $\alpha$ : GW7647, PPAR $\gamma$ : Pioglitazon, PPAR $\delta$ : L165,041, LXR $\alpha/\beta$ : TO901317, RXRs: Bexaroten, RARs: Tretinoin, VDR: Calcitrol, PXR: SR12813, CAR: CITCO. Jede Konzentration wurde in Duplikaten gemessen und jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt (n $\geq$ 3).<sup>104</sup>

Die Toxizität von **98** ist geringer als die Toxizität von OCA (**5**) und GW4064 (**7a**), bei denen durch ihren aziden Aufbau schon ab 50  $\mu$ M eine Abnahme der HepG2-Zellproliferation im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO (0,1%) beobachtet wurde. Die genauen Vorschriften der Experimente sind veröffentlicht in der *Supporting Information* der Publikation Flesch *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60(16), 7199-7205.<sup>104</sup>

Die Halbwertszeit der Substanz **98** liegt in HepG2-Zellen zwischen 1,5 und 2 Stunden und nach 24 Stunden sind noch 12% der Ursprungsmenge von **98** vorhanden. Die Selektivitätsmessung gegenüber anderen verwandten nukleären Rezeptoren wurde in einem Gal4-Hybridreportergenassay (beschrieben in Kapitel 2.1) bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M des Derivates **98** allein und in Konkurrenz mit dem entsprechenden Referenzagonisten in einer Konzentration von 1  $\mu$ M durchgeführt. Es konnte weder agonistische oder antagonistische Aktivität von **98** gegenüber allen Subtypen von PPAR, LXR, RXR, RAR, VDR, PXR und CAR festgestellt werden. Auch der G-proteingekoppelte Rezeptor TGR5 wird nicht von Substanz **98** moduliert (vgl. Abbildung 53).

Zur Quantifizierung der Expression von FXR-regulierten Genen auf mRNA-Ebene wurden qRT-PCR-Experimente in HepG2-Zellen durchgeführt (vgl. Abbildung 54). Die genaue Vorschrift für diese Methoden wurde beschrieben in der *Supporting Information* der Publikation Flesch *et al. Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 60(16), 7199-7205.<sup>104</sup> Schon bei einer Konzentration von 10 nM konnte **98** eine erhöhte Expression von BSEP, SHP, OST $\alpha$  und PPAR $\alpha$  bewirken. Die indirekten Zielgene CYP7A1 und SREBP1c wurden in ihrer Expression gehindert. Im Vergleich zu den Referenzsubstanzen OCA (**5**), CDCA (**3a**) und GW4064 (**7a**) besitzt die Verbindung **98** eine niedrigere Effektivität in der Modulation dieser Gene, was für **98** als FXR-Partialagonist spricht. Innerhalb der getesteten Zielgene wurde aber keine Präferenz von **98** festgestellt, was für eine nicht-genselektive Modulation von FXR durch **98** spricht.





**Abbildung 54:** Quantifizierung der Expression FXR-regulierter Gene. HepG2-Zellen wurden ausgesät und nach 24 Std wurde ein Mediumswechsel auf ein Minimalmedium durchgeführt, welches im Vergleich deutlich weniger Zucker enthält, um die basale Expression der FXR-regulierten Gene zu mindern, da sich dadurch dann die durch die Inkubation mit den Testsubstanzen hervorgerufenen Effekte besser beobachten lassen. Nach weiteren 24 Std wurde mit der Substanz **98** bei einer Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  oder die FXR-Agonisten CDCA (50  $\mu\text{M}$  **3a**), OCA (1  $\mu\text{M}$ , **5**) und GW4064 (3  $\mu\text{M}$ , **7a**) für 8 Std inkubiert. Jede Konzentration wurde in Duplikaten pro Gen vermessen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt ( $n \geq 3$ ). Die Daten zeigen eine induzierte Expression der ausgewählten FXR-regulierten Gene durch Substanz **98**.<sup>104</sup>

Insgesamt konnte in dieser SAR-Untersuchung ein sehr potenter FXR-Partialagonist (**98**) ohne azide funktionelle Gruppe entwickelt und *in vitro* charakterisiert werden. Die starke Potenz mit einem subnanomolaren  $\text{EC}_{50}$ -Wert und die Selektivität an FXR unterstreichen das Konzept der Nebeneffektminderung durch Substitution einer leicht negativ-ionisierbaren funktionellen Gruppe mit einem nicht-aziden Strukturelement. Verbindung **98** zeigte auch in HepG2-Zellen eine Modulation von FXR-regulierten Genen und wird zusammen mit seiner niedrigen Toxizität im Vergleich mit Referenzagonisten zu einer interessanten Substanz für weitere Entwicklungen hinsichtlich partieller FXR-Modulation.

Diese Ergebnisse wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Daniel Flesch\*, Sun-Yee Cheung\*, Jurema Schmidt\*, Matthias Gabler, Pascal Heitel, Jan Kramer, Astrid Kaiser, Markus Hartmann, Mara Lindner, Kerstin Lüddens-Dämgen, Jan Heering, Christina Lamers, Hartmut Lüddens, Mario Wurglics, Ewgenij Proschak, Manfred Schubert-Zsilavec and Daniel Merk: Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, 60(16), 7199-7205.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00903

\*Hier liegt eine geteilte Erstauthorenschaft zwischen DF, S-YC und JS vor.

Eigener Beitrag: *in vitro*-Charakterisierung in Reporter- und Toxizitätsassays und qRT-PCR.

DF und SC synthetisierten alle Verbindungen.

JS, DF und MG testeten die Verbindungen in dem FXR-Vollängenreporterassay.

### 3. Zusammenfassung

Der ligandaktivierte Transkriptionsfaktor Farnesoid X Rezeptor (FXR) ist neben seiner Funktion als Regulator des Gallensäurehaushaltes auch in vielen anderen metabolischen Prozessen wie Glukose- und Lipidhomöostase involviert und besitzt anti-inflammatorische Eigenschaften.<sup>9,74,75</sup> Gerade bei hepatischen, gastrointestinalen und systemischen Erkrankungen erscheint FXR daher als interessante Zielstruktur zur Behandlung metabolischer Erkrankungen.<sup>51</sup> Basierend auf den natürlichen Liganden von FXR, den Gallensäuren, wurde Obeticholsäure (OCA, **5**) als semisynthetisches Derivat der endogenen Chenodesoxycholsäure (CDCA, **3a**) zu einem potenten FXR-Agonisten entwickelt. OCA (**5**) wurde in mehreren klinische Studien auf seine therapeutische Wirkung bei hepatisch-entzündlichen Krankheitsbildern wie der primären biliären Cholangitis (PBC), der nicht-alkoholischen Fettleber (engl: *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) und der daraus folgenden nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) getestet.<sup>8,9,58</sup> Mittlerweile ist OCA (**5**) als Zweitlinientherapie der PBC auf dem Arzneimittelmarkt zugelassen.<sup>60</sup> Neben OCA (**5**) gibt es noch eine große Anzahl an weiteren FXR-Liganden, deren strukturelle Diversität von Steroiden bis nicht-steroidalen kleinen Molekülen (engl: *small molecules*) reicht. Trotz dieser Erfolge muss das Therapiepotential von FXR noch weiter ausgebaut werden. Die meisten verfügbaren Liganden besitzen *in vitro* zwar eine hohe Potenz, können in ihrem pharmakokinetischen Profil oder ihrer Selektivität gegenüber anderen nukleären Rezeptoren aber nicht überzeugen.<sup>8,12,86,97</sup> Damit die Behandlung von hepatischen und metabolischen Erkrankungen durch Modulatoren von FXR ermöglicht wird, bedarf es einer sicheren und selektiven Validierung der auftretenden pharmakologischen Effekte und Mechanismen.<sup>86</sup>

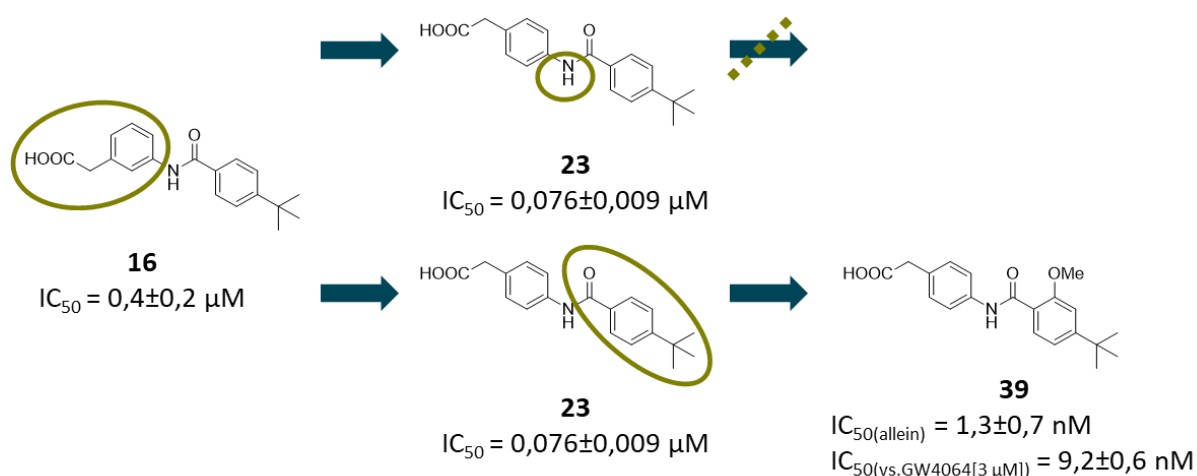
Die hier vorliegende Arbeit hat sich mit der Entwicklung unterschiedlicher Liganden für FXR beschäftigt und diese *in vitro* und teilweise auch *in vivo* charakterisiert, um sie entsprechend ihrer Wirkungsweise einzuordnen und ein besseres Verständnis der regulatorischen Funktion von FXR zu erlangen.

Modulation von FXR bezieht sich nicht nur auf die agonistische Aktivierung, sondern setzt sich auch mit Antagonismus auseinander. Neben einigen Krankheitsbildern, die aus einer Überexpression von FXR resultieren, werden Antagonisten als Werkzeug (engl: *tool compound*) zur Aufklärung von konformellen Veränderungen von FXR und deren Auswirkung auf bestimmte Signalwege benötigt. Für die Erforschung solcher FXR-Antagonisten sollte das Potential nicht-steroidaler Antirheumatika (engl: *non-steroidal anti-rheumatic drugs*, NSAIDs) als etwaige Leitstrukturen untersucht werden, da in einer Veröffentlichung von Lu *et al.*<sup>98</sup> ein FXR-Antagonismus durch NSAIDs postuliert wurde. Beim Versuch der Reproduktion der Ergebnisse von Lu *et al.*<sup>98</sup> mit den drei NSAIDs Ibuprofen (**19**), Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) wurde festgestellt, dass die Effekte bei genaueren Untersuchungen als Zytotoxizität identifiziert wurden.

Das lässt sich durch mehrere Faktoren erklären. Die Wahl von CDCA (**3a**) als Referenzsubstanz durch Lu *et al.*<sup>98</sup> für einen Reporterassay ist suboptimal, da zum einen die Konzentration zur Aktivierung recht hoch gewählt werden muss und zum anderen eine wesentliche Zelltoxizität bei einer solchen Konzentration auftritt. Diese Toxizität wird sogar noch verstärkt, wenn CDCA (**3a**) als kompetitive Substanz für die Messung eines Antagonisten genutzt wird. Lu *et al.*<sup>98</sup> verwenden in ihrem Reporterassay außerdem kein Kontrollgen, wie beispielsweise eine Renilla-Luziferase. Ein Kontrollgen ist nicht von einem Antagonisten beeinflusst und dadurch kann überprüft werden, ob eine reduzierte Aktivität innerhalb dieses Assays auf einen tatsächlichen Antagonismus zurückgeht, oder ob die Werte des Kontrollgens aufgrund von Toxizität sinken. In mehreren WST-1-Zellviabilitätsassays in HEK293T- und HepG2-Zellen konnten ähnliche IC<sub>50</sub>-Werte wie von Lu *et al.*<sup>98</sup> im Reporterassay erhalten werden und für Indometacin (**20**) und Diclofenac (**21**) eine toxische Wirkung ab einer Konzentration

von 30  $\mu\text{M}$  in sechs Stunden Inkubationszeit festgestellt werden. Dass es sich bei den NSAIDs um FXR-Liganden handelt, wurde außerdem mittels einer Quantifizierung der Expression von FXR-Zielgenen durch qRT-PCR und eines thermischen Verschiebungssassay (engl: *thermal shift assay*) weiter ausgeschlossen. Dabei wurde kein Beweis für die Hypothese, dass NSAIDs FXR-Liganden sind, gefunden. Die Wahl der Gene bei einer qRT-PCR ist entscheidend für ein aussagekräftiges Ergebnis. Nur direkte Zielgene führen zu einer klaren Verbindung von Rezeptor und Ligand, da indirekte Modulation auch von anderen Faktoren beeinflusst werden kann. Die Wahl des Zielgens SHP von Lu *et al.*<sup>98</sup> für qRT-PCR-Experimente und das indirekt kontrollierte CYP7A1 erwiesen sich als ungünstig, da CYP7A1 durch SHP nur indirekt von FXR reguliert wird, SHP aber selber auch noch von anderen nukleären Faktoren reguliert wird. Insgesamt lässt sich der von Lu *et al.* beobachtete vermeintliche FXR-Antagonismus der NSAIDs durch deren toxische Effekte in instabilen und statistisch nicht überprüfbareren Assaysystemen erklären und konnte innerhalb einer umfassenden biochemischen Evaluation widerlegt werden.

Validierte FXR-Antagonisten wie Guggulsteron (**4**) oder Gly-MCA (**10**) sind auf ihre therapeutische Wirksamkeit untersucht worden, aber die genaue Wirkweise ist noch nicht aufgeklärt.<sup>77,92</sup> Aufgrund ihrer steroidal Grundstruktur ist ihre Selektivität gegenüber anderen nukleären Rezeptoren fraglich. Die überschaubare Anzahl an publizierten nicht-steroidalen FXR-Antagonisten besitzt zwar moderate  $\text{IC}_{50}$ -Werte, ihre strukturelle Diversität und Selektivität ist aber limitiert.<sup>53</sup> Zur Entwicklung neuer potenter FXR-Antagonisten, die aus kleinen Molekülen (engl: *small molecules*) aufgebaut sind, wurde eine *N*-Phenylbenzamid-Leitstruktur **16** ausgewählt. Diese Leitstruktur **16** wurde im Rahmen der SAR-Untersuchungen zur Entwicklung von Anthranilsäurederivaten als FXR-Partialagonisten<sup>87,89</sup> innerhalb des Arbeitskreises entdeckt. Ausgehend von dieser Leitstruktur **16** wurde eine mehrstufige, systematische SAR-Untersuchung durchgeführt, wodurch ein potenter FXR-Antagonist entwickelt werden konnte (vgl. Abbildung 55), der anschließend umfangreich biochemisch auf FXR-Modulation, Selektivität, Löslichkeit, Toxizität und metabolische Stabilität charakterisiert wurde.



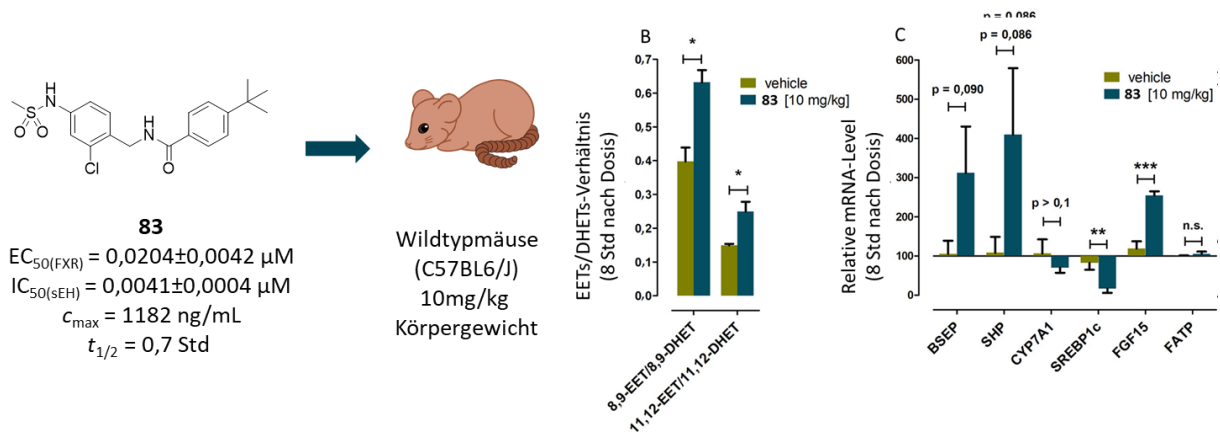
**Abbildung 55:** SAR-Studien der Leitstruktur **16**. Zuerst wurde das Phenylessigsäure-Strukturelement systematisch untersucht und dadurch die neue Leitstruktur **23** entwickelt. Eine *N*-Alkylierung führte zu keiner Verbesserung der Potenz. Bei Untersuchungen des Benzamidteils der Grundstruktur konnte die potenteste Substanz **39** dargestellt werden.

Die ersten Schritte der SAR-Untersuchung bezogen sich auf die Entwicklung der aziden Kopfgruppe. Die Position, sowie die Länge der Seitenkette der Carboxylfunktion wurden variiert und mit der Substanz **23** eine deutliche Optimierung zur Leitstruktur **16** erzielt, sodass sie als neue Leitstruktur für

die nächsten Schritte der SAR-Untersuchungen festgelegt wurde. Das Einführen von Substituenten innerhalb des Phenylessigsäure-Strukturelements erwies sich als nicht potenzsteigernd. Auch eine *N*-Alkylierung führte weder mit kleinen noch mit großen Substituenten zu einer Optimierung. Die Benzamidgruppe wurde auf eine mögliche Vergrößerung des sterischen Anspruches untersucht. Eine Vielzahl an Strukturelementen und deren unterschiedliche Raumausrichtung zeigten eine Begünstigung der 3- und 4-Position des Benzamidstrukturelements für einen großen Substituenten. Bei der Einführung einer Methoxygruppe in *meta*-Position mit einem *tert*-Butylrest in *para*-Position konnte die potenteste Struktur **39** aller SAR-Schritte erhalten werden. Sie besitzt einen IC<sub>50</sub>-Wert von 9,2±0,6 nM in Konkurrenz gegen 3 µM GW4064 (**7a**) und einen IC<sub>50</sub>-Wert von 1,3±0,7 nM zur FXR-Grundaktivierung im FXR-Volllängenassay in HeLa-Zellen. Anschließend wurde die antagonistische Potenz von **39** in HepG2-Zellen allein und in Kombination mit 1 µM GW4064 (**7a**) bzw. dem endogenen Liganden CDCA (**3a**) in einer Konzentration von 50 µM weiter verifiziert. Die Expression der FXR-regulierten Gene SHP und BSEP auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR zeigte eine Reduktion im Gegensatz zu den Referenzagonisten. Bei OSTα konnte beobachtet werden, dass es zu keinerlei Modulation kam, was auf einen genselektiven Antagonismus hinweist. Neben einer hohen metabolischen Stabilität und einer moderaten Löslichkeit, besitzt die Verbindung **39** in HepG2-Zellen bei einer Konzentration von 100 µM keine toxischen Effekte. Erst in den Zelllinien HeLa und HEK293T konnten in Konzentrationen über 50 µM bzw. über 10 µM eine durch **39** verminderte Proliferationsrate festgestellt werden. Insgesamt ist durch dieses Projekt die neue Klasse der *N*-phenylbenzamidbasierten FXR-Antagonisten entwickelt worden. Mit Verbindung **39** konnte ein sehr potenter und in vielen *in vitro*-Experimenten als vielversprechend charakterisierter Vertreter dieser Gruppe dargestellt werden, der für weitere Untersuchungen des FXR-Antagonismus verwendet werden kann.

Neben dem Verständnis eines Modulationsmechanismus ist die konkrete Anwendung eines FXR-Liganden zu therapeutischen Zwecken von großem Interesse. Die Beteiligung von FXR in unterschiedlichen metabolischen Prozessen macht den Rezeptor zu einem begehrten Ansatzpunkt für die Wirkstoffentwicklung. Doch die Behandlung eines multifaktoriellen Krankheitsbildes (z.B. metabolisches Syndrom, NASH) sollte sich nicht nur auf einen der gestörten Signalwege beziehen, da diese Erkrankungen durch mehrere Faktoren ausgelöst oder beeinflusst werden. Der semisynthetische FXR-Agonist OCA (**5**) zeigte innerhalb der FLINT-Studie sowohl anti-entzündliche und antifibrotische Effekte, als auch eine Verbesserung der metabolischen Parameter mit Blick auf NAFLD und NASH. Die Hemmung der löslichen Epoxidhydrolase (engl: *soluble epoxidhydrolase*, sEH) besitzt nachweislich anti-inflammatorische und antisteatotische Effekte in der Leber.<sup>101,113</sup> Aus diesem Grund wurde eine Leitstruktur (**18**) entwickelt, die eine duale Modulation aus FXR-Aktivierung und sEH-Inhibition erzeugt. Dafür wurden die Pharmakophore eines im Arbeitskreis entwickelten FXR-Partialagonisten<sup>87,89</sup> (**9**) sowie eines potenten sEH-Inhibitors<sup>102</sup> (**17**) miteinander verknüpft. Zur Weiterentwicklung einer ausgewogenen hohen Potenz an FXR und sEH wurden mehrere unterschiedliche SAR-Untersuchungen als translationales Projekt in mehreren Arbeiten durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit konnten diese SAR-Untersuchungen zusammengeführt und weiterentwickelt werden. Bei der Modifikation der aziden Kopfgruppe durch Variation der Position oder der Einführung eines weiteren Substituenten oder dem lipophilen Benzamid-Strukturelement, das durch sterisch anspruchsvolle Substituenten und deren Geometrie in der Bindungstasche, untersucht wurde, konnten keine EC<sub>50(FXR)</sub>- oder IC<sub>50(sEH)</sub>-Werte in einem nanomolaren Bereich erreicht werden. Vielmehr wurde sichtbar, dass die Substituenten oder Positionen, die für FXR bevorzugt waren, bei sEH einen gegenteiligen Effekt erzielten und umgekehrt. Auch eine Substitution der Carboxylgruppe durch Bioisostere oder polare Funktionen führte zu keiner signifikanten Potenzveränderung. Daraufhin wurden pEC<sub>50</sub> und pIC<sub>50</sub> der vielversprechendsten

Substanzen gegeneinander aufgetragen, um dadurch geeignete Kandidaten für eine Verschmelzung von unterschiedlichen strukturellen Variationen zu identifizieren. Dabei wurde ein ausgewogener und hochpotenter dualer Modulator (**83**) mit einem  $EC_{50(FXR)}$ -Wert von  $20,4 \pm 4,2$  nM und einem  $IC_{50(sEH)}$ -Wert von  $4,1 \pm 0,4$  nM erhalten, der umfassend *in vitro* und *in vivo* charakterisiert wurde (vgl. Abbildung 56). Bei Selektivitätsüberprüfungen gegenüber verwandten nukleären Rezeptoren konnte nur bei PPAR $\gamma$  eine leichte Aktivität detektiert werden. In unterschiedlichen qRT-PCR-Experimenten aus HepG2-Zellen und Lebern aus einem Wildtypmaus-



**Abbildung 56:** Der potenteste und ausgewogenste duale FXR/sEH-Modulator **83** inhibiert sEH und aktiviert FXR in Wildtypmäusen. Die sEH-Inhibition wurde durch das Verhältnis von EET zu DHET im Plasma bewiesen. Die FXR-Aktivierung wurde durch qRT-PCR aus den Mauslebern beobachtet.

modell bei PPAR $\gamma$ -Zielgenen wurde jedoch keine Modulation festgestellt. Währenddessen wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine FXR-Modulation durch die verstärkte Expression einer Reihe von direkten Zielgenen von FXR wie beispielsweise BSEP, SHP, FGF15 bzw. FGF19 oder OST $\alpha$  bewiesen. Auch die sEH-Inhibition konnte über das Verhältnis von EETs und DHETs in Mausplasma nachgewiesen werden. **83** wird schnell resorbiert und verfügt über eine moderate metabolische Halbwertszeit. In HepG2-Zellen konnten bei einer Konzentration von  $100 \mu M$  keine toxischen Effekte beobachtet werden. Aufgrund dieser positiven pharmakologischen Eigenschaften wird Verbindung **83** derzeit in weiteren präklinischen Studien auf seine mögliche therapeutische Anwendung für NAFLD und NASH untersucht.

Die gezielte duale Aktivität, die mit Substanz **83** erreicht wurde, kann in einem Krankheitsbild zu synergistischer Ergänzung zweier Therapieoptionen führen. Jedoch kann eine unerwünschte Promiskuität über anderen nukleären Faktoren zu Nebenwirkungen führen. Die Ursache dafür kann eine saure Funktion darstellen. Ein sehr potenter nicht-azider FXR-Agonist (**98**) mit einem subnanomolaren  $EC_{50}$ -Wert von  $0,3 \pm 0,01$  nM konnte im Arbeitskreis entwickelt werden. Die Verbindung **98** ist FXR-selektiv, hat keinen toxischen Effekt auf HepG2-Zellen bei einer Konzentration von  $100 \mu M$  und eine moderate metabolische Halbwertszeit. Die qRT-PCR-Untersuchung direkter und indirekter FXR-Zielgene zeigte eine verstärkte Expression nach der Inkubation mit der Substanz **98** bei einer Konzentration von  $10$  nM. Dadurch lässt sich das Prinzip der Nebenwirkungsminderung durch nicht-azide Verbindungen beweisen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, wie vielfältig und vielversprechend eine FXR-Modulation aufgebaut sein kann. Zum einen konnte über eine ausgeprägte biochemische Evaluation eine Differenzierung zwischen FXR-Antagonismus und Zelltoxizität bewiesen werden, worauf sich aufbauend eine genaue *in vitro*-Charakterisierung von neuen *N*-phenylbenzamidbasierten FXR-

Antagonisten durchführen ließ, die ausgehend von einer moderat potenten Leitstruktur (**16**) zu einer sehr potenten optimierten Substanz **39** entwickelt wurden. FXR-Antagonismus und die dazu passenden *tool compounds*, wie Verbindung **39**, sind nicht nur von Bedeutung zum besseren Verständnis der unterschiedlichen Bindungsmodi des FXR, sondern auch potentielle Therapieansätze zur Behandlung von Krankheiten, in denen eine FXR-Überexpression stattfindet. Die agonistische Modulation von FXR wurde genauer betrachtet in der *in vitro*-Untersuchung nicht-azider FXR-Agonisten, die durch das Fehlen einer sauren Funktion ein hohes Maß an Selektivität und dabei eine geringe Toxizität aufwiesen. Synergistische Effekte zur Behandlung eines multifaktoriellen Krankheitsbildes durch die Kombination von FXR-Partialagonismus und sEH-Inhibition konnte durch die Entwicklung der potenten und balancierten Substanz **83** sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, wodurch Substanz **83** ein vielversprechender Kandidat für weitere klinische Entwicklung ist.

#### 4. Summary

The nuclear farnesoid X receptor (FXR) is a ligand-activated transcription factor, which acts as cellular sensor for bile acids and is primarily expressed in liver, kidney and intestine. It takes part in the self-regulation of bile acids with the result that bile acid synthesis is blocked and their metabolism is enhanced when high levels of toxic bile acids occur. Furthermore, FXR is involved in many other metabolic systems such as glucose and lipid homeostasis and seems to have anti-inflammatory effects as well.<sup>9,74,75</sup> Taken together, FXR seems to be an interesting therapeutic target especially in metabolic or hepatic diseases.<sup>51</sup> The semi-synthetic FXR agonist Obeticholic acid (OCA, **5**) has validated this nuclear receptor as molecular target to treat hepatic inflammatory diseases like primary biliary cholangitis (PBC), non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in clinical trials.<sup>8,9,58</sup> Besides OCA (**5**) a number of potent FXR agonists were developed, but suffer from poor selectivity, toxicity and pharmacokinetics.<sup>1</sup> To develop new therapeutic concepts for the treatment of liver disorders and metabolic syndrome, a save and selective validation of physiological und structural effects of FXR modulation is needed. This thesis addresses the discovery of novel FXR ligands, their optimization through elaborate structure-activity-relationship (SAR) examinations, and their pharmacological characterization *in vitro* and *in vivo*.

Modulation of FXR does not only refer to agonism but also to antagonism. Besides for the treatment of a couple of disorders, which stem from an overexpression of FXR, FXR antagonists are required as tool compounds to study the structural basis and pharmacological effects of FXR antagonism.<sup>53</sup> A report by Lu *et al.*<sup>98</sup> described non-steroidal anti-rheumatic drugs (NSAIDs) as FXR antagonists and correlated the liver damage caused by chronic intake of these drugs with antagonistic activity on FXR. This result would suggest the possibility to design safer NSAIDs, which spare FXR and on the other hand render the small and drug-like NSAIDs as potential lead structures for the development of FXR antagonists. To confirm and further characterize this reported antagonistic activity, the NSAIDs diclofenac, ibuprofen and indomethacin were selected due to their high structural variety to reproduce the results of Lu *et al.*<sup>98</sup> The three NSAIDs were trialed in several test systems including a full-length reporter gene assay, a hybrid reporter gene assay, quantitative real-time PCR and thermal shift experiments where all results contradicted the reported antagonistic effects of the NSAIDs on FXR. No evidence was found for FXR modulation by NSAIDs alone or in competition with the well-known FXR agonists GW4064 (**7a**), OCA (**5**) or CDCA (**3a**). In contrast, it was discovered that the activity reported by Lu *et al.*<sup>98</sup> is a result of misinterpreted toxicity.<sup>99</sup>

Although there are well-known FXR antagonists like Guggulsteron (**4**) or glycine- $\beta$ -Muricholic acid (Gly-MCA, **10**), their suitability as tool compounds is questionable due to their steroidal scaffold and to limited potency and selectivity. Thus, potent and selective non-steroidal FXR antagonists are required to further study effects of FXR antagonism.<sup>77,93</sup> During SAR-studies on anthranilic acid derivatives as FXR partial agonists<sup>87,89</sup> the antagonistic lead compound **16** based on *N*-phenylbenzamides was discovered. First investigations towards its optimization focused on the position and size of the acidic group while the benzamide moiety was unaltered. Since spatial extension is promising to enhance antagonistic potency larger substituents on the benzamide were introduced. The fully optimized compound **39** with a 4-(*tert*-butyl)-2-methoxybenzamide element comprised an IC<sub>50</sub> value of 9.2 $\pm$ 0.6 nM. Further biochemical evaluations showed high solubility, no toxicity at 100  $\mu$ M in HepG2-cells and a favorable metabolic stability of this compound.

FXR has been validated as target for treatment of NASH and other metabolic diseases but these multifactorial disorders may require stronger therapeutic efficacy than can be achieved by modulation

of a single molecular target.<sup>8</sup> sEH inhibition was found to possess favorable antiinflammatory activity in liver that might beneficially support FXR activation in NASH treatment.<sup>101,113</sup> Therefore, a lead structure was created, which combined the pharmacophores of a partial FXR agonist<sup>87,89</sup> and a sEH inhibitor.<sup>102</sup> In four successive steps, its SAR on both targets was systematically examined but no compound with low nanomolar dual potency was identified. However, in a final optimization step, structural elements of the most active compounds were successfully combined to yield a highly potent dual modulator (**83**) with an  $EC_{50(FXR)}$  value of  $20.4 \pm 4.2$  nM and an  $IC_{50(sEH)}$  value of  $4.1 \pm 0.4$  nM. Its broad *in vitro* characterization further confirmed modulation of both molecular targets and showed low toxicity, favorable solubility and sufficient metabolic stability. Pilot *in vivo* evaluation in wildtype (C57BL6J) mice displayed a rapid uptake and high oral bioavailability with a dose of 10mg/kg of compound **83** and proved *in vivo* modulation of both targets with induction of FXR target genes and shifted EETs/DHET ratios. With this profile, the innovative dual modulator is qualified for preclinical development to study its therapeutic efficacy.<sup>103</sup>

While specific multi-target activity can have high therapeutic value, selectivity still is an important factor to avoid side effects. However, fatty acid mimetics such as many FXR ligands are prone to be promiscuous. To this end, a novel highly potent non-acidic FXR agonist (**98**) was developed in previous studies. During this thesis, its potency and selectivity against other nuclear receptors as well as its pharmacological profile were extensively characterized. The results highlight that by avoiding a potentially promiscuous acidic head function strong selectivity combined with high potency can be achieved.<sup>104</sup>

Alltogether this thesis showed, that FXR modulation, both agonistic or antagonistic, holds a great therapeutic potential for a lot of metabolic diseases. On one side, supposed FXR antagonism was well evaluated to show a difference to cell toxicity and a new class of N-phenylbenzamide based FXR-Antagonist were developed and optimized to a highly potent structure (**39**). For the investigation of FXR agonism a novel potent non-acidic FXR agonist (**98**) was *in vitro* characterized and showed high selectivity against related nuclear receptors and low toxicity due to the lack of an acidic function. Through combining the pharmacophores of two targets in one compound following a structural optimization a highly potent FXR partialagonist and sEH inhibitor (**83**) could be synthesized. This dual modulator **83** proofed the principle of synergistic efficacy for the treatment of multifactorial diseases like NASH.



## 5. Publikationsliste

1. Schmidt, J., Klingler, F.-M., Proschak, E., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavec, M. & Merk, D. (2015). NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor. *Scientific Reports*, 5, 14782.

Eigener Beitrag: *in vitro*-Charakterisierung in Reportergergen- und Toxizitätsassays und qRT-PCR, sowie Western Blotting.

2. Flesch, D., Cheung, S.-Y., Schmidt, J.\*, Gabler, M., Heitel, P., Kramer, J., Kaiser, A., Hartmann, M., Lindner, M., Lüddens-Dämgen, K., Heering, J., Lamers, C., Lüddens, H., Wurglics, M., Proschak, E., Schubert-Zsilavec, M. & Merk, D. (2017). Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (16), 7199–7205.

Eigener Beitrag: *in vitro*-Charakterisierung in Reportergergen- und Toxizitätsassays und qRT-PCR.

\*Hier liegt eine geteilte Erstautorenschaft zwischen DF, S-YC und JS vor.

3. Schmidt, J., Rotter, M., Weiser, T., Wittmann, W., Weizel, L., Kaiser, A., Heering, J., Goebel, T., Angioni, C., Wurglics, M., Paulke, A., Geisslinger, G., Kahnt, A., Steinhilber, D., Proschak, E. & Merk, D. (2017). A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (18), 7703-7724.

Eigener Beitrag: Synthese über der Hälfte der beschriebenen Verbindungen, sowie *in vitro*-Charakterisierung in Reportergergen- und Toxizitätsassays und qRT-PCR, *in vivo*-Charakterisierung aus einem Mausmodell mittels qRT-PCR.

4. Daniel Merk, Jurema Schmidt, Manfred Schubert-Zsilavec, Ewgenij Proschak: PCT/EP2017/062692 *Dual modulators of farnesoid X receptor and soluble epoxide hydrolase*. **Filed 24.05.2017**.

5. Schmidt, J., Schierle, S., Gellrich, L., Kaiser, A., Schubert-Zsilavec, M., & Merk, D. (2018). Potent *N*-Phenylbenzamide-based Farnesoid X Receptor Antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry (in press)*

Eigener Beitrag: Synthese aller beschriebenen Verbindungen, sowie *in vitro*-Charakterisierung in Reportergergen- und Toxizitätsassays und qRT-PCR.

## 6. Zusätzliche Publikationen

1. Schierle, S.; Flauaus, C.; Heitel, P.; Willems, S.; Schmidt, J.; Kaiser, A.; Weizel, L.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Geisslinger, G.; Steinhilber, D.; Rovati, E.; Schmidtko, A.; Proschak, E.; Merk, D. Boosting anti-inflammatory drug potency by designed multi-target activity. *J. Med. Chem.*, 2018, 61 (13), 5758-5764.
2. Gabler, M.; Kramer, S.; Schmidt, J.; Pollinger, J.; Weber, J.; Kaiser, A.; Löhr, F.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavec, M.; Merk, D. Allosteric modulation of the farnesoid X receptor by a small molecule. *Sci. Rep.*, 2018, 8, 6846.

## 7. Literaturverzeichnis

- (1) Lamers, C.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Therapeutic Modulators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR): A Patent Review (2008–present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22* (7), 803–841.
- (2) 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* (5418), 1362–1365.
- (3) Carr, R. M.; Reid, A. E. FXR Agonists as Therapeutic Agents for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Current Atherosclerosis Reports*. 2015.
- (4) Sanyal, A. J. NASH: A Global Health Problem. *Hepatol. Res.* **2011**, *41* (7), 670–674.
- (5) M.E., R.; Rinella, M. E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease a Systematic Review. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **2015**, *313* (22), 2263–2273.
- (6) G.C., F. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Steatosis to Cirrhosis. *Hepatology*. 2006, pp S99–S112.
- (7) Sumida, Y.; Yoneda, M. Current and Future Pharmacological Therapies for NAFLD/NASH. *Journal of Gastroenterology*. 2018, pp 362–376.
- (8) Neuschwander-Tetri, B. A.; Loomba, R.; Sanyal, A. J.; Lavine, J. E.; Van Natta, M. L.; Abdelmalek, M. F.; Chalasani, N.; Dasarathy, S.; Diehl, A. M.; Hameed, B.; et al. Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* **2014**, *385* (9972), 956–965.
- (9) Adorini L, Pruzanski M, S. D. Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Drug Discov. Today* **2012**, *17–18*, 988–997.
- (10) Pellicciari, R.; Costantino, G.; Fiorucci, S. Farnesoid X Receptor: From Structure to Potential Clinical Applications. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005, pp 5383–5403.
- (11) P., L.; B., C.; F., L.; F., K.; B., S. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. Rev.* **2009**, *89* (1), 147–191.
- (12) 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* (2), 139–159.
- (13) Helsen, C.; Claessens, F. Looking at Nuclear Receptors from a New Angle. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2014**, *382* (1), 97–106.
- (14) Gronemeyer, H.; Moras, D. How to Finger DNA. *Nature*. 1995, pp 190–191.
- (15) Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. The RXR Heterodimers and Orphan Receptors. *Cell*. 1995, pp 841–850.
- (16) Laffitte, B. a; Kast, H. R.; Nguyen, C. M.; Zavacki, a M.; Moore, D. D.; Edwards, P. a. Identification of the DNA Binding Specificity and Potential Target Genes for the Farnesoid X-Activated Receptor. *J Biol Chem* **2000**, *275* (14), 10638–10647.

- (17) Rastinejad, F.; Wagner, T.; Zhao, Q.; Khorasanizadeh, S. Structure of the RXR-RAR DNA-Binding Complex on the Retinoic Acid Response Element DR1. *EMBO J.* **2000**, *19* (5), 1045–1054.
- (18) Gronemeyer, H.; Gustafsson, J. Å.; Laudet, V. Principles for Modulation of the Nuclear Receptor Superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2004, pp 950–964.
- (19) Perlmann, T.; Rangarajan, P. N.; Umesono, K.; Evans, R. M. Determinants for Selective RAR and TR Recognition of Direct Repeat HREs. *Genes Dev.* **1993**, *7* (7 B), 1411–1422.
- (20) Acevedo, M. L.; Kraus, W. L. Transcriptional Activation by Nuclear Receptors. *Essays Biochem* **2004**, *40*, 73–88.
- (21) Costantino, G.; Entrena-Guadix, A.; Macchiarulo, A.; Gioiello, A.; Pellicciari, R. Molecular Dynamics Simulation of the Ligand Binding Domain of Farnesoid X Receptor. Insights into Helix-12 Stability and Coactivator Peptide Stabilization in Response to Agonist Binding. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (9), 3251–3259.
- (22) Downes, M.; Verdecia, M. A.; Roecker, A. J.; Hughes, R.; Hogenesch, J. B.; Kast-Woelbern, H. R.; Bowman, M. E.; Ferrer, J.-L.; Anisfeld, A. M.; Edwards, P. A.; et al. A Chemical, Genetic, and Structural Analysis of the Nuclear Bile Acid Receptor FXR. *Mol. Cell* **2003**, *11* (4), 1079–1092.
- (23) Gaieb, Z.; Liu, S.; Gathiaka, S.; Chiu, M.; Yang, H.; Shao, C.; Feher, V. A.; Walters, W. P.; Kuhn, B.; Rudolph, M. G.; et al. D3R Grand Challenge 2: Blind Prediction of Protein–ligand Poses, Affinity Rankings, and Relative Binding Free Energies. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2018**, *32* (1).
- (24) 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* (1–2), 35–43.
- (25) Camilleri, M.; Gores, G. J. Therapeutic Targeting of Bile Acids. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **2015**, *309* (4), G209–G215.
- (26) J.G. Marin, J.; I.R. Macias, R.; Briz, O.; M. Banales, J.; J. Monte, M. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr. Drug Metab.* **2015**, *17* (1), 4–29.
- (27) Thomas, C.; Pellicciari, R.; Pruzanski, M.; Auwerx, J.; Schoonjans, K. Targeting Bile-Acid Signalling for Metabolic Diseases. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2008, pp 678–693.
- (28) Goodwin, B.; Jones, S. A.; Price, R. R.; Watson, M. A.; McKee, D. D.; Moore, L. B.; Galardi, C.; Wilson, J. G.; Lewis, M. C.; Roth, M. E.; et al. A Regulatory Cascade of the Nuclear Receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 Represses Bile Acid Biosynthesis. *Mol. Cell* **2000**, *6* (3), 517–526.
- (29) Chiang, J. Y. Regulation of Bile Acid Synthesis. *Front. Biosci.* **1998**, *3* (1), d176-93.
- (30) Repa, J. J.; Turley, S. D.; Lobaccaro, J. M. A.; Medina, J.; Li, L.; Lustig, K.; Shan, B.; Heyman, R. A.; Dietschy, J. M.; Mangelsdorf, D. J. Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers. *Science.* 2000, pp 1524–1529.
- (31) Holt, J. A.; Luo, G.; Billin, A. N.; Bisi, J.; McNeill, Y. Y.; Kozarsky, K. F.; Donahee, M.; Wang, D. Y.; Mansfield, T. A.; Kliewer, S. A.; et al. Definition of a Novel Growth Factor-Dependent Signal Cascade for the Suppression of Bile Acid Biosynthesis. *Genes Dev.* **2003**, *17* (13), 1581–1591.
- (32) Zhang, Y.; Edwards, P. A. FXR Signaling in Metabolic Disease. *FEBS Letters.* 2008, pp 10–18.

- (33) Kalaany, N. Y.; Mangelsdorf, D. J. LXRS AND FXR: The Yin and Yang of Cholesterol and Fat Metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* **2006**, *68* (1), 159–191.
- (34) Ananthanarayanan, M.; Balasubramanian, N.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D. J.; Suchy, F. J. Human Bile Salt Export Pump Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/Bile Acid Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (31), 28857–28865.
- (35) Lee, F. Y.; Lee, H.; Hubbert, M. L.; Edwards, P. A.; Zhang, Y. FXR, a Multipurpose Nuclear Receptor. *Trends in Biochemical Sciences.* 2006, pp 572–580.
- (36) Gadaleta, R. M.; Cariello, M.; Sabbà, C.; Moschetta, A. Tissue-Specific Actions of FXR in Metabolism and Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 2015, pp 30–39.
- (37) Ballatori, N.; Fang, F.; Christian, W. V.; Li, N.; Hammond, C. L. Ostalpha-Ostbeta Is Required for Bile Acid and Conjugated Steroid Disposition in the Intestine, Kidney, and Liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2008**, *295* (1), G179–G186.
- (38) Lambert, G.; Amar, M. J. A.; Guo, G.; Brewer, H. B.; Gonzalez, F. J.; Sinal, C. J. The Farnesoid X-Receptor Is an Essential Regulator of Cholesterol Homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (4), 2563–2570.
- (39) Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. SREBPs: Activators of the Complete Program of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis in the Liver. *Journal of Clinical Investigation.* 2002, pp 1125–1131.
- (40) Watanabe, M.; Houten, S. M.; Wang, L.; Moschetta, A.; Mangelsdorf, D. J.; Heyman, R. A.; Moore, D. D.; Auwerx, J. Bile Acids Lower Triglyceride Levels via a Pathway Involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* **2004**, *113* (10), 1408–1418.
- (41) Sinal, C. J.; Tohkin, M.; Miyata, M.; Ward, J. M.; Lambert, G.; Gonzalez, F. J. Targeted Disruption of the Nuclear Receptor FXR/BAR Impairs Bile Acid and Lipid Homeostasis. *Cell* **2000**, *102* (6), 731–744.
- (42) Schoonjans, K.; Staels, B.; Auwerx, J. Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) in Mediating the Effects of Fibrates and Fatty Acids on Gene Expression. *J. Lipid Res.* **1996**, *37* (5), 907–925.
- (43) Pineda Torra, I.; Claudel, T.; Duval, C.; Kosykh, V.; Fruchart, J.-C.; Staels, B. Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol. Endocrinol.* **2003**, *17* (2), 259–272.
- (44) Savkur, R. S.; Bramlett, K. S.; Michael, L. F.; Burris, T. P. Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression by the Farnesoid X Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329* (1), 391–396.
- (45) Xie, Y.; Wang, H.; Cheng, X.; Wu, Y.; Cao, L.; Wu, M.; Xie, W.; Wang, G.; Hao, H. Farnesoid X Receptor Activation Promotes Cell Proliferation via PDK4-Controlled Metabolic Reprogramming. *Sci. Rep.* **2016**, *6*.
- (46) Zhang, Y.; Lee, F. Y.; Barrera, G.; Lee, H.; Vales, C.; Gonzalez, F. J.; Willson, T. M.; Edwards, P. A. Activation of the Nuclear Receptor FXR Improves Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Diabetic Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (4), 1006–1011.

- (47) Cariou, B.; van Harmelen, K.; Duran-Sandoval, D.; van Dijk, T. H.; Grefhorst, A.; Abdelkarim, M.; Caron, S.; Torpier, G.; Fruchart, J.-C.; Gonzalez, F. J.; et al. The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (16), 11039–11049.
- (48) Shaik, F. B.; Prasad, D. V. R.; Narala, V. R. Role of Farnesoid X Receptor in Inflammation and Resolution. *Inflammation Research*. 2014, pp 9–20.
- (49) Xu, Z.; Huang, G.; Gong, W.; Zhou, P.; Zhao, Y.; Zhang, Y.; Zeng, Y.; Gao, M.; Pan, Z.; He, F. FXR Ligands Protect against Hepatocellular Inflammation via SOCS3 Induction. *Cell. Signal.* **2012**, *24* (8), 1658–1664.
- (50) Wang, Y.-D.; Chen, W.-D.; Wang, M.; Yu, D.; Forman, B. M.; Huang, W. Farnesoid X Receptor Antagonizes Nuclear Factor KappaB in Hepatic Inflammatory Response. *Hepatology* **2008**, *48* (5), 1632–1643.
- (51) Zhu, Y.; Li, F.; Guo, G. L. Tissue-Specific Function of Farnesoid X Receptor in Liver and Intestine. *Pharmacol. Res.* **2011**, *63* (4), 259–265.
- (52) Stedman, C.; Liddle, C.; Coulter, S.; Sonoda, J.; Alvarez, J. G.; Evans, R. M.; Downes, M. Benefit of Farnesoid X Receptor Inhibition in Obstructive Cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (30), 11323–11328.
- (53) Lamers, C.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Medicinal Chemistry and Pharmacological Effects of Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14* (19), 2188–2205.
- (54) Moschetta, A.; Bookout, A. L.; Mangelsdorf, D. J. Prevention of Cholesterol Gallstone Disease by FXR Agonists in a Mouse Model. *Nat. Med.* **2004**, *10* (12), 1352–1358.
- (55) Honda, M.; Kawai, H.; Shirota, Y.; Yamashita, T.; Kaneko, S. Differential Gene Expression Profiles in Stage I Primary Biliary Cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100* (9), 2019–2030.
- (56) Corpechot, C. Primary Biliary Cirrhosis and Bile Acids. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2012**, *36* (SUPPL.1).
- (57) Floreani, A.; Sun, Y.; Zou, Z. S.; Li, B.; Cazzagon, N.; Bowlus, C. L.; Gershwin, M. E. Proposed Therapies in Primary Biliary Cholangitis. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 2016, pp 371–382.
- (58) Hirschfield, G. M.; Mason, A.; Luketic, V.; Lindor, K.; Gordon, S. C.; Mayo, M.; Kowdley, K. V.; Vincent, C.; Bodhenheimer, H. C.; Parés, A.; et al. Efficacy of Obeticholic Acid in Patients with Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* **2015**, *148* (4), 751–761.e8.
- (59) Jones, D.; Kowdley, K.; Chapman, R.; Burroughs, A.; Hirschfield, G.; Schramm, C.; Poupon, R.; Parés, A.; Shapiro, D.; Pruzanski, M.; et al. The First New Monotherapy Therapeutic PBC Study in a Decade? An International Study Evaluating the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in PBC. *Gut* **2011**, *60* (Suppl 2), A50–A50.
- (60) Smith, S. M.; Pegram, A. H. Obeticholic Acid. *J. Pharm. Technol.* **2017**, *33* (2), 66–71.
- (61) Perez, M. J.; Britz, O. Bile-Acid-Induced Cell Injury and Protection. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15* (14), 1677–1689.

- (62) He, N.; Park, K.; Zhang, Y.; Huang, J.; Lu, S.; Wang, L. Epigenetic Inhibition of Nuclear Receptor Small Heterodimer Partner Is Associated With and Regulates Hepatocellular Carcinoma Growth. *Gastroenterology* **2008**, *134* (3), 793–802.
- (63) Peterlik, M. Role of Bile Acid Secretion in Human Colorectal Cancer. *Wien. Med. Wochenschr.* **2008**, *158* (19–20), 539–541.
- (64) Modica, S.; Murzilli, S.; Salvatore, L.; Schmidt, D. R.; Moschetta, A. Nuclear Bile Acid Receptor FXR Protects against Intestinal Tumorigenesis. *Cancer Res.* **2008**, *68* (23), 9589–9594.
- (65) Capello, A.; Moons, L. M. G.; Van de Winkel, A.; Siersema, P. D.; van Dekken, H.; Kuipers, E. J.; Kusters, J. G. Bile Acid-Stimulated Expression of the Farnesoid X Receptor Enhances the Immune Response in Barrett Esophagus. *Am. J. Gastroenterol.* **2008**, *103* (6), 1510–1516.
- (66) Milić, S.; Lulić, D.; Štimac, D. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Obesity: Biochemical, Metabolic and Clinical Presentations. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (28), 9330–9337.
- (67) Marra, F.; Gastaldelli, A.; Svegliati Baroni, G.; Tell, G.; Tiribelli, C. Molecular Basis and Mechanisms of Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine.* 2008, pp 72–81.
- (68) Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J. E.; Diehl, A. M.; al, et. ... Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological .... .... 2012.
- (69) Dowman, J. K.; Armstrong, M. J.; Tomlinson, J. W.; Newsome, P. N. Current Therapeutic Strategies in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2011, pp 692–702.
- (70) Belfort, R.; Harrison, S. A.; Brown, K.; Darland, C.; Finch, J.; Hardies, J.; Balas, B.; Gastaldelli, A.; Tio, F.; Pulcini, J.; et al. A Placebo-Controlled Trial of Pioglitazone in Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355* (22), 2297–2307.
- (71) Li, Y.; Lambert, M. H.; Xu, H. E. Activation of Nuclear Receptors: A Perspective from Structural Genomics. *Structure.* 2003, pp 741–746.
- (72) Germain, P.; Staels, B.; Dacquet, C.; Spedding, M.; Laudet, V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (4), 685–704.
- (73) Xu, H. E.; Stanley, T. B.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Shearer, B. G.; Cobb, J. E.; McKee, D. D.; Galardi, C. M.; Plunket, K. D.; Nolte, R. T.; et al. Structural Basis for Antagonist-Mediated Recruitment of Nuclear Co-Repressors by PPAR $\alpha$ . *Nature* **2002**, *415* (6873), 813–817.
- (74) Forman, B. M.; Goode, E.; Chen, J.; Oro, A. E.; Bradley, D. J.; Perlmann, T.; Noonan, D. J.; Burka, L. T.; McMorris, T.; Lamph, W. W.; et al. Identification of a Nuclear Receptor That Is Activated by Farnesol Metabolites. *Cell* **1995**, *81* (5), 687–693.
- (75) 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 (80-. ).* **1999**, *284* (5418), 1365–1368.
- (76) 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* (5), 543–553.

- (77) Diao, Y.; Jiang, J.; Zhang, S.; Li, S.; Shan, L.; Huang, J. Discovery of Natural Products as Novel and Potent FXR Antagonists by Virtual Screening. *2018*, *6* (April), 1–13.
- (78) Mudaliar, S.; Henry, R.; Sanyal, A.; Morrow, L.; Marschall, H.-U.; Kipnes, M.; Adorini, L.; Sciacca, C.; Clopton, P.; Castelloe, E.; et al. Efficacy and Safety of the Farnesoid x Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients with Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2013**, *145* (3), 574–5820.
- (79) Lindor, K. D. Farnesoid X Receptor Agonists for Primary Biliary Cirrhosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2011**, *27* (3), 285–288.
- (80) Soisson, S. M.; Parthasarathy, G.; Adams, A. D.; Sahoo, S.; Sitlani, A.; Sparrow, C.; Cui, J.; Becker, J. W. Identification of a Potent Synthetic FXR Agonist with an Unexpected Mode of Binding and Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (14), 5337–5342.
- (81) Singh, N.; Yadav, M.; Singh, A. K.; Kumar, H.; Dwivedi, S. K. D.; Mishra, J. S.; Gurjar, A.; Manhas, A.; Chandra, S.; Yadav, P. N.; et al. Synthetic FXR Agonist GW4064 Is a Modulator of Multiple G Protein–Coupled Receptors. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28* (5), 659–673.
- (82) Bass, J. Y.; Caravella, J. A.; Chen, L.; Creech, K. L.; Deaton, D. N.; Madauss, K. P.; Marr, H. B.; McFadyen, R. B.; Miller, A. B.; Mills, W. Y.; et al. Conformationally Constrained Farnesoid X Receptor (FXR) Agonists: Heteroaryl Replacements of the Naphthalene. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (4), 1206–1213.
- (83) Tully, D. C.; Rucker, P. V.; Chianelli, D.; Williams, J.; Vidal, A.; Alper, P. B.; Mutnick, D.; Bursulaya, B.; Schmeits, J.; Wu, X.; et al. Discovery of Tropifexor (LJN452), a Highly Potent Non-Bile Acid FXR Agonist for the Treatment of Cholestatic Liver Diseases and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (24), 9960–9973.
- (84) Genin, M. J.; Bueno, A. B.; Agejas Francisco, J.; Manninen, P. R.; Bocchinfuso, W. P.; Montrose-Rafizadeh, C.; Cannady, E. A.; Jones, T. M.; Stille, J. R.; Raddad, E.; et al. Discovery of 6-(4-{{[5-Cyclopropyl-3-(2,6-Dichlorophenyl)isoxazol-4-Yl]Methoxy}piperidin-1-Yl)-1-Methyl-1H-Indole-3-Carboxylic Acid: A Novel FXR Agonist for the Treatment of Dyslipidemia. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (24), 9768–9772.
- (85) Fang, S.; Suh, J. M.; Reilly, S. M.; Yu, E.; Osborn, O.; Lackey, D.; Yoshihara, E.; Perino, A.; Jacinto, S.; Lukasheva, Y.; et al. Intestinal FXR Agonism Promotes Adipose Tissue Browning and Reduces Obesity and Insulin Resistance. *Nat. Med.* **2015**, *21* (2), 159–165.
- (86) 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* (8), 1015–1036.
- (87) Merk, D.; Lamers, C.; Ahmad, K.; Carrasco Gomez, R.; Schneider, G.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M. Extending the Structure-Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives as Farnesoid x Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid x Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (19).
- (88) Flatt, B.; Martin, R.; Wang, T. L.; Mahaney, P.; Murphy, B.; Gu, X. H.; 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* (4), 904–907.
- (89) Merk, D.; Gabler, M.; Gomez, R. C.; Flesch, D.; Hanke, T.; Kaiser, A.; Lamers, C.; Werz, O.; Schneider, G.; Schubert-Zsilavec, M. Anthranilic Acid Derivatives as Novel Ligands for

- Farnesoid X Receptor (FXR). *Bioorg Med Chem* **2014**, *22* (8), 2447–2460.
- (90) Yu, D. D.; Lin, W.; Forman, B. M.; Chen, T. Identification of Trisubstituted-Pyrazol Carboxamide Analogs as Novel and Potent Antagonists of Farnesoid X Receptor. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, *22* (11), 2919–2938.
- (91) Li, F.; Jiang, C.; Krausz, K. W.; Li, Y.; Albert, I.; Hao, H.; Fabre, K. M.; Mitchell, J. B.; Patterson, A. D.; Gonzalez, F. J. Microbiome Remodelling Leads to Inhibition of Intestinal Farnesoid X Receptor Signalling and Decreased Obesity. *Nat. Commun.* **2013**, *4*.
- (92) Jiang, C.; Xie, C.; Lv, Y.; Li, J.; Krausz, K. W.; Shi, J.; Brocker, C. N.; Desai, D.; Amin, S. G.; Bisson, W. H.; et al. Intestine-Selective Farnesoid X Receptor Inhibition Improves Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Nat. Commun.* **2015**, *6*.
- (93) Huang, H.; Si, P.; Wang, L.; Xu, Y.; Xu, X.; Zhu, J.; Jiang, H.; Li, W.; Chen, L.; Li, J. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Nonsteroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists: Molecular Basis of FXR Antagonism. *ChemMedChem* **2015**, *10* (7), 1184–1199.
- (94) Huang, H.; Yu, Y.; Gao, Z.; Zhang, Y.; Li, C.; Xu, X.; Jin, H.; Yan, W.; Ma, R.; Zhu, J.; et al. Discovery and Optimization of 1,3,4-Trisubstituted-Pyrazolone Derivatives as Novel, Potent, and Nonsteroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Selective Antagonists. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (16), 7037–7053.
- (95) Teno, N.; Yamashita, Y.; Iguchi, Y.; Fujimori, K.; Une, M.; Nishimaki-Mogami, T.; Hiramoto, T.; Gohda, K. Nonacidic Chemotype Possessing N-Acylated Piperidine Moiety as Potent Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2018**, *9* (2), 78–83.
- (96) Xu, X.; Xu, X.; Liu, P.; Zhu, Z. Y.; Chen, J.; Fu, H. A.; Chen, L. L.; Hu, L. H.; Shen, X. Structural Basis for Small Molecule NDB (N-Benzyl-N-(3-(Tertbutyl)-4-Hydroxyphenyl)-2,6-Dichloro-4-(Dimethylamino) Benzamide) as a Selective Antagonist of Farnesoid X Receptor  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ) in Stabilizing the Homodimerization of the Receptor. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (32), 19888–19899.
- (97) Akwabi-Ameyaw, A.; Bass, J. Y.; Caldwell, R. D.; Caravella, J. A.; Chen, L.; Creech, K. L.; Deaton, D. N.; Jones, S. A.; Kaldor, I.; Liu, Y.; et al. Conformationally Constrained Farnesoid X Receptor (FXR) Agonists: Naphthoic Acid-Based Analogs of GW 4064. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (15), 4339–4343.
- (98) Lu, W.; Cheng, F.; Jiang, J.; Zhang, C.; Deng, X.; Xu, Z.; Zou, S.; Shen, X.; Tang, Y.; Huang, J. FXR Antagonism of NSAIDs Contributes to Drug-Induced Liver Injury Identified by Systems Pharmacology Approach. *Sci. Rep.* **2015**, *5*.
- (99) Schmidt, J.; Klingler, F. M.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavec, M.; Merk, D. NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac Do Not Interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **2015**, *5*.
- (100) Schmidt, J.; Schierle, S.; Gellrich, L.; Kaiser, A.; Merk, D. Structural Optimization and in Vitro Profiling of N-Phenylbenzamide-Based Farnesoid X Receptor Antagonists. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (14), 4240–4253.
- (101) Liu, Y.; Dang, H.; Li, D.; Pang, W.; Hammock, B. D.; Zhu, Y. Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis by Reduced Systemic Inflammatory Status in Mice. *PLoS One* **2012**, *7* (6).
- (102) Kompa, A. R.; Wang, B. H.; Xu, G.; Zhang, Y.; Ho, P. Y.; Eisennagel, S.; Thalji, R. K.; Marino, J. P.;



- Kelly, D. J.; Behm, D. J.; et al. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Exerts Beneficial Anti-Remodeling Actions Post-Myocardial Infarction. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *167* (1), 210–219.
- (103) Schmidt, J.; Rotter, M.; Weiser, T.; Wittmann, S.; Weizel, L.; Kaiser, A.; Heering, J.; Goebel, T.; Angioni, C.; Wurglics, M.; et al. A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (18), 7703–7724.
- (104) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; et al. Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (16), 7199–7205.
- (105) Steri, R.; Kara, M.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Schneider, G.; Schubert-Zsilavec, M. Antidiabetic Sulfonylureas Modulate Farnesoid X Receptor Activation and Target Gene Transcription. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (4), 575–586.
- (106) Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P. R.; Morelli, A.; Parks, D. J.; Willson, T. M. 6-ethyl-Chenodeoxycholic Acid (6-ECDC), a Potent and Selective FXR Agonist Endowed with Anticholestatic Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (17), 3569–3572.
- (107) 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. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2000, pp 2971–2974.
- (108) 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* (1), 191–194.
- (109) 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* (12), 1674–1681.
- (110) 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 - Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771* (7), 864–872.
- (111) Thorne, N.; Shen, M.; Lea, W. A.; Simeonov, A.; Lovell, S.; Auld, D. S.; Inglese, J. Firefly Luciferase in Chemical Biology: A Compendium of Inhibitors, Mechanistic Evaluation of Chemotypes, and Suggested Use as a Reporter. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (8), 1060–1072.
- (112) Lamers, C.; Merk, D.; Gabler, M.; Flesch, D.; Kaiser, A.; Schubert-Zsilavec, M. SAR Studies on FXR Modulators Led to the Discovery of the First Combined FXR Antagonistic/TGR5 Agonistic Compound. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (2), 133–148.
- (113) Schuck, R. N.; Zha, W.; Edin, M. L.; Gruzdev, A.; Vendrov, K. C.; Miller, T. M.; Xu, Z.; Lih, F. B.; DeGraff, L. M.; Tomer, K. B.; et al. The Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway Regulates the Hepatic Inflammatory Response in Fatty Liver Disease. *PLoS One* **2014**, *9* (10).
- (114) Jones, P. D.; Wolf, N. M.; Morisseau, C.; Whetstone, P.; Hock, B.; Hammock, B. D. Fluorescent Substrates for Soluble Epoxide Hydrolase and Application to Inhibition Studies. *Anal. Biochem.* **2005**, *343* (1), 66–75.
- (115) Klingler, F. M.; Wolf, M.; Wittmann, S.; Gribbon, P.; Proschak, E. Bacterial Expression and HTS Assessment of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase. *J. Biomol. Screen.* **2016**, *21* (7), 689–

694.

- (116) Blöcher, R.; Lamers, C.; Wittmann, S. K.; Diehl, O.; Hanke, T.; Merk, D.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Kahnt, A. S.; Proschak, E. Design and Synthesis of Fused Soluble Epoxide Hydrolase/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulators. *Medchemcomm* **2016**, 7 (6).
- (117) Sepe, V.; Festa, C.; Renga, B.; Carino, A.; Cipriani, S.; Finamore, C.; Masullo, D.; Del Gaudio, F.; Monti, M. C.; Fiorucci, S.; et al. Insights on FXR Selective Modulation. Speculation on Bile Acid Chemical Space in the Discovery of Potent and Selective Agonists. *Sci. Rep.* **2016**, 6.
- (118) Festa, C.; Renga, B.; D'Amore, C.; Sepe, V.; Finamore, C.; De Marino, S.; Carino, A.; Cipriani, S.; Monti, M. C.; Zampella, A.; et al. Exploitation of Cholane Scaffold for the Discovery of Potent and Selective Farnesoid X Receptor (FXR) and G-Protein Coupled Bile Acid Receptor 1 (GP-BAR1) Ligands. *J. Med. Chem.* **2014**, 57 (20), 8477–8495.
- (119) Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, pp 5235–5266.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

4-DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
AcOH	Essigsäure
AF-1	Aktivierungsfunktion-1 (engl.: <i>activation function-1</i> )
AF-2	Aktivierungsfunktion-2 (engl.: <i>activation function-2</i> )
AIBN	Azobis(isobutyronitril)
Akt.	Aktivierung
ALT	Alanin-Aminotransferase
ASBT	apikaler natriumabhängiger Gallensäuretransporter (engl.: <i>apical sodium-dependent bile acid transporter</i> )
BACS	Gallensäure-CoA-Synthase (engl.: <i>bile acid-CoA synthase</i> )
BAT	Gallensäure-CoA-Aminosäuren- <i>N</i> -Acetyltransferase (engl.: <i>bile acid-CoA amino acid N-acetyltransferase</i> )
BSEP	Gallensäurenexportprotein (engl.: <i>bile salt export protein</i> )
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CAR	Constitutive Androstane Rezeptor
CDCA	Chenodesoxycholsäure (engl.: <i>chenodesoxycholic acid</i> )
CD36	Scavenger-Rezeptor 3B
CH	Cholesterol
CKK	Cholecystokinin
Cos-7	immortalisierte Nierenzelllinie aus <i>Chlorocebus aethiops</i>
CRP	C-reaktive Protein
CYP7A1	Cytochrom P-450-Enzym Cholesterol 7 $\alpha$ -hydrolase
CYP8B1	Cytochrom P-450-Enzym Sterol-12 $\alpha$ -hydrolase

DBD	DNA-Bindedomäne
DCA	Desoxycholsäure (engl.: <i>desoxycholic acid</i> )
DCE	1,2-Dichlorethen
DCM	Dichlormethan
DHET	Dihydroxyeicosatriensäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EET	Epoxyeicosatriensäure
engl.	englisch
ER	Östrogenrezeptor (engl.: <i>estrogen receptor</i> )
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAM3A	zytokin-ähnliches Protein 2-19
FAS	Fettsäuresynthase
FATP	Fettsäuretransporterprotein (engl.: <i>fatty acid transport protein</i> )
FDA	Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl.: <i>Food and Drug Administration</i> )
FGF15	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-15 (engl.: <i>fibroblast growth factor-15</i> )
FGF19	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-19 (engl.: <i>fibroblast growth factor-19</i> )
FLINT	Farnesoid X Rezeptor Ligand Obeticholsäure für nicht-zirrhatische nicht-alkoholische Steatohepatitis
FXR	Farnesoid X Rezeptor
g	Gramm

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGT	Gammaglutamyl-Transpeptidase
GS	Gallensäuren
Gly-MCA	Glycin- $\beta$ -Muricholsäure (engl.: <i>glycin-<math>\beta</math>-muricholic acid</i> )
G6Pase	Glukose-6-phosphatase
HEK293T	immortalisierte humane embryonale Nierenzellen
HeLa	immortalisierte humane Epitelzellen eines Gebärmutterhalskarzinoms
HepG2	immortalisierte humane Epitelzellen eines hepatozellulären Karzinoms
HNF4	Hepatozyte nukleäre Faktor 4
H12	Helix 12
i. a.	inaktiv
I-BABP	ileales Gallensäurebindeprotein (engl.: <i>ileal bile acid-binding protein</i> )
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
ID	Identität
IgM	Immunoglobulin M
IL-16	Interleukin-16
Inhib.	Inhibition
JH III	Juvenilehormon
kg	Kilogramm
L	Liter
LBD	Ligandenbindedomäne
LC	Flüssigchromatographie (engl.: <i>liquid chromatography</i> )
LCA	Lithocholsäure (engl.: <i>lithocholic acid</i> )
LPS	Lipopolysaccharide
LRH-1	Leberrezeptor-Homolog-1

LXR	Leber X Rezeptor
M	molar
MDR3	Phospholipid-exportierende Pumpe (engl.: <i>multidrug resistant-associated p-glycoprotein</i> )
MeI	Methyljodid
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
µM	mikromolar
mmol	Millimol
mRNA	Botenribonukleinsäure (engl.: <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MRP2	multispezifischer Transporter (engl.: <i>multidrug resistance protein 2</i> )
MS	Massenspektrometrie
µw	Mikrowelle
NAFLD	nicht-alkoholische Fettlebererkrankung (engl.: <i>non-alcoholic fatty liver disease</i> )
NASH	nicht-alkoholische Steatohepatitis
NF-κB	nukleärer Faktor-κB
nM	nanomolar
NTCP	Natriumtaurocholat-Cotransporterprotein
NSAIDs	nicht-steroidale Antirheumatika (engl.: <i>non-steroidal anti-rheumatic drugs</i> )
OCA	Obeticholsäure (engl.: <i>obeticholic acid</i> )
OSTα/β	Transporter für organische gelöste Stoffe (engl.: <i>organic solute transporter</i> )

PBC	primäre biliäre Cholangitis
PCC	Pyridiniumchlorochromat (Corey-Reagenz)
PDC	Pyruvatdehydrogenasekinasekomplex
Pd/C	Palladium auf Kohle
PK4	Pyruvatdehydrogenasekinase 4
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PPAR	peroxisomen proliferator-aktivierte Rezeptoren
PXR	Pregnan X Rezeptor
qRT-PCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (engl.: <i>quantitative real time polymerase chain reaction</i> )
RAR	Retinsäurenrezeptor
RE	Response-Elemente
Reflux	Rückfluss
rel.	relativ
RLU	relative Lichteinheiten (engl.: <i>relative light units</i> )
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid X Rezeptor
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung (engl.: <i>structure-activity relationship</i> )
sEH	lösliche Epoxidhydrolase (engl.: <i>soluble epoxidhydrolase</i> )
SEM	Standardfehler (engl.: <i>standard error of the mean</i> )
SRC-1	Steroidrezeptor-Coaktivator 1
Std	Stunde
SHP	engl.: <i>small heterodimer partner</i>
SREBP-1c	Sterol-Regulatorelement-Bindeprotein-1c (engl.: <i>sterol regulatory element-binding protein 1c</i> )

TG	Triglycerid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
THF	Tetrahydrofuran
UDCA	Ursodeoxycholsäure (engl.: <i>ursodeoxycholic acid</i> )
VDR	Vitamin-D Rezeptor
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat (engl.: <i>water soluble tetrazolium</i> )



## 8. Curriculum Vitae

### Allgemein:

Name	Jurema Schmidt
Adresse	████████████████████
Staatsangehörigkeit	████████████████████
Geburtsdatum	████████████████████
Geburtsort	████████████████████

### Werdegang:

09/1995-07/1998	<b>Joseph-von-Eichendorff-Grundschule, Obertshausen</b>
09/1998-07/1999	<b>Wilhelm-Busch-Grundschule, Rodgau</b>
09/1999-07/2005	<b>Georg-Büchner-Schule, Mittelstufe, Rodgau</b>
09/2005-06/2008	<b>Claus-von-Stauffenberg-Schule, Oberstufe, Rodgau</b>
13.06.2008	<b>Abitur (allgemeine Hochschulreife)</b>
10/2008-09/2012	<b>Studium „Bachelor of Science-Chemistry“ an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt am Main</b> Bachelorarbeit: „Metallierungsreaktionen am Ferrocengerüst“ im Arbeitskreis Prof. Dr. M. Wagner
14.09.2012	<b>Bachelor of Science-Chemistry</b>
04/2012-01/2015	<b>Studium „Master of Science-Chemistry“ an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt am Main</b> Masterarbeit: „Analyse von Zuständen in der Assemblierung der Fettsäuresynthase (FAS) aus Pilzen“ im Arbeitskreis Prof. Dr. M. Grininger
05.01.2015	<b>Master of Science-Chemistry</b>
ab 02/2015	<b>wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Johann Wolfgang von Goethe-Universität, Frankfurt am Main im Arbeitskreis Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec</b>

### Tagungsbesuche:

23.-25.09.2015	<b>DPHG-Jahrestagung (Düsseldorf)</b> Beitrag: Poster: Does FXR antagonism account for liver toxicity of non-steroidal anti-rheumatic drugs (NSAIDs)?
10.-12.12.2015	<b>19th Lipid Meeting Leipzig (Leipzig)</b>

13.-16.03.2016	<b>Frontiers in Medicinal Chemistry (Bonn)</b>
	Beitrag: Poster: Development of novel intestine-specific non-steroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists
21.-23.09.2016	<b>8th Summerschool "Medicinal Chemistry" (Regensburg)</b>
	Beitrag: Poster: Development of novel non-steroidal farnesoid X receptor (FXR) antagonists
04.-07.10.2016	<b>DPhG-Jahrestagung (München)</b>
	Beitrag: Poster: Development of novel non-steroidal farnesoid X receptor (FXR) antagonists
29.-31.03.2017	<b>DPhG-Doktorandentagung (Sanofi, Frankfurt am Main)</b>
	Beitrag: Shorttalk: Development of novel non-steroidal farnesoid X receptor (FXR) antagonists
27.-31.08.2017	<b>7th edition of the EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry (EFMC-ASMC'17, Wien)</b>
	Beitrag: Poster: Development of novel non-steroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists
26.-29.09.2017	<b>DPhG-Jahrestagung (Saarbrücken)</b>
	Beitrag: Poster: Development of novel non-steroidal Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists

### **Lehrerfahrung:**

seit 02/2015	Betreuung des Praktikums „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe (unter Einbeziehung von Arzneibuchmethoden)“ für das erste Semester Pharmazie an der Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt am Main
seit 02/2015	Betreuung des Seminars „Allgemeine Chemie“ für das erste Semester Pharmazie an der Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt am Main
06.06.2018	Erwerb des „Zertifikates Hochschullehre“ des Interdisziplinären Kollegs Hochschullehre der Goethe Universität Frankfurt

**9. Eidesstattliche Erklärung**

ERKLÄRUNG

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

Frankfurt am Main, den .....

(Unterschrift)

Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über

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

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

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

Frankfurt am Main, den .....

(Unterschrift)

## 10. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz für die Möglichkeit und das damit entgegengebrachte Vertrauen diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen. Seiner Unterstützung verdanke ich nicht nur die Erforschung interessanter Projekte im Rahmen der Promotion, sondern auch eine Vielzahl an besonderer Erfahrungen, die ich auf wissenschaftlichen Tagungen und diversen Arbeitskreiseminaren in Österreich, Deutschland und der Schweiz sammeln durfte. Ich bedanke mich für zahlreiche Diskussionen und Hilfestellungen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Daniel Merk für die konstruktive und angenehme Betreuung meiner Promotion bedanken. Seine große fachliche Kompetenz, seine Ideen und seine Motivation bei sämtlichen Anliegen haben zum entscheidenden Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mario Wurglics danke ich für alle organisatorischen und lehrebezogenen Hilfestellungen. Er fand für sämtliche Probleme ein offenes Ohr und einen guten Rat.

Astrid Kaiser danke ich nicht nur für unzählige Reinheitstestungen, Löslichkeitsbestimmungen oder das Vermessen der metabolischen Stabilität, sondern besonders für ihre fröhliche und unbeschwerte Art.

Mein Dank gilt auch den unterschiedlichen Mitgliedern des Arbeitskreises, die jeder einzelne zu einer offenen, motivierenden und freundschaftlichen Atmosphäre beigetragen haben. Ich möchte mich für jedwede Hilfestellung bedanken, die ich von euch bekommen habe, aber auch für eine lustige Zeit. Danke an Sun-Yee Cheung, Daniel Flesch, Matthias Gabler, Leonie Gellrich, Pascal Heitel, Moritz Helmstädter, Julius Pollinger und Simone Schierle.

Bei Markus Hartmann, Kerstin Hiesinger und Felix Lillich möchte ich mich für eine lustige, arbeitskreisübergreifende Zeit im Labor und auf Tagungen bedanken.

Bei meiner Gardegruppe und TGW-Mannschaft möchte ich für die Ablenkung durch das gemeinsame Training und die moralische Unterstützung, aber auch für die Rücksichtnahme danken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, ohne die das alles gar nicht möglich gewesen wäre. Besonders meinen Eltern Silvia Schmidt und Ronaldo Schmidt haben stets an mich geglaubt und mir Kraft und Unterstützung gegeben, wo sie nur konnten und mir das jeden Tag aufs Neue gezeigt.

## 11. Erstautor-Publikationen

### 11.1 NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor (*Scientific Reports*)

Schmidt, J., Klingler, F.-M., Proschak, E., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavec, M. & Merk, D. (2015). NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor. *Scientific Reports*, 5, 14782.

DOI: 10.1038/srep14782

Link: <https://www.nature.com/articles/srep14782>

*Reproduced with permission from Schmidt, J., Klingler, F.-M., Proschak, E., Steinhilber, D., Schubert-Zsilavec, M. & Merk, D. Scientific Report, 2015, 5, 14782. Copyright 2015. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>*

# SCIENTIFIC REPORTS

**OPEN**

## NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor

Received: 23 June 2015  
Accepted: 10 September 2015  
Published: 01 October 2015

Jurema Schmidt, Franca-Maria Klingler, Ewgenji Proschak, Dieter Steinhilber, Manfred Schubert-Zsilavec & Daniel Merk

The nuclear farnesoid X receptor (FXR) is a ligand activated transcription factor and acts as cellular sensor for bile acids. In this role, FXR is a highly important liver protector and FXR inhibition by antagonists or knockout has shown several deleterious effects. A recent report characterized non-steroidal anti-rheumatic drugs (NSAIDs) such as ibuprofen or diclofenac as FXR antagonists and linked hepatotoxic effects of these drugs with antagonistic activity on FXR. Since this would guide a way to develop safer anti-inflammatory agents by sparing FXR, we intended to further characterize the reported antagonistic activity and intensively investigated ibuprofen, indometacin and diclofenac. However, we conclude that these agents do not interact with FXR and that the reported reduced FXR signaling induced by CDCA in presence of NSAIDs is merely a consequence than a cause of hepatotoxicity.

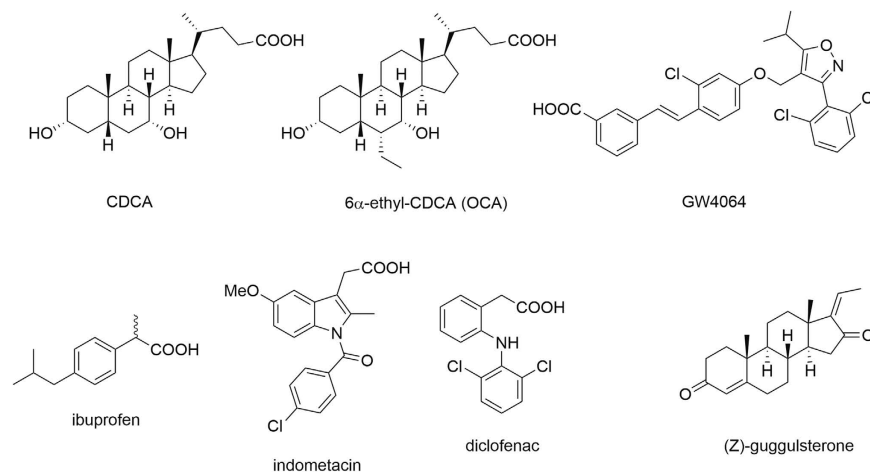
Nuclear farnesoid X receptor (FXR) is a crucial ligand-activated transcription factor acting as bile acid sensor<sup>1–3</sup>. As such, FXR regulates the homeostasis of bile acids and is a highly important liver protector<sup>4</sup>. Upon FXR activation by e.g. high levels of toxic bile acids, bile acid synthesis is blocked and bile acid metabolism and excretion are enhanced<sup>4,5</sup>. Thereby FXR shields liver cells against the accumulation of bile acids and their toxic effects. FXR is furthermore involved in several other metabolic regulatory systems including lipid and glucose homeostasis and seems to have anti-inflammatory activity as well<sup>5</sup>.

Physiologically, FXR is activated by bile acids of which chenodeoxycholic acid (CDCA) is the most potent FXR agonist with an EC<sub>50</sub> value of about 8 μM<sup>3</sup>. Intensive research within the last decade has also discovered several synthetic FXR agonists and antagonists<sup>6,7</sup>. However, at present only FXR agonism seems to have a therapeutic potential while FXR antagonism is rather associated with undesired effects<sup>8</sup>. FXR activation is currently evaluated as therapeutic concept for the treatment of severe liver disorders such as non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and primary biliary cirrhosis (PBC) with obeticholic acid (OCA) as experimental FXR agonist in advanced clinical development<sup>9–11</sup>.

Recently, Lu *et al.*<sup>12</sup> have reported NSAIDs to have antagonistic activity on FXR and they state that this antagonism contributes to liver damage caused by chronic intake of NSAIDs. This data intrigued us for two particular reasons. First, would FXR antagonism actually contribute to toxicity and side effects of NSAIDs, this knowledge would suggest an opportunity to develop safer anti-inflammatory agents by designing cyclooxygenase inhibitors that spare FXR. Second, FXR antagonists are rare but required as pharmacological tools for further investigation of the physiological and pathophysiological roles of FXR. The small and highly drug-like NSAIDs would be a very valuable starting point for the development of potent FXR antagonists.

However, we were confounded by the low maximum FXR activation in the test systems reported by Lu *et al.* and the fact that chemically quite diverse agents such as the NSAIDs diclofenac and indometacin show comparable activity on FXR. Therefore, we intended to reproduce and further characterize the reported data in our test systems and selected the NSAIDs ibuprofen, indometacin, and diclofenac to

Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Str. 9, 60438 Frankfurt, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.M. (email: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de)



**Figure 1.** NSAIDs ibuprofen, indometacin and diclofenac, common FXR agonists CDCA, OCA and GW4064 as well as the SBARM (Z)-guggulsterone which is commonly used as reference FXR antagonist.

cover a high structural variety amongst the NSAIDs (Fig. 1). We applied these three NSAIDs to several test systems including a full-length reporter gene assay, a hybrid reporter gene assay, quantitative real-time PCR, and thermal shift experiments. To our surprise, none of the examined NSAIDs exhibited any activity or binding on FXR.

## Results

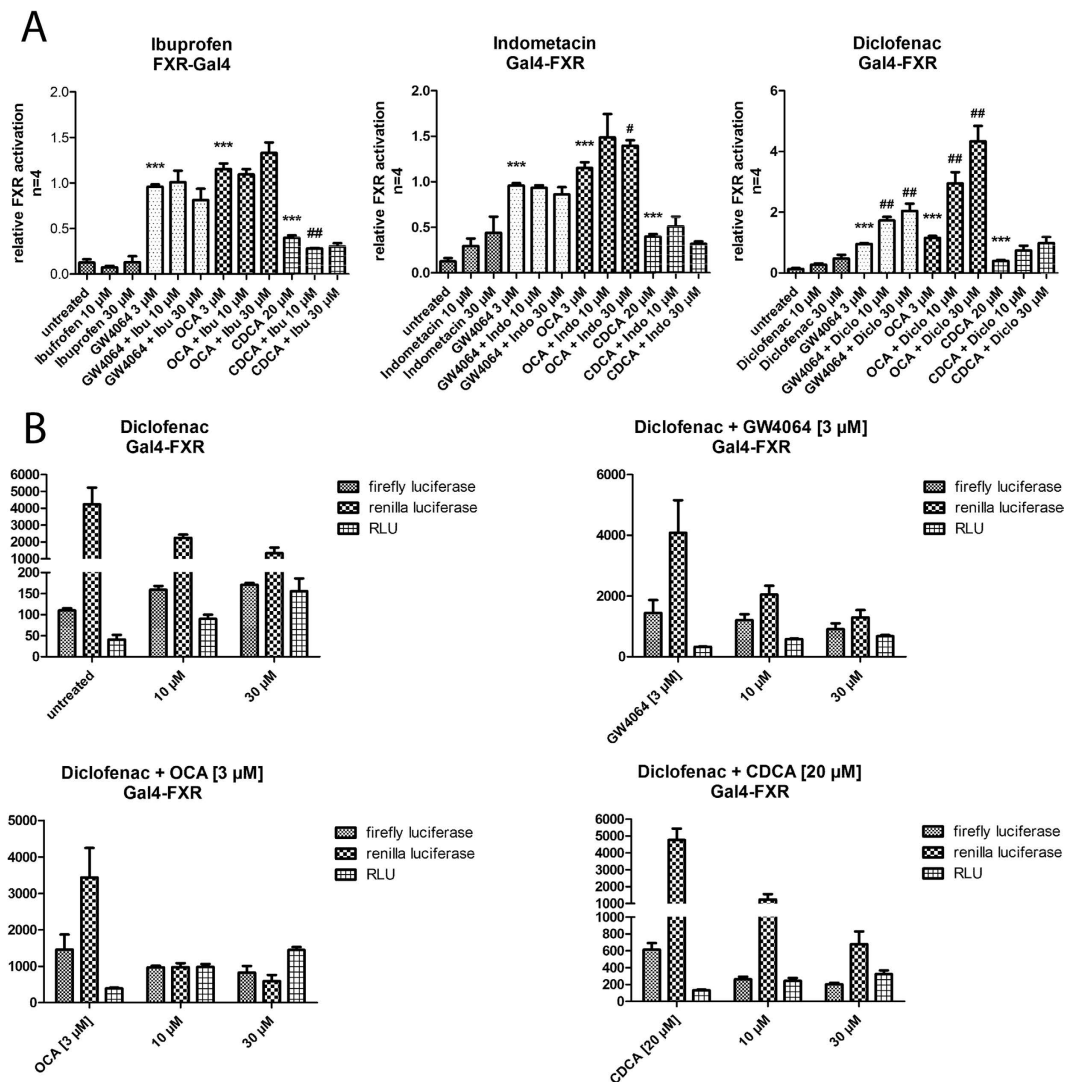
**Hybrid reporter gene assay.** First, we characterized ibuprofen, indometacin, and diclofenac in a hybrid FXR reporter gene assay<sup>13</sup> in COS-7 cells for agonistic and antagonistic activity. The assay is based on a fusion receptor of the FXR ligand binding domain and a Gal4 DNA binding domain from yeast. As reporter gene the assay contains a firefly luciferase under the control of a Gal4 response element which is only transcribed upon activation of the hybrid receptor. A renilla luciferase with a constitutively active SV40 promoter serves as control for transfection efficiency and toxicity. The assay was validated with FXR agonists CDCA ( $EC_{50} = 14.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ), GW4064 ( $EC_{50} = 0.22 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ) and OCA ( $EC_{50} = 0.54 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ) which showed values in good agreement with the literature<sup>9,14–16</sup>. As antagonistic reference the commonly used selective bile acid receptor modulator (SBARM) guggulsterone<sup>8</sup> was employed which in this test system had an  $IC_{50}$  value of  $13.6 \pm 2.8 \mu\text{M}$ . In order to determine antagonistic activity, test compounds were co-incubated with GW4064 ( $3 \mu\text{M}$ ), OCA ( $3 \mu\text{M}$ ) or CDCA ( $20 \mu\text{M}$ ).

In the Gal4-FXR hybrid assay, none of the tested NSAIDs showed any agonistic or antagonistic activity at concentrations of  $10 \mu\text{M}$  and  $30 \mu\text{M}$  which is far above the reported  $IC_{50}$  values (Fig. 2). Notably, the concentration of CDCA was quite low with  $20 \mu\text{M}$  and therefore it could be expected that the NSAIDs would have even higher potency than in the reported data where the NSAIDs had to compete with  $50 \mu\text{M}$  CDCA. For diclofenac, the assay data on first glance would indicate an additive agonistic activity that enhances the potency of all FXR agonists used. However, this effect was due to a cytotoxic effect that only negatively affects the control gene without enhancing the expression of the reporter gene (Fig. 2).

**Full-length reporter gene assay.** Next, we assumed that eventually the entire FXR receptor protein might be required for the reported activity of the NSAIDs and therefore, we continued the evaluation in a full-length FXR reporter gene assay under the same competitive conditions with GW4064, OCA and CDCA. The assay was conducted in HeLa cells and is based on the complete FXR receptor (CMV promoter) and its hetero-dimer partner retinoid X receptor (RXR $\alpha$ , CMV promoter). As reporter gene, a firefly luciferase under the control of a bile salt export protein (BSEP) promoter was used and a renilla luciferase (SV40 promoter) served as transfection and toxicity control<sup>17</sup>. The assay was also validated with FXR agonists CDCA ( $EC_{50} = 18 \pm 1 \mu\text{M}$ ), GW4064 ( $EC_{50} = 0.51 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ) and OCA ( $EC_{50} = 0.16 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ), which yielded values in good agreement with the literature<sup>9,14–16</sup>.

In the full-length FXR reporter gene assay again, none of the tested NSAIDs showed any agonistic or antagonistic activity (Fig. 3A). For the competition with OCA, we observed a slight increase in relative light units which was due to a toxicity driven decrease in activity of the control gene (renilla luciferase) but not to an effect on the firefly luciferase as reporter gene (Fig. 3B). This assumed toxic effect was also confirmed when we used the assay cells for western blotting on the house keeping gene  $\beta$ -actin which is quite sensitive for toxicity (Fig. 3C). Hence, NSAIDs seemed to have an increased toxicity in HeLa cells when combined with obeticholic acid (Fig. 3).

**Toxicity.** In the full-length FXR reporter gene assay and in the Gal4-FXR hybrid reporter gene assay we observed considerable toxicity for the NSAIDs. Especially the combination of NSAIDs with competitor



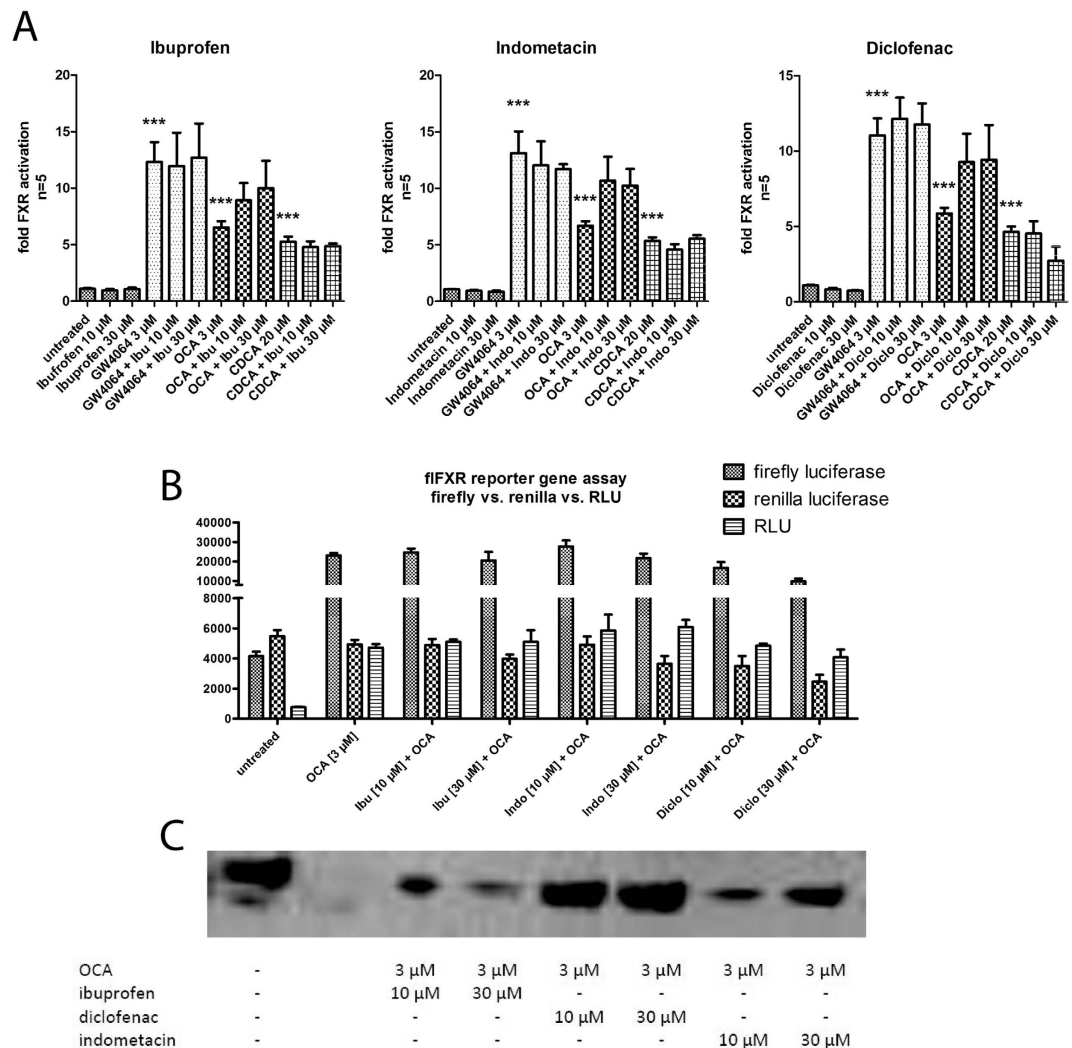
**Figure 2.** FXR-Gal4 hybrid reporter gene assay (data represents mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). (A) None of the NSAIDs ibuprofen, diclofenac and indometacin showed any agonistic or competitive antagonistic activity in the hybrid reporter gene assay. Compounds were assessed at 10 or 30  $\mu\text{M}$  alone and in competition with GW4064 (3  $\mu\text{M}$ ), OCA (3  $\mu\text{M}$ ) and CDCA (20  $\mu\text{M}$ ). (B) The increased relative activity of diclofenac (suggestive of FXR agonism) does not result from increased reporter (firefly luciferase) activity but from a toxicity driven decrease in the activity of the control gene (renilla luciferase). The effect does therefore not represent an (agonistic) activity on FXR. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

significantly affected the viability of the assay cells in several cases. Therefore, we analyzed the toxicity of ibuprofen, indometacin and diclofenac under various conditions using the WST-1 assay.

In HepG2 cells, ibuprofen showed no toxicity up to 50  $\mu\text{M}$  whilst both indometacin and diclofenac generated anti-proliferative activity at concentrations of 10  $\mu\text{M}$  and above. In HEK293T cells which Lu *et al.* have used for their reporter gene assay the NSAIDs indometacin and diclofenac exhibited even higher toxicity (Fig. 4).

When the NSAIDs are combined with CDCA which is necessary for evaluation of competitive antagonism, the toxicity is strongly enhanced. In consequence, cells that are e.g. used for a reporter gene assay and treated with a combination of 50  $\mu\text{M}$  CDCA and a NSAID are significantly restricted in their viability. This in turn affects the results of the assay. As a result of increased toxicity the reporter gene assay indicates lower FXR activity which must not be interpreted as antagonism since it is not a result of an activity on target. To circumvent this problem, lower concentrations of CDCA as competitor in a reporter gene assay should be used for less robust cell lines. When we evaluated the cell viability of HEK293T cells with the WST-1 assay after incubation with NSAIDs (5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ) in combination with CDCA (50  $\mu\text{M}$ ) we received almost exactly the same picture as Lu *et al.* reported for their reporter gene assay in HEK293T cells. This might eventually explain the reported data since we treated the cells almost equally as Lu *et al.* except that we did not transfect them for a reporter gene assay (Fig. 5).

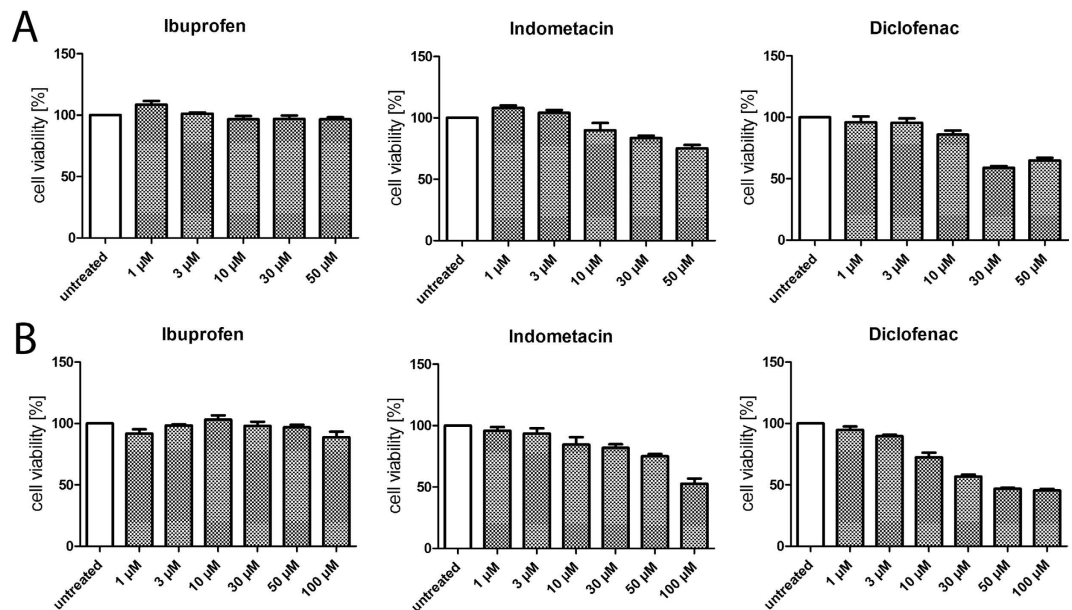




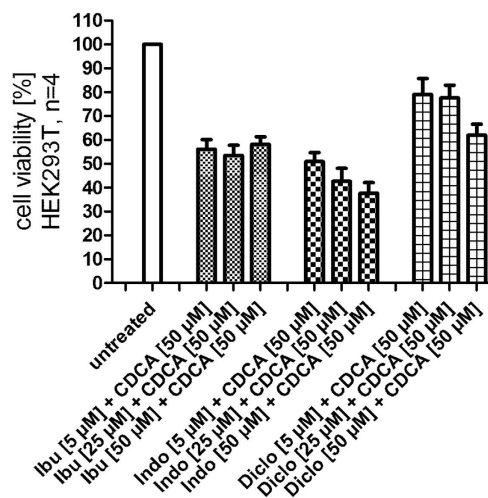
**Figure 3. Full-length FXR reporter gene assay (data represents mean  $\pm$  SEM;  $n = 5$ ).** (A) None of the NSAIDs ibuprofen, diclofenac, and indometacin showed any agonistic or competitive antagonistic activity in the full-length FXR reporter gene assay. Compounds were assessed at 10 or 30  $\mu$ M alone and in competition with GW4064 (3  $\mu$ M), OCA (3  $\mu$ M) and CDCA (20  $\mu$ M). (B) The increased relative activity of NSAIDs when combined with OCA (3  $\mu$ M) (suggestive of FXR agonism) does not result from increased reporter (firefly luciferase) activity but from a toxicity driven decrease in the activity of the control gene (renilla luciferase). The effect does therefore not represent an (agonistic) activity on FXR. (C) Western blotting on  $\beta$ -actin confirms the toxic activity of OCA and NSAIDs in combination (normalized on cell number). (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

We assumed that shorter incubation periods might reduce toxic effects in test systems which would help to generate more robust data. Therefore, we also determined cell viability of HepG2 cells after 6 hours of incubation with NSAIDs (3  $\mu$ M–100  $\mu$ M) alone or in combination with CDCA (50  $\mu$ M, Fig. 6). For ibuprofen and indometacin, the shorter incubation period could nearly completely prevent toxicity. Ibuprofen showed no significant toxic effects up to 100  $\mu$ M while indometacin did not affect cell viability up to 50  $\mu$ M. Also diclofenac showed less toxic effects but the effect was less pronounced. Still, with  $85 \pm 2\%$  cell viability compared to untreated control for the combination of 30  $\mu$ M diclofenac and 50  $\mu$ M CDCA and  $75 \pm 2\%$  for 50  $\mu$ M diclofenac and 50  $\mu$ M CDCA both concentrations seemed suitable and interpretable after 6 hours of incubation.

Summing up, indometacin and especially diclofenac are considerably toxic at concentrations of 30  $\mu$ M or higher. This toxicity is strongly enhanced when the compounds are co-incubated with CDCA. Hence, additive toxic effects may explain variations in experimental data which must not be misinterpreted as antagonism. Shorter incubation periods can reduce the toxic effects which may help to generate more robust data.

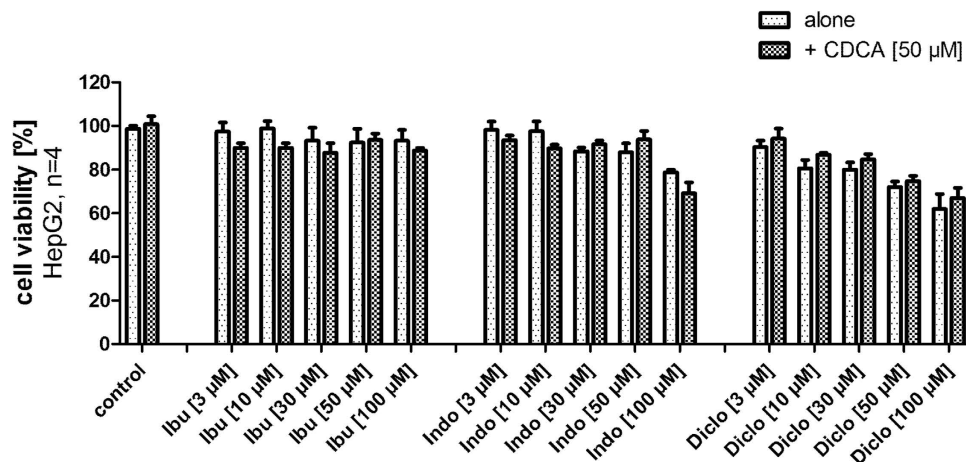


**Figure 4.** Toxicity of NSAIDs in HepG2 cells (A) and HEK293T (B) cells (data represents mean  $\pm$  SEM; n=4). In HepG2 cells (A) indometacin and diclofenac showed slight toxicity starting from a concentration of 10  $\mu$ M while ibuprofen was non-toxic up to 50  $\mu$ M. In HEK293T cells (B) the toxicity of indometacin and especially diclofenac is enhanced.

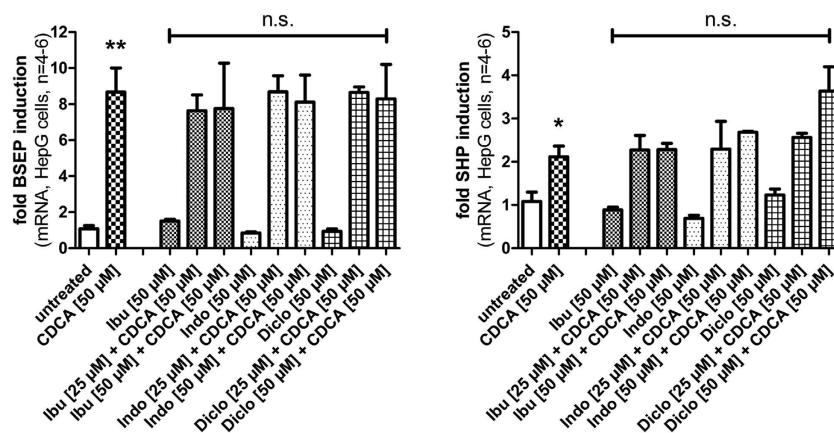


**Figure 5.** Toxicity of NSAIDs in combination with CDCA in HEK293T cells (data represents mean  $\pm$  SEM; n=4). Ibuprofen, diclofenac and indometacin exhibit considerable anti-proliferative effects on HEK293T cells when combined with CDCA (50  $\mu$ M). This activity may result in reduced reporter gene expression in test systems but must not be interpreted as antagonism.

**FXR target gene quantification (qRT PCR).** Quantification of the expression of FXR target genes in non-transfected cells offers the least artificial way to characterize the activity of a FXR ligand *in vitro*. Since FXR activity is especially important in liver, hepatocytes are suitable to evaluate effects of test compounds on FXR target genes. We therefore investigated the activity of NSAIDs ibuprofen, diclofenac, and indometacin in HepG2 cells. As investigated genes we selected the direct FXR target genes bile salt export protein (BSEP) and small hetero-dimer partner (SHP) which allows a specific conclusion whether a FXR-dependent effect is present. To reduce toxic effects we incubated the cells with the NSAIDs and CDCA for 6 hours which is certainly enough to see effects on direct FXR target genes such as BSEP and SHP. Previous toxicity determination in HepG2 cells after 6 hours incubation with NSAIDs and CDCA (Fig. 6) confirmed this assumption since no strong toxicity occurred. To further exclude toxic effects, we selected two different concentrations of NSAIDs for the evaluation of FXR target gene expression and tested all NSAIDs in 25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M concentration in competition with CDCA (50  $\mu$ M). According to



**Figure 6.** Toxicity of NSAIDs alone or in combination with CDCA in HepG2 cells after a short incubation period of 6 hours (data represents mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). With shorter incubation, the toxicity of NSAIDs is reduced and for all NSAIDs concentrations of 30  $\mu$ M and 50  $\mu$ M seem suitable for experiments with 6 hours incubation time.

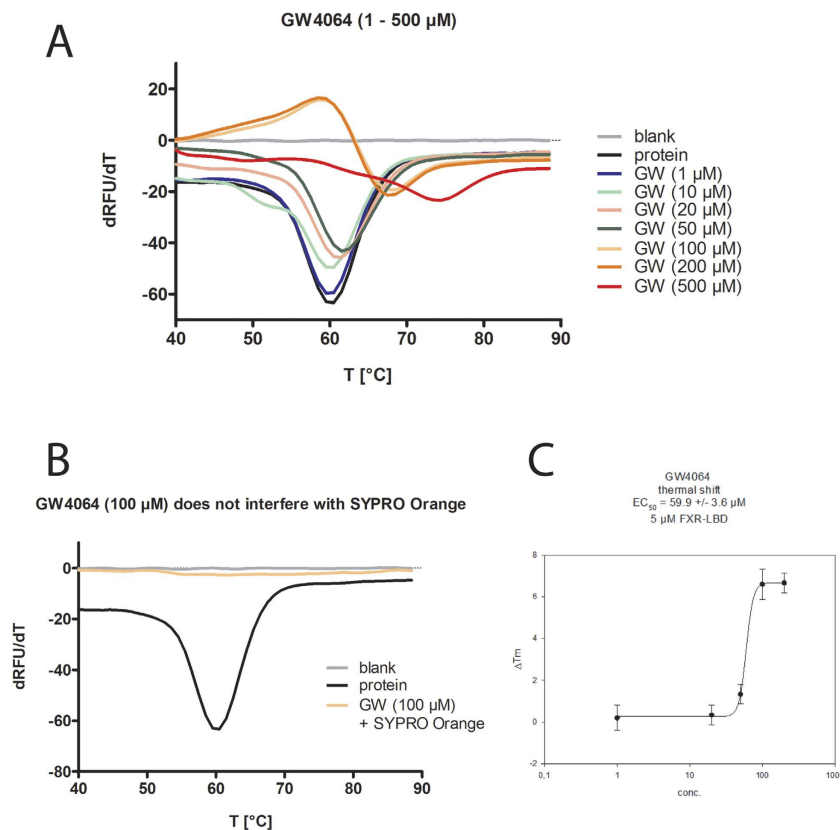


**Figure 7.** FXR target gene quantification by qRT-PCR (data represents mean  $\pm$  SEM;  $n = 4-6$ ). Ibuprofen, diclofenac and indometacin (all 50  $\mu$ M) did not affect the expression of the direct FXR target genes bile salt export protein (BSEP) and small hetero-dimer partner (SHP) in HepG2 cells after 6 h incubation. Furthermore, none of the NSAIDs (25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) antagonized the effect of CDCA (50  $\mu$ M) on the expression of BSEP or SHP. (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; n.s.—not significant).

our toxicity determination, the combination of ibuprofen, indometacin or diclofenac in 25  $\mu$ M concentration and CDCA (50  $\mu$ M) did not affect cell viability after 6 hours incubation. We then quantified the mRNA of FXR target genes BSEP and SHP by qRT-PCR. Incubation of HepG2 cells with the NSAIDs (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) alone or in competition with the endogenous FXR agonist CDCA (50  $\mu$ M) revealed no significant activity and confirmed the results from the reporter gene assays. None of the NSAIDs in 50  $\mu$ M concentration had any significant agonistic or antagonistic effect on BSEP or SHP expression alone and none of the NSAIDs significantly reduced the effect of CDCA on the expression of BSEP or SHP (Fig. 7).

**Thermal shift.** Although all *in vitro* data contradicted an interaction of the NSAIDs ibuprofen, diclofenac and indometacin with FXR we also intended to determine binding of NSAIDs to the FXR ligand binding domain (LBD). Lu *et al.*<sup>12</sup> have postulated by *in silico* investigations that NSAIDs directly interact with the ligand binding site of FXR. Moreover, investigation of a direct interaction between potential ligand and target protein excludes any artifacts caused by the cellular background in reporter gene assays or qRT-PCR experiments.

For a nuclear receptor such as FXR, activation by a ligand is facilitated by interaction of the ligand with the ligand-dependent activation function 2 (AF-2) which is located in helix 12 of the LBD. The interaction with AF-2 causes a recruitment and stabilization of helix 12 to the rest of the LBD. In



**Figure 8. Validation for thermal shift experiments.** (A) FXR agonist GW4064 robustly stabilizes the FXR-LBD at concentrations  $\geq 100 \mu\text{M}$  (ratio to protein  $\geq 20:1$ ) and produces a significant thermal shift. (B) GW4064 showed no interaction with the dye SYPRO Orange. (C) GW4064 produced a robust thermal shift of about  $6^\circ\text{C}$  and with our conditions ( $5 \mu\text{M}$  FXR-LBD) had an  $EC_{50}$  value of  $60 \pm 4 \mu\text{M}$ . (All experiments were repeated independently four times in duplicates and yielded uniform results; Fig. 7A,B represent one repeat).

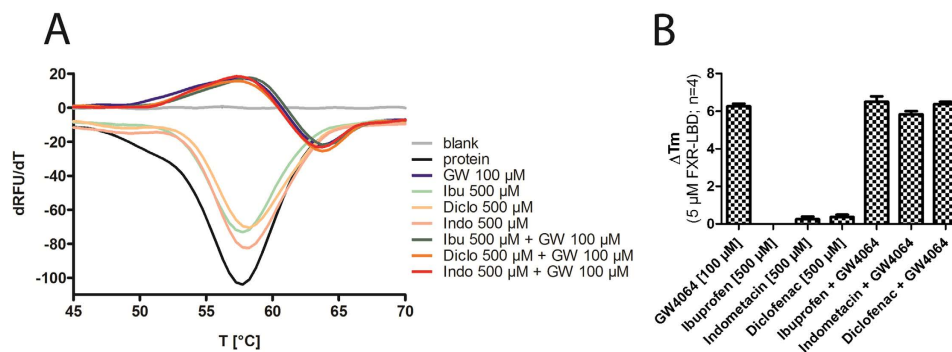
consequence, a new surface is generated on the LBD where co-activator peptides can be bound. An antagonist on a nuclear receptor in contrast prevents the stabilization of helix 12. We assumed that an increased stability of the FXR-LBD that is facilitated by direct binding of a ligand could be determined in thermal shift experiments.

The thermal shift method is widely used to assess ligand binding<sup>18,19</sup>. A thermal shift assay usually measures the melting temperature of a protein with or without a ligand by monitoring a fluorescent dye. In an aqueous solution of folded protein the dye signal is low due to quenching of the dye fluorescence in water, but with increasing temperature the protein unfolds and exposes its hydrophobic core regions. The fluorescent dye is then bound to the hydrophobic surfaces and fluorescence increases<sup>18,19</sup>.

In the thermal shift experiments, we used  $5 \mu\text{M}$  of recombinant FXR-LBD protein (residues 244–472) and titrated the FXR agonist GW4064 from  $1 \mu\text{M}$  to  $500 \mu\text{M}$  to find the optimal concentration for competitive measurement. The melting curve revealed a robust stabilization of the FXR-LBD protein starting from  $100 \mu\text{M}$  GW4064 which corresponds to a ratio of 20:1 between ligand and protein (Fig. 8). In absence of protein, GW4064 produced no effect which confirmed that GW4064 does not interact with SYPRO Orange and that the method is suitable to detect a stabilizing effect on the FXR-LBD (Fig. 8).

Next, we determined the stability of the FXR-LBD in presence of the NSAIDs ibuprofen, diclofenac or indometacin at high concentrations ( $500 \mu\text{M}$  each, 100:1 ratio compound to protein). The melting curve showed no significant difference between FXR-LBD protein alone and protein with NSAID (Fig. 9). Finally, we investigated a potential competitive activity of the NSAIDs on the GW4064 dependent stabilization of the FXR-LBD by co-incubation of GW4064 with ibuprofen, diclofenac, or indometacin. To observe even a slight antagonistic effect we used the lowest concentration of GW4064 ( $100 \mu\text{M}$ ) that had stabilized the protein and high concentrations of the NSAIDs ( $500 \mu\text{M}$ ). Again, no difference was observed in the melting curve of the FXR-LBD in presence of GW4064 or GW4064 and NSAIDs (Fig. 9). All thermal shift experiments were repeated independently four times and yielded uniform results (Supporting Information).





**Figure 9. Thermal shift experiments with NSAIDs.** (A) Ibuprofen, diclofenac, and indometacin (all 500 μM, ratio to protein 100:1) alone did not stabilize the FXR-LBD and did not antagonize the stabilization of the FXR-LBD by GW4064 (100 μM, ratio 20:1) when assessed in competition. (B) GW4064 produced a thermal shift of 6°C. NSAIDs had no effect alone and did not affect the thermal shift caused by GW4064 when tested in competition. (All experiments were repeated independently four times in duplicates and yielded uniform results; Fig. 9A represents one repeat).

The thermal shift experiments revealed no effects of the NSAIDs on the FXR-LBD which confirmed our *in vitro* data and our assumption that NSAIDs do not interact with the FXR-LBD and do not antagonize FXR activation by agonists.

## Discussion

Our results are in strong contrast to the reported FXR antagonistic activity of NSAIDs that was observed by Lu *et al.* and in our opinion the data published by Lu *et al.* has several limitations.

First, the use of CDCA as positive control FXR agonist in a reporter gene assay is unfavorable since CDCA is only moderately potent as FXR agonist and at the same time exhibits considerable toxicity. Therefore it is very difficult to generate constant and reproducible FXR activation with CDCA. Since the EC<sub>50</sub> value of CDCA in reporter gene assays is around 10 μM high concentrations of CDCA are required for a robust FXR activation but such high concentrations also affect the viability of the assay cells.

The high toxicity of CDCA is further enhanced when it is used as competitive agent for antagonistic testing. In a reporter gene assay, antagonistic activity can be determined as a reduced activity of the reporter gene but the control gene—provided a control gene is included—should not be affected by the antagonistic agent since this would indicate a toxic effect rather than antagonism. Hence, it is thinkable that what Lu *et al.* interpreted as antagonism was merely toxicity. In congruence with this assumption, we observed very similar values for simple cell viability when we treated the same cell line with the same compounds as Lu *et al.* have reported as antagonistic activity in their reporter gene (Fig. 5). Eventually, this toxic effect was not taken into consideration.

As a further limitation, Lu *et al.* did not report how many repeats and replicates of their experiments have been conducted and a statistical analysis is missing. With the high variations that must be expected with CDCA (50 μM) as positive control it is also possible that fluctuations contributed to the results.

In our test systems that have intensively been validated and yield robust and reproducible results, no activity was present for the NSAIDs ibuprofen, indometacin, and diclofenac, neither alone nor in competition with the well-known FXR agonists GW4064, OCA or CDCA at typical concentrations. Even at quite low concentrations of CDCA (20 μM) as competitor that should benefit a possible antagonistic activity, no effect was detectable. However, we observed considerable toxicity for diclofenac (30 μM) and indometacin (30 μM) which might easily be misinterpreted as antagonism in case no control gene is used for normalization.

For characterization of nuclear receptor ligands, quantification of target gene expression in ‘native cells’, i.e. not transfected cells is very important. However, given the highly complex network of nuclear receptor signaling, the selection of suitable target genes is essential to obtain results that qualify for a sound interpretation. Therefore, direct target genes should be selected that are affected by the nuclear receptor in first instance and not via a secondary pathway after the expression of a direct target gene has changed. In addition, target genes are required that are only or at least predominantly affected by the nuclear receptor in question.

Many direct target genes of FXR have been reported including the small hetero-dimer partner (SHP) and several bile acid transporters such as the bile salt export protein (BSEP). However, the regulation of the unusual nuclear receptor SHP is very complex and involves many other nuclear receptors that can affect the expression of SHP. The promoter region of the SHP gene contains response elements for e.g. the nuclear receptors hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α), liver receptor-homolog 1 (LRH-1), estrogen receptor α (ERα), liver X receptor α (LXRα), pregnane X receptor (PXR), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) and FXR<sup>20,21</sup>. It has to be noted that these different nuclear receptors can also compete at

the promoter region and affect each other which makes the interpretation even more complex. Although it is naturally very important to know what effect a FXR ligand exerts on SHP expression, an effect on SHP expression cannot automatically be interpreted as activity on FXR. The same holds true for secondary target genes of FXR such as cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) that have very important physiological effects but are regulated by many different signaling pathways including several nuclear receptors. CYP7A1 is regulated e.g. by nuclear receptors LXR, HNF4 $\alpha$ , and SHP and therefore transcriptional effects on CYP7A1 can result from activation or repression of various molecular targets<sup>21</sup>. A considerably more specific target gene is BSEP which is almost exclusively regulated by FXR<sup>21,22</sup>. Therefore, effects on the expression of BSEP offer more insights into the activity of an agent on FXR.

Lu *et al.* have quantified the effect of the NSAIDs ibuprofen and indometacin on the expression of SHP and CYP7A1 induced by 50  $\mu$ M CDCA in HepG2 cells. They report an antagonistic activity of the NSAIDs on both genes. In case of SHP this results in reduced mRNA levels compared to CDCA alone and in case of CYP7A1 leads to enhanced expression since CYP7A1 is not directly affected by FXR but dependent from SHP activity. However, it is confounding that ibuprofen and indometacin have significantly different efficacy in these experiments although they were equally potent in all other *in vitro* assays reported by Lu *et al.*<sup>12</sup>. The fact that indometacin was reported to induce the expression of CYP7A1 by a factor 9 while ibuprofen only produced a 1.7-fold increase in mRNA levels indicates that other pathways are involved. Based on the complex regulation of SHP and CYP7A1 and the heterogeneous data the effects on SHP and CYP7A1 expression reported by Lu *et al.* are difficult to interpret.

To obtain more specific data for transcriptional effects via FXR we selected BSEP as target gene for our experiments. In addition, we evaluated a possible effect on SHP although such effect might be explained by activity on various targets. However, we did not observe any antagonistic effect on BSEP or SHP expression by ibuprofen, diclofenac or indometacin in competition with CDCA which strongly confirmed our data from the reporter gene assays.

Hence, our *in vitro* data clearly indicates that the NSAIDs ibuprofen, indometacin, and diclofenac have no functional activity on FXR. In addition, thermal shift experiments showed that the NSAIDs do not bind to the purified FXR-LBD under cell-free conditions. We therefore conclude that reduced FXR activation by CDCA in presence of high concentrations of some NSAIDs (especially diclofenac) is not a cause but rather a consequence of toxicity and that NSAIDs do not interact with farnesoid X receptor.

## Materials and Methods

**Test compounds.** NSAIDs ibuprofen (CAS: 15687-27-1, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), indometacin (CAS: 53-86-1, Alfa Aesar) and diclofenac sodium (CAS: 15307-79-6, Acros Organics, Schwerte, Germany) as well as FXR agonists GW4064 (CAS: 278779-30-9, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), OCA (CAS: 459789-99-2, Biomol, Hamburg, Germany) and CDCA (CAS: 474-25-9, Sigma Aldrich) were purchased. Identity of the compounds was confirmed by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. All compounds had a purity >98% according to manufacturer and were used for *in vitro* test systems without further purification.

**Hybrid reporter gene assay (Gal4-FXR).** COS-7 cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

The Gal4-fusion receptor plasmid pFA-CMV-hFXR-LBD containing the hinge region and ligand binding domain (LBD) of FXR was constructed by integrating cDNA fragments obtained from PCR amplification of human monocytes into the SmaI/XbaI cleavage site of the pFA-CMV vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and has already been published<sup>23</sup>. The cDNA fragment consists of bps 565–1416. Frame and sequence of the fusion receptor was verified by sequencing. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth.

The day before transfection, COS-7 cells were seeded in 96-well plates (3 · 10<sup>4</sup> cells/well). Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega) and pFA-CMV-hFXR-LBD. 5 h after transfection, medium was changed to DMEM without phenol red, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL) L-glutamine (2 mM), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in triplicates and each experiment was repeated independently at least four times. Following overnight (12–14 h) incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficacy and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of a test compound at a respective concentration by the fold activation of FXR full agonist GW4064 at 3  $\mu$ M.

The assay was validated with FXR agonists GW4064 (EC<sub>50</sub> = 0.22 ± 0.04  $\mu$ M, 3  $\mu$ M defined as 100%), OCA (EC<sub>50</sub> = 0.54 ± 0.05  $\mu$ M, 110 ± 3% max.) and CDCA (EC<sub>50</sub> = 14.5 ± 0.8  $\mu$ M, 111 ± 5% max.).

**Full-length FXR reporter gene assay (flFXR).** HeLa cells were grown in DMEM high glucose supplemented with 10% FCS, SP (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

pcDNA3-hFXR contains the sequence of human FXR and was already published elsewhere<sup>24</sup>, pGL-3basic (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) was used as a reporter plasmid, with a shortened construct of the promoter of the bile salt export protein (BSEP, sequence of construct from<sup>25</sup>) cloned into the SacI/NheI cleavage site in front of the luciferase gene. pRL-SV40 (Promega Corporation) was transfected as a control for normalization of transfection efficiency and cell growth. pSG5-hRXR was already published elsewhere<sup>26</sup> as well.

24 h before transfection, HeLa cells were seeded in 96-well plates (8 · 10<sup>3</sup> cells/well). 3.5 h before transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 0.5% charcoal-stripped FCS. 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 method. 16 h after transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 0.5% charcoal-stripped FCS. 24 h after transfection, medium was changed to DMEM without phenol red, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), L-glutamine (2 mM) and 0.5% charcoal-stripped FCS, now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in triplicates and each experiment was repeated independently at least five times. Following 24 h incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega Corporation) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with a Tecan Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of the tested compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of the tested compound at a respective concentration by the fold activation of FXR full agonist GW4064 at 3 µM.

The assay was validated with FXR agonists GW4064 (EC<sub>50</sub> = 0.51 ± 0.16 µM, 3 µM defined as 100%), OCA (EC<sub>50</sub> = 0.16 ± 0.02 µM, 87 ± 3% max.) and CDCA (EC<sub>50</sub> = 18 ± 1 µM, 88 ± 3% max.).

**Cell proliferation assay (WST-1).** WST-1 assay (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Switzerland) was performed according to manufacturer's protocol. In brief, HepG2 cells were seeded in DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% FCS in 96-well plates (3 · 10<sup>4</sup> cells/well). HEK293T cells were seeded in DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% FCS in 96-well plates (2.5 · 10<sup>4</sup> cells/well). After 24 h, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 1% charcoal stripped FCS and cells were incubated with varying concentrations of test compounds, Revlotron (100 µM) as positive control and DMEM/0.1% DMSO as negative control. After 48 h, WST reagent (Roche Diagnostics International AG) was added to each well according to manufacturer's instructions. For determination of combined toxicity of NSAIDs and CDCA in HEK cells WST reagent was added after 24 h and to determine short-term toxicity, viability of HepG2 cells was measured after 6 h incubation. After 45 min incubation, absorption (450 nm/reference: 620 nm) was determined with a Tecan Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Each experiment was repeated at least four times in triplicates.

**FXR target gene quantification by qRT-PCR.** HepG2 cells were seeded in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, SP (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in 6-well plates (2 · 10<sup>6</sup> per well). 24 h after seeding, medium was changed to MEM, supplemented with 1% charcoal-stripped FCS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and L-glutamine (2 mM). After additional 24 h, medium was changed again to MEM, now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compounds or 0.1% DMSO alone as untreated control. Cells were incubated with the test compounds for 6 h, harvested, washed with cold phosphate buffered saline (PBS) and then directly used for RNA extraction.

Total RNA was extracted from HepG2 cells by the Total RNA Mini Kit (R6834-02, Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA). RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) with 2 µg RNA according to the manufacturer's protocol.

FXR target gene expression was evaluated by quantitative PCR analysis with a StepOnePlus™ System (Life Technologies) using PowerSYBRGreen (Life Technologies; 12.5 µL per well) and the following primers<sup>17</sup> (300 nM each): SHP: 5'-GCTGTCTGGAGTCCTTCTGG (forward) and 5'-CCAATGATAGGGCGAAAGAAGAG (reverse); BSEP: 5'-CATGGTCAAGAAGTGTCTGAGT (forward) and 5'-AAGCGATGAGCAACTGAAATGAT (reverse). Results were normalized to GAPDH Ct values. Sequences of the GAPDH primers were as follows: 5'-ATATGATTCCACCCATGGCA (forward)

and 5′- GATGATGACCCTTTTGGCTC (reverse). Each sample was set up in duplicates and repeated in at least four independent experiments. The expression was quantified by the comparative  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method.

**Thermal shift.** Thermal Shift assay was performed in clear 96-well plates (Invitrogen) using SYPRO Orange (Invitrogen Darmstadt, Germany) as dye. 10  $\mu\text{L}$  of test compound (GW4064: final concentration 1  $\mu\text{M}$ –500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  for competitive testing; NSAIDs: 500  $\mu\text{M}$  final concentration) in assay buffer (10 mM TRIS (pH 8.3), 5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 100 mM NaCl) were mixed with 10  $\mu\text{L}$  of protein (final protein concentration 5  $\mu\text{M}$ ) in assay buffer and 5  $\mu\text{L}$  of SYPRO Orange (5  $\times$  final concentration) in assay buffer. Temperature-dependent fluorescence increase reporting protein denaturation was measured in duplicates in an ICycler (Bio-Rad) from 20 to 90 °C in steps of 0.2 °C per minute at 300 nm excitation and 570 nm emission wavelength. Each experiment was independently repeated four times. The first derivative of the melting curves was calculated using the Graph Pad Prism 5 software.

**Western blotting.** For the Western Blot analysis, HeLa cells were prepared, transfected and incubated as described for the full-length FXR reporter gene assay. Cells were then harvested with TE-buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA), collected and centrifuged (3000 rpm for 5 minutes). The supernatants were discarded, the pellets were washed in PBS buffer (1.4 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4) once, re-suspended in 18  $\mu\text{L}$  PBS Buffer and mixed with 6  $\mu\text{L}$  Laemmli buffer (120 mM Tris-Cl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue). The mixtures were denatured by heating to 95 °C for 5 minutes.

For the SDS PAGE, 1 mm Gels (NuPAGE 4–12%) with 15 wells from Invitrogen were used. 10  $\mu\text{L}$  of each sample were loaded on the gel and 3.5  $\mu\text{L}$  PageRuler NIR prestained (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) was used. As running buffer, MES buffer (50 mM MES, 50 mM Tris base, 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS) was used.

For the Western Blot, the XCell II™ Blot Module CE Mark (Life Technologies, Darmstadt, Germany) was used. A PVDF membrane (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was activated with 100% Methanol (5 seconds), washed with ultrapure water and soaked in WET blot buffer (195 mM glycine, 240 mM Tris, pH 9.2). After blotting for one hour, the membrane was blocked with 0.2% I-Block™ reagent in PBS buffer with 0.1% Tween20® for one hour at room temperature and then incubated for one hour with the primary antibody-0.2% I-Block™ PBS buffer (A5441 from Sigma Aldrich) at 4 °C. The membrane was washed three times for 10 minutes with 0.2% I-Block™ PBS buffer before it was incubated for one hour with the second antibody-0.2% I-Block™ PBS buffer (donkey-anti-mouse IRDye680LT from Li-Cor, Lincoln, NB, USA). After incubation, the membrane was washed two times for 10 minutes with 0.2% I-Block™ PBS buffer and once with PBS Puffer. The blot was stored at 4 °C in PBS buffer and measured at 700 and 800 nm with an Odyssey CLx (Li-Cor).

## References

- Seol, W., Choi, H. & Moore, D. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol.* **9**, 72–85 (1995).
- Forman, B. *et al.* Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **81**, 687–693 (1995).
- Parks, D. *et al.* Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* **284**, 1365–1368 (1999).
- Kuipers, F., Bloks, V. & Groen, A. Beyond intestinal soap-bile acids in metabolic control. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 488–498 (2014).
- Gadaleta, R., Cariello, M., Sabbà, C. & Moschetta, A. Tissue-specific actions of FXR in metabolism and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1851**, 30–39 (2014).
- Merk, D., Steinhilber, D. & Schubert-Zsilavecz, M. Medicinal chemistry of farnesoid X receptor ligands: from agonists and antagonists to modulators. *Future Med. Chem.* **4**, 1015–1036 (2012).
- Carotti, A. *et al.* Beyond Bile Acids: Targeting Farnesoid X Receptor (FXR) with Natural and Synthetic Ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 2129–2142 (2014).
- Lamers, C., Schubert-Zsilavecz, M. & Merk, D. Medicinal Chemistry and Pharmacological Effects of Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**, 2188–2205 (2014).
- Pellicciari, R. *et al.* 6 $\alpha$ -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J. Med. Chem.* **45**, 3569–3572 (2002).
- Hirschfield, G. M. *et al.* Efficacy of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* **148**, 751–761 (2014).
- Neuschwander-Tetri, B. *et al.* Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **385**, 956–965 (2014).
- Lu, W. *et al.* FXR antagonism of NSAIDs contributes to drug-induced liver injury identified by systems pharmacology approach. *Sci. Rep.* **5**, 8114, doi: 10.1038/srep08114 (2015).
- Merk, D., Steinhilber, D. & Schubert-Zsilavecz, M. Characterizing ligands for farnesoid X receptor-available *in vitro* test systems for farnesoid X receptor modulator development. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 27–37 (2014).
- Maloney, P. *et al.* Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J. Med. Chem.* **43**, 2971–2974 (2000).
- Richter, H. *et al.* Discovery of novel and orally active FXR agonists for the potential treatment of dyslipidemia & diabetes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 191–194 (2011).
- Feng, S. *et al.* Identification of an N-oxide pyridine GW4064 analog as a potent FXR agonist. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 2595–2598 (2009).
- Merk, D. *et al.* Extending the Structure–Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives As Farnesoid X Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **57**, 8035–8055 (2014).
- Pantoliano, M. *et al.* High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J. Biomol. Screen.* **6**, 429–440 (2001).



19. Niesen, F., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–2221 (2007).
20. Zhang, Y., Hagedorn, C. & Wang, L. Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 893–908 (2011).
21. Trauner, M. & Boyer, J. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* **83**, 633–671 (2003).
22. Soroka, C. & Boyer, J. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: Therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol. Aspects Med.* **37**, 3–14 (2014).
23. Steri, R. *et al.* Antidiabetic sulfonylureas modulate farnesoid X receptor activation and target gene transcription. *Future Med. Chem.* **2**, 575–586 (2010).
24. 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.* **83**, 1674–1681 (2012).
25. Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D. & Suchy, F. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 28857–65 (2001).
26. 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* **1771**, 864–872 (2007).

## Acknowledgements

The FXR-LBD protein was a generous gift from Dr. Krister Bamberg, AstraZeneca R&D Mölndal, Sweden.

## Author Contributions

J.S. and D.M. did the reporter gene assays; J.S. and D.M. did the toxicity assays; F.K. and D.M. did the thermal shift assays; J.S. and F.K. did the western blot; E.P., D.S., M.S.Z. and D.M. interpreted the data and supervised the work; D.M. initiated the project; D.M. prepared the figures and wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

**Competing financial interests:** The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Schmidt, J. *et al.* NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **5**, 14782; doi: 10.1038/srep14782 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

## 11.2 Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators (*Journal of Medicinal Chemistry*)

Flesch, D., Cheung, S.-Y., Schmidt, J.\*, Gabler, M., Heitel, P., Kramer, J., Kaiser, A., Hartmann, M., Lindner, M., Lüddens-Dämgen, K., Heering, J., Lamers, C., Lüddens, H., Wurglics, M., Proschak, E., Schubert-Zsilavecz, M. & Merk, D. (2017). Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (16), 7199–7205.

\*Hier liegt eine geteilte Erstauthorenschaft zwischen DF, S-YC und JS vor

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00903

Link: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.7b00903>

*Reproduced with permission from* Flesch, D., Cheung, S.-Y., Schmidt, J.\*, Gabler, M., Heitel, P., Kramer, J., Kaiser, A., Hartmann, M., Lindner, M., Lüddens-Dämgen, K., Heering, J., Lamers, C., Lüddens, H., Wurglics, M., Proschak, E., Schubert-Zsilavecz, M. & Merk, D. *Journal of Medicinal Chemistry* 2017, 60 (16), 7199–7205. Copyright 2017 American Chemical Society.

## Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators

Daniel Flesch,<sup>†,||</sup> Sun-Yee Cheung,<sup>†,||</sup> Jurema Schmidt,<sup>†,||</sup> Matthias Gabler,<sup>†</sup> Pascal Heitel,<sup>†</sup> Jan Kramer,<sup>†</sup> Astrid Kaiser,<sup>†</sup> Markus Hartmann,<sup>†</sup> Mara Lindner,<sup>§</sup> Kerstin Lüddens-Dämgen,<sup>‡</sup> Jan Heering,<sup>§</sup> Christina Lamers,<sup>†</sup> Hartmut Lüddens,<sup>‡</sup> Mario Wurglics,<sup>†</sup> Ewgenij Proschak,<sup>†,||</sup> Manfred Schubert-Zsilavecz,<sup>†</sup> and Daniel Merk<sup>\*,†,||</sup>

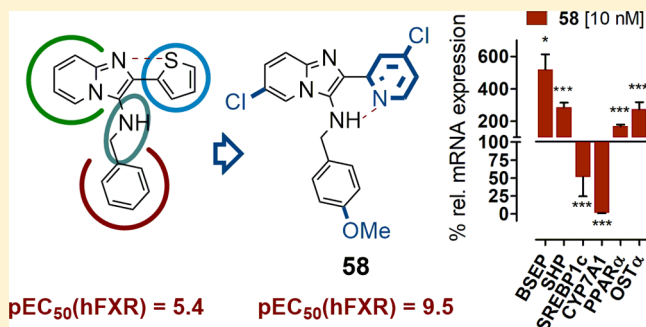
<sup>†</sup>Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 9, D-60438 Frankfurt am Main, Germany

<sup>‡</sup>Department of Psychiatry and Psychotherapy, University Medical Center Mainz, D-55131 Mainz, Germany

<sup>§</sup>Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt am Main, Germany

### **S** Supporting Information

**ABSTRACT:** As a cellular bile acid sensor, farnesoid X receptor (FXR) participates in regulation of bile acid, lipid and glucose homeostasis, and liver protection. Clinical results have validated FXR as therapeutic target in hepatic and metabolic diseases. To date, potent FXR agonists share a negatively ionizable function that might compromise their pharmacokinetic distribution and behavior. Here we report the development and characterization of a high-affinity FXR modulator not comprising an acidic residue.



The nuclear farnesoid X receptor (FXR) acts as ligand-activated transcription factor, sensing bile acids and regulating their synthesis, metabolism, secretion and reuptake.<sup>1–3</sup> Moreover, the receptor is involved in glucose and lipid metabolism, and bile acids are increasingly being considered as signaling molecules of whole body energy homeostasis.<sup>3</sup> Therefore, pharmacological FXR modulation by agonistic, antagonistic, or gene-selective ligands appears to possess extraordinary therapeutic value. FXR agonists are intensively evaluated in clinical trials for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) with the steroidal candidate obeticholic acid (**1a**) that was recently approved for primary biliary cholangitis leading the pipeline.<sup>4</sup> Its clinical development has revealed antidiabetic and weight-lowering effects<sup>4,5</sup> which led to initiation of a variety of trials with **1a** for metabolic diseases. In addition, preclinical data also point to a versatile role of FXR in inflammation and possible future indications in this field.<sup>6–9</sup>

Medicinal chemistry approaches have yielded a variety of synthetic FXR ligands (Chart 1) to exploit the receptor's pharmacological potential.<sup>10,11</sup> Derived from the physiological agonist chenodeoxycholic acid (**1**, CDCA,  $EC_{50} = 8 \mu M$ ), highly potent steroidal FXR agonists such as **1a** and **1b** have been developed.<sup>12,13</sup> In addition, there are nonsteroidal FXR agonists such as **2a–d** and **3**. The isoxazole GW4064 (**2a**)<sup>14</sup> is widely used as reference FXR agonist. However, several synthetic FXR agonists are biased by toxicity, poor solubility, or insufficient selectivity.<sup>15–19</sup>

To date, potent nonsteroidal FXR agonists constitute carboxylic acids or contain an ester moiety that is rapidly

hydrolyzed in vivo. Among steroidal FXR ligands, some nonacidic bile alcohols have been identified as FXR agonists but few demonstrate low micromolar potency.<sup>20,21</sup> An exception is **1c** with  $0.15 \mu M$  potency, but its urethane moiety seems unfavorable for further development.<sup>22</sup> **3** ( $EC_{50} = 0.3 \mu M$ )<sup>23</sup> constitutes the most potent nonsteroidal, nonacidic FXR agonist thus far.

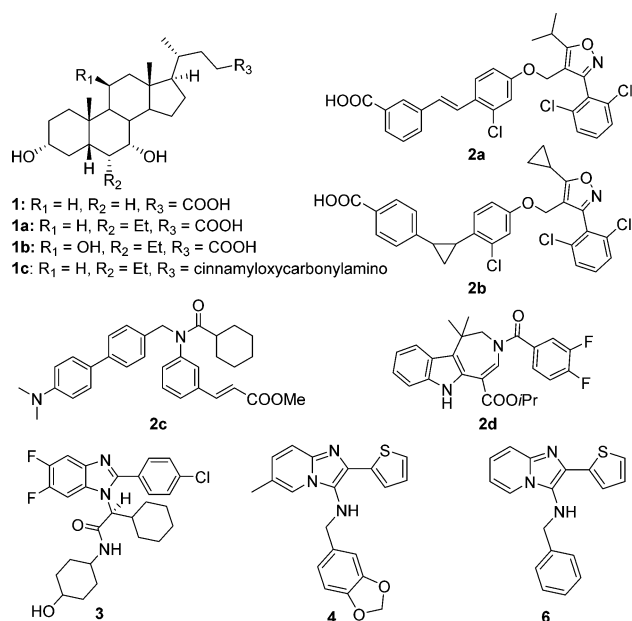
The wide presence of a carboxylic acid moiety among FXR ligands might in part explain their limited specificity since acidic compounds tend to promiscuously interact with various fatty acid binding targets, particularly nuclear receptors and G-protein-coupled receptors. In addition, carboxylic acids are susceptible to rapid metabolic conversion to glucuronides which in turn may hold toxicity potential. Glucuronides and reactive thioester acyl-CoA intermediates formed in the glucuronidation process constitute highly reactive metabolites prone to unspecific reactions and considerable liver toxicity.<sup>24</sup> A nonacidic FXR activator would avoid these potential reasons for unselective toxicity, and therefore, we intended to develop a nonsteroidal FXR modulator without acidic moiety.

We engaged on **4** as lead structure which was identified as FXR modulator with an  $EC_{50}$  of 480 nM in a computational approach.<sup>25</sup> Preliminary structure–activity relationship (SAR) data<sup>25</sup> suggested that replacement of the lipophilic benzodioxole moiety in **4** by a simple benzene ring in **5** was possible.

Received: June 19, 2017

Published: July 27, 2017

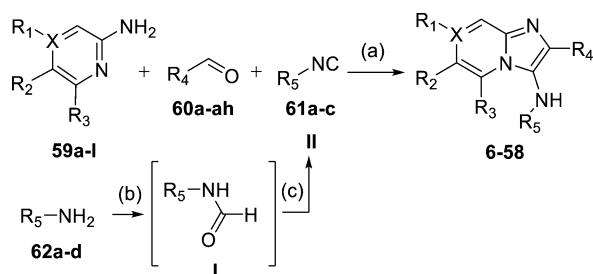
**Chart 1. FXR Ligands: Endogenous FXR Agonist CDCA (1) and Semisynthetic Derivatives 1a–c, Nonsteroidal FXR Agonists 2a–d and Partial Agonist 3, Lead Structure 4, and Minimal Lead Pharmacophore 6**



Moreover, the substitution pattern at the pyridine core structure had remarkable impact on activity. On the basis of these considerations, we prepared the unsubstituted benzyl derivative **6**, which revealed an EC<sub>50</sub> of 4.0 ± 0.8 μM for FXR activation and was selected as lead pharmacophore for a systematic SAR study.

Imidazo[1,2-*a*]pyridines **6–10** and **12–58** and imidazo[1,2-*a*]pyrazine **11** were prepared in a Groebke–Blackburn three-component reaction<sup>26,27</sup> (Scheme 1). To study the structure–

**Scheme 1. Preparation of Imidazo[1,2-*a*]pyridines 6–10 and 12–58 and Imidazo[1,2-*a*]pyrazine 11 in a Multicomponent Groebke–Blackburn Reaction<sup>a</sup>**



<sup>a</sup>(a) MeOH, AcOH, rt, 17–48 h; (b) ethyl formate, neat, reflux, 3 h; (c) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, PPh<sub>3</sub>, CCl<sub>4</sub>, NEt<sub>3</sub>, reflux, 4 h.

activity relationships (SAR) of the compound class on FXR, we introduced a broad range of structural variations in all parts of the template by changing 2-aminopyridine (**59a–l**), aldehyde (**60a–ah**), or isocyanide (**61a–c**) building block of the multicomponent reaction. The reaction was handled in a one-pot procedure in dry methanol under acidic catalysis. Due to limited commercial availability of the isocyanide component, we also employed a method for in situ isocyanide generation from the respective amines (**62a–d**) and imidazo[1,2-*a*]pyridine formation in one pot.<sup>28</sup> In this procedure, primary

amines **62a–d** were refluxed in ethyl formate for 3 h to form *N*-formamides as intermediates (**I**). Subsequently, the mixture was diluted with methylene chloride and triphenylphosphine, and tetrachloromethane and triethylamine were added to dehydrate the intermediate *N*-formamides to isocyanides (**II**) in 4 h under reflux. After formation of the isocyanide, 2-aminopyridine and aldehyde as well as methanol and acetic acid were added, and the mixture was stirred for 48 h to generate the desired imidazo[1,2-*a*]pyridines in sufficient yields (7–29%).

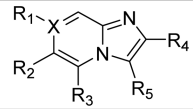
Imidazo[1,2-*a*]pyridines **6–10** and **12–58** and imidazo[1,2-*a*]pyrazine **11** (Table 1) were characterized in a full-length FXR transactivation assay in HeLa cells with an inducible firefly luciferase under control of the FXR response element from bile salt export protein (BSEP). The receptors hFXR, hRXR and a renilla luciferase for normalization and toxicity control were constitutively expressed. Maximum relative FXR activation of the tested compounds refers to the transactivation of **2a** at 3 μM defined as 100%. Assay validation with various reference agonists yielded results in good agreement with literature.<sup>29</sup>

As first step of our SAR studies, we investigated the substitution pattern of the imidazopyridine core. As reported by Achenbach et al.,<sup>25</sup> methylation in 7-position (**5**) had little influence on the activity. In contrast, an additional methyl group in 6-position (**7**) improved potency markedly 8-fold whereas methylation in 5-position (**8**) caused inactivity. To exploit potential optimization by substituents in 7-position, we introduced a lipophilic ethyl residue (**9**) and a polar carboxylic acid moiety (**10**), but neither modification was accompanied by a significant improvement in potency. Also an additional nitrogen atom in 7-position of the ring system (**11**) was not tolerated and only the 6-position seemed to offer potential for further optimization. Hence, we studied various residues in this position (**12–17**). Among halogens (**12–15**), only chlorine (**13**) improved activity, while a 6-methoxy substituent (**16**) slightly diminished potency and a 6-phenyl substituent (**17**) produced a moderate improvement.

Using **7** as lead, we then studied the SAR of the benzylamino residue in 3-position. Side chain elongation up to a butyl spacer (**18–20**) was tolerated, but only phenylpropyl derivative **19** displayed a 2-fold improvement, and even replacing the benzylamino moiety of **7** by a benzyl residue (**21**) had little impact on potency. Methylation in benzylic position of **7** leading to enantiomers (*R*)-**22** and (*S*)-**22** diminished activity 6-fold and 2-fold, respectively, consistent with a preference for the latter stereoisomer. A 4-methyl (**23**) and a 4-methoxy moiety (**24**) on the substituent's aromatic ring slightly promoted FXR agonistic activity, suggesting further optimization may be possible with other suitable substituents of the aryl moiety.

Next, we addressed the SAR of the thiophene ring in 2-position of the imidazopyridine scaffold. Thiophene (**7**) replacement by phenyl (**25**) was accompanied by a slight increase in potency whereas the saturated cyclohexyl derivative **26** was inactive underlining the necessity of an aromatic residue in this position. Methylation of the newly introduced phenyl residue was tolerated in 2-position (**27**) and slightly enhanced potency in 3- (**28**) and 4-position (**29**), suggesting the possibility of further optimization with suitable substituents especially in 4-position.

Accordingly, 4-biphenyl derivative **30** was significantly more potent. In contrast, a 2-naphthyl moiety (**31**) mimicking 3,4-disubstitution failed to increase the activity. Replacement of the phenyl residue (**25**) by a benzyl substituent (**32**) was not

Table 1. Structure–Activity Relationship of Imidazo[1,2-*a*]pyridines 4–10 and 12–58 and Imidazo[1,2-*a*]pyrazine 11 on FXR<sup>a</sup>


#	X	R1	R2	R3	R4	R5	hFXR (mean ± SEM; n ≥ 3)	
							EC50 [μM]	max. rel. act. [%]
4	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	benzo[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-ylmethylamino	0.48 <sup>25</sup>	16 ± 1 <sup>25</sup>
5	C	-CH3	-H	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	16.2 ± 2.4% @ 30 μM <sup>25</sup>	
6	C	-H	-H	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	4.0 ± 0.8	14 ± 1
7	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	0.54 ± 0.08	15 ± 1
8	C	-H	-H	-CH3	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	inactive	
9	C	-Et	-H	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	1.2 ± 0.3	16 ± 1
10	C	-COOH	-H	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	inactive	
11	N	-	-H	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	inactive	
12	C	-H	-F	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	inactive	
13	C	-H	-Cl	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	0.16 ± 0.01	26 ± 1
14	C	-H	-Br	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	0.50 ± 0.04	14 ± 1
15	C	-H	-CF3	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	0.46 ± 0.01	14 ± 1
16	C	-H	-OMe	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	0.83 ± 0.15	18 ± 1
17	C	-H	-Ph	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2Ph	0.20 ± 0.06	17 ± 1
18	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-NH(CH2)2Ph	1.0 ± 0.2	12 ± 1
19	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-NH(CH2)3Ph	0.23 ± 0.09	18 ± 1
20	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-NH(CH2)4Ph	0.75 ± 0.17	17 ± 1
21	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-CH2Ph	0.81 ± 0.13	12 ± 1
( <i>R</i> )-22	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	( <i>R</i> )-NHCH(CH3)Ph	3.2 ± 0.5	14 ± 1
( <i>S</i> )-22	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	( <i>S</i> )-NHCH(CH3)Ph	1.3 ± 0.3	12 ± 1
23	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2(4-Me-Ph)	0.22 ± 0.03	14 ± 1
24	C	-H	-CH3	-H	thiophen-2-yl	-NHCH2(4-MeO-Ph)	0.17 ± 0.05	14 ± 1
25	C	-H	-CH3	-H	-Ph	-NHCH2Ph	0.28 ± 0.01	16 ± 1
26	C	-H	-CH3	-H	cyclohexyl	-NHCH2Ph	inactive	
27	C	-H	-CH3	-H	-(2-Me-Ph)	-NHCH2Ph	0.26 ± 0.02	35 ± 1
28	C	-H	-CH3	-H	-(3-Me-Ph)	-NHCH2Ph	0.18 ± 0.05	14 ± 1
29	C	-H	-CH3	-H	-(4-Me-Ph)	-NHCH2Ph	0.13 ± 0.03	14 ± 1
30	C	-H	-CH3	-H	-(4-Ph-Ph)	-NHCH2Ph	0.081 ± 0.011	17 ± 1
31	C	-H	-CH3	-H	2-naphthyl	-NHCH2Ph	0.21 ± 0.01	18 ± 1
32	C	-H	-CH3	-H	-CH2Ph	-NHCH2Ph	inactive	
33	C	-H	-CH3	-H	-(CH2)2Ph	-NHCH2Ph	0.31 ± 0.06	12 ± 1
34	C	-H	-CH3	-H	-CH=CH-Ph	-NHCH2Ph	1.16 ± 0.44	13 ± 1
35	C	-H	-CH3	-H	-(3-MeO-Ph)	-NHCH2Ph	0.25 ± 0.05	16 ± 1
36	C	-H	-CH3	-H	-(4-MeO-Ph)	-NHCH2Ph	1.27 ± 0.18	16 ± 1
37	C	-H	-CH3	-H	-(3,4-(MeO)2-Ph)	-NHCH2Ph	0.91 ± 0.17	16 ± 1
38	C	-H	-CH3	-H	2,3-dihydro-1,4-benzodioxan-6-yl	-NHCH2Ph	0.17 ± 0.04	15 ± 1
39	C	-H	-CH3	-H	-(4-Cl-Ph)	-NHCH2Ph	0.24 ± 0.04	14 ± 1
40	C	-H	-CH3	-H	-(4-F-Ph)	-NHCH2Ph	0.17 ± 0.02	21 ± 1
41	C	-H	-CH3	-H	-(4-Br-Ph)	-NHCH2Ph	0.43 ± 0.05	14 ± 1
42	C	-H	-CH3	-H	-(3-Cl-Ph)	-NHCH2Ph	0.016 ± 0.009	20 ± 1
43	C	-H	-CH3	-H	-(2-Cl-Ph)	-NHCH2Ph	inactive	
44	C	-H	-CH3	-H	-(3,4-Cl2-Ph)	-NHCH2Ph	0.024 ± 0.003	19 ± 1
45	C	-H	-CH3	-H	-(3-Cl-4-F-Ph)	-NHCH2Ph	0.026 ± 0.002	54 ± 1
46	C	-H	-CH3	-H	furan-2-yl	-NHCH2Ph	0.56 ± 0.05	17 ± 1
47	C	-H	-CH3	-H	thiophen-3-yl	-NHCH2Ph	0.83 ± 0.14	17 ± 1
48	C	-H	-CH3	-H	furan-3-yl	-NHCH2Ph	1.9 ± 0.5	16 ± 1
49	C	-H	-CH3	-H	<i>N</i> -Me-2-pyrrol-2-yl	-NHCH2Ph	1.1 ± 0.3	17 ± 1
50	C	-H	-CH3	-H	4-Me-1,3-thiazol-2-yl	-NHCH2Ph	0.22 ± 0.03	19 ± 1
51	C	-H	-CH3	-H	4-pyridyl	-NHCH2Ph	2.0 ± 0.2	15 ± 1
52	C	-H	-CH3	-H	3-pyridyl	-NHCH2Ph	0.52 ± 0.10	17 ± 1
53	C	-H	-CH3	-H	2-pyridyl	-NHCH2Ph	0.020 ± 0.007	19 ± 1
54	C	-H	-CH3	-H	2-pyrazinyl	-NHCH2Ph	1.2 ± 0.3	18 ± 1
55	C	-H	-CH3	-H	6-Cl-2-pyridyl	-NHCH2Ph	0.080 ± 0.001	31 ± 1
56	C	-H	-CH3	-H	4-Cl-2-pyridyl	-NHCH2Ph	0.0015 ± 0.0007	27 ± 1
57	C	-H	-CH3	-H	5-Cl-2-pyridyl	-NHCH2Ph	0.0074 ± 0.0008	46 ± 1
58	C	-H	-Cl	-H	4-Cl-2-pyridyl	-NHCH2(4-MeO-Ph)	0.00030 ± 0.00001	23 ± 1

<sup>a</sup>Maximum relative activation corresponds to the activity of 2a at 3 μM which was defined as 100%.



tolerated, while further elongation to a phenethyl moiety (33) retained the potency. The less flexible cinnamyl substituent in 34 was not favored.

This preliminary SAR evaluation of the 2-substituent revealed a phenyl residue (25) as very favorable and indicated optimization potential in 3- and 4-substituents of this ring. Thus, we studied the substitution pattern in more detail. In contrast to 3- and 4-methyl residues (28, 29), methoxy groups (35, 36, 37) failed to enhance potency and 4-methoxy derivative 36 and 3,4-dimethoxy derivative 37 displayed markedly diminished activity. This loss of potency was not observed for dihydrobenzodioxine 38 which was slightly more active than 25. Introduction of chlorine in 4-position (39) was tolerated and a smaller 4-fluorine substituent (40) was slightly more favored while the larger 4-bromine residue (41) reduced activity. A 3-chlorine substituent (42) remarkably enhanced potency to a low double-digit nanomolar  $EC_{50}$ , while 2-chloro-derivative 43 was inactive and 3,4-dichlorophenyl (44) and 3-chloro-4-fluorophenyl derivative (45) revealed about equal potency as 42 but no further improvement.

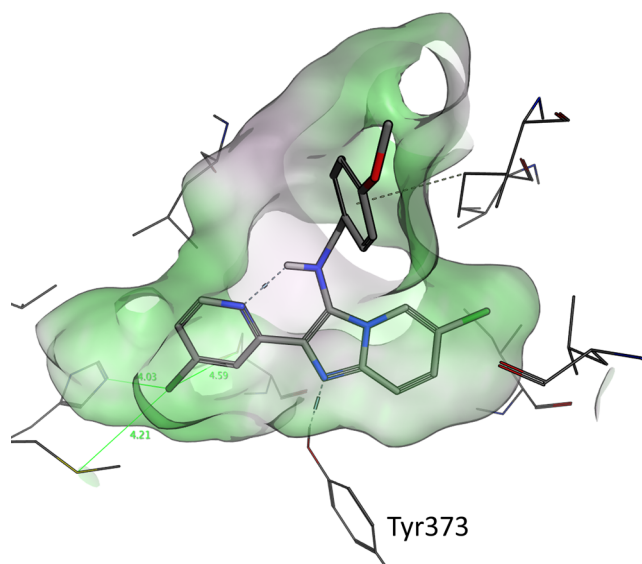
Finally, we studied heterocycles as imidazopyridine-2-substituents. The 2-thienyl residue of 7 could be replaced by a 2-furyl moiety (46) without loss of potency. In contrast, 3-thienyl (47), 3-furyl (48), and *N*-methyl-2-pyrrolyl derivative 49 exhibited lower activity. Introduction of a nitrogen in thiazole 50 enhanced the potency compared to 7 roughly 2-fold. Pyridine residues generated much more pronounced effects. 4-Pyridine derivative 51 significantly lost potency, while 3-pyridine 52 was slightly less potent than 25. Introduction of a 2-pyridyl residue (53) robustly increased the activity more than 10-fold, but this effect was lost in 2-pyrazine derivative 54.

In summary, we identified several distinct structural modifications that each remarkably increased potency of the imidazopyridine derivatives to intermediate nanomolar  $EC_{50}$  values and potentially could be combined in one optimized compound. In particular, a 3-chlorophenyl residue (42) and a 2-pyridyl substituent (53) caused strong improvements in potency. Both modifications were compatible for combination but resulted in two possible isomers due to the rotatable bond between the imidazopyridine scaffold and its 2-substituent. Consequently, we combined the structural elements of 42 and 53 in 6-chloropyridyl derivative 55 and 4-chloropyridyl isomer 56. 5-Chloropyridyl derivative 57 was characterized as well. 55–57 significantly differed in potency on FXR with 4-chloro-2-pyridyl derivative 56 as most potent isomer.

As a final optimization step, we combined our SAR knowledge on the three building blocks of the imidazopyridine scaffold. As 5-substituent, chlorine (13) had turned out to be superior to a methyl residue, while in 3-position, the 4-methoxybenzylamino moiety (24) was favored, and finally extensive SAR studies on the 2-substituent had discovered the 4-chloro-2-pyridyl residue (56) as highly optimized building block. These structural variations were combined in one molecule 58 as extensively optimized and highly potent nonacidic FXR modulator. 58 activated FXR with a subnanomolar  $EC_{50}$  ( $0.30 \pm 0.01$  nM) but with lower efficacy than reference FXR agonists such as 1, 1a, and 2a (Supporting Information Figure 1 for comparison). Isothermal titration calorimetry (ITC, Supporting Information Figure 2) revealed a  $K_d$  of 37 nM for FXR binding which is predominantly driven by entropic contributions ( $\Delta S = 98$  J/(mol·K)) with a moderate enthalpic share ( $\Delta H = -13$  J/mol) equivalent to one hydrogen bond. The discrepancy between cellular  $EC_{50}$  and  $K_d$  is best

explained by the absence of coactivators in the ITC measurement that can affect the binding equilibrium.

Molecular docking (Figure 1) of 58 into the FXR ligand binding domain (LBD) revealed only one H-bond between



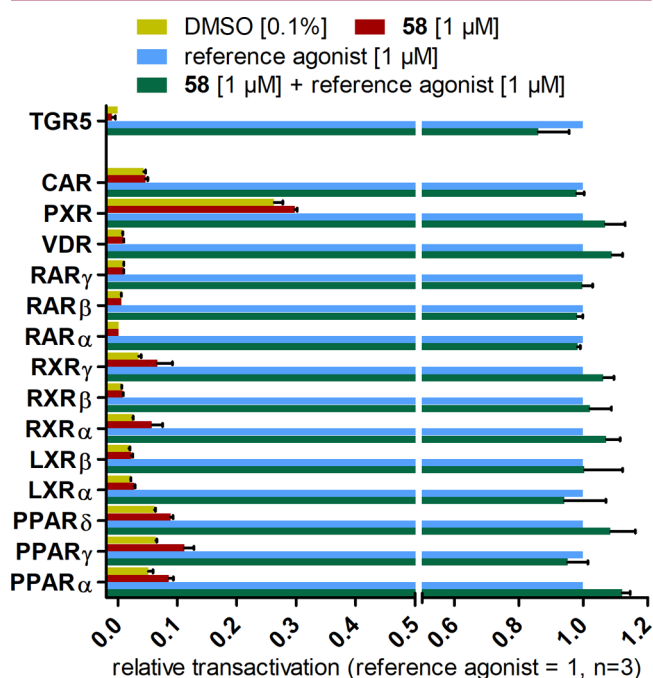
**Figure 1.** Molecular docking of 58 into the FXR-LBD (PDB code 3OKI) indicates a single H-bond between imidazopyridin-N1 and Tyr373 of the FXR-LBD, and binding seems particularly mediated by lipophilic contacts. An intramolecular H-bond between pyridine and amine moiety stabilizes an optimal conformation of 58 for binding to FXR.

imidazopyridin-N1 and the hydroxyl group of Tyr373, which agrees with the ITC data. Compared to the binding mode of 1 forming an H-bond toward Tyr373, 58 lacks polar contacts toward Tyr365 and His451, which were shown to be crucial for helix 12 stabilization,<sup>30</sup> thus explaining the lower activation efficacy of 58 (Supporting Information Figure 3). Additionally, the side chain amino residue of 58 participates in an intramolecular H-bond with the lone pair of the 2-pyridyl moiety in 2-position. This intramolecular H-bond was confirmed by QM-based energy minimization (Supporting Information Figure 4). In contrast, QM-based energy minimization of 24 only differing from 58 by the 2-thiophen-2-yl residue revealed an interaction between sulfur and the lone pair of the imidazopyridine core as described by Beno et al.<sup>31</sup> that might weaken the H-bond toward Tyr373 and explain the lower potency of 24.

Preliminary ADME characterization of 58 revealed a favorable  $\log D_{7.4}$  of 1.69 (1, 0.53; 1a, 0.81; 2a, 1.01) and an aqueous solubility of 63.7 ng/mL. A WST-1 (water-soluble tetrazolium) assay in HepG2 cells showed no cytotoxic effect up to 100  $\mu$ M. In contrast, acidic FXR agonists 1a and 2a exhibited toxicity at 50  $\mu$ M (Supporting Information Figure 5). Metabolism studies in HepG2 cells indicated acceptable stability of 58 with a half-life of approximately 1.5–2.0 h and 12% remaining compound after 24 h (Supporting Information Figure 6).

To evaluate selectivity among related receptors, 58 was assayed for agonistic and antagonistic activity on membrane bile acid receptor TGR5 and peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR), liver X receptors (LXR), retinoid X receptors (RXR), retinoic acid receptors (RAR), vitamin D

receptor (VDR), pregnane X receptor (PXR), and constitutive androstane receptor (CAR). **58** proved highly selective among nuclear receptors and TGR5 with no agonistic or antagonistic activity at 1  $\mu$ M corresponding to at least 3000-fold selectivity (Figure 2).

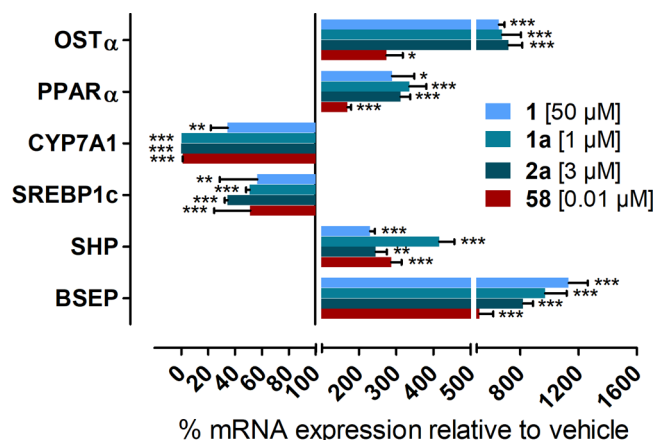


**Figure 2.** Selectivity screening of **58** on 14 nuclear receptors and membrane bile acid receptor TGR5 revealed no agonistic or antagonistic activity at 1  $\mu$ M ( $n = 3$ ).

For structural similarity of **6–58** with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor agonist zolpidem (Supporting Information Figure 7) possessing the same imidazo[1,2-*a*]pyridine scaffold, cross-reactivity had to be considered. However, zolpidem neither activated nor competitively antagonized FXR in our full length FXR reporter gene assay up to 10  $\mu$ M and **53** up to 10  $\mu$ M did not bind to GABA<sub>A</sub> in a radio ligand binding assay. Thus, replacement of the dimethylamide in zolpidem by the benzylamine residue in **6–58** seems to prevent cross-reactivity on GABA<sub>A</sub> receptors.

To study FXR modulation by **58** in a less artificial setting, we incubated hepatocarcinoma cells (HepG2) with **58** and quantified FXR target gene expression on mRNA level by qRT-PCR (Figure 3).<sup>29,32</sup> **58** at 10 nM induced direct FXR target genes bile salt export protein (BSEP), small heterodimer partner (SHP), organic solute transporter  $\alpha$  (OST $\alpha$ ), and PPAR $\alpha$ , while indirect FXR target genes cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase (CYP7A1) and sterol-regulatory element binding protein 1c (SREBP1c) were repressed confirming FXR activation. Compared to reference agonists **1**, **1a**, and **2a**, **58** tends to have a lower efficacy in target gene modulation. In agreement with the results of the reporter gene assay relying on the FXR response element from the BSEP promoter, especially BSEP and OST $\alpha$  were less induced by **58** than by **1**, **1a**, and **2a**. Still, the gene expression profile of **58** resembles that of reference FXR agonists and revealed no gene selectivity.

As cellular bile acid sensor, FXR accommodates bipolar ligands with an acidic functionality and a lipophilic backbone similar to the common structure of its natural bile acid



**Figure 3.** **58** at a concentration of 10 nM induced the expression of FXR target genes BSEP, SHP, OST $\alpha$ , and PPAR $\alpha$  and repressed indirect target genes CYP7A1 and SREBP1c ( $n = 3$ ; (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

ligands.<sup>33</sup> Accordingly, synthetic FXR ligands share this characteristic containing a negative charge at physiological pH and typically forming a neutralizing contact between their acidic function and Arg335 of FXR. However, acidic compounds often encounter ADME issues such as high plasma protein binding and metabolic formation of toxic intermediates.<sup>54</sup> Here we show that high affinity binding to and activation of FXR are also feasible with nonacidic compounds which might be superior for some therapeutic demands and help to reach body compartments not accessible to acidic compounds. This might enable development of CNS-bioavailable FXR modulators to study the receptor's role, for example, in multiple sclerosis.<sup>9</sup>

Starting from the moderately potent lead **6**, we systematically studied the structure–activity relationships of all parts of the molecular scaffold and identified specific positions for optimization. Remarkable improvement in potency was achieved by exploiting a potential intramolecular H-bond through introduction of 2-pyridyl substituents and a concluding recombination of all favorable modifications. The resulting nonacidic FXR modulator **58** possesses subnanomolar potency and extraordinary selectivity for FXR over nuclear receptors and the membrane bile acid receptor TGR5. Moreover, the lack of an acidic moiety can also help to preserve specificity over the wide variety of other targets of fatty acid mimetics.<sup>34</sup> **58** robustly modulates FXR target gene expression at a concentration as low as 10 nM in HepG2 cells with lower efficacy compared to FXR agonists **1**, **1a**, and **2a**. Thus, with its low toxicity and favorable ADME properties, **58** seems well suitable for further development.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemistry. General.** All target compounds had a purity of  $\geq 95\%$  determined by elemental analysis.

**6-Chloro-2-(4-chloropyridin-2-yl)-N-(4-methoxybenzyl)-imidazo[1,2-*a*]pyridin-3-amine (58).** 4-Methoxybenzylamine (0.55 g, 4.0 mmol, 1.0 equiv) was refluxed in ethyl formate (355 mg, 4.4 mmol, 1.1 equiv) for 3 h. The volatile reaction products were evaporated, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL), PPh<sub>3</sub> (1.26 g, 4.8 mmol, 1.2 equiv), NEt<sub>3</sub> (405 mg, 4.0 mmol, 1.0 equiv), and CCl<sub>4</sub> (615 mg, 4.0 mmol, 1.0 equiv) were added, and the mixture was refluxed for 4 h. After cooling to rt, methanol (abs, 10 mL), 2-amino-4-chloropyridine (0.26 g, 2.0 mmol, 0.5 equiv), 4-chloropyridine-2-carbaldehyde (0.28 g, 2.0 mmol, 0.5 equiv), and glacial acetic acid (360 mg, 6.0 mmol, 1.5 equiv) were

added, and the mixture was stirred at rt for 48 h. Solvents were evaporated, and the crude product was purified by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 10:1 to 1:1).<sup>28</sup> Yield: 234 mg, 29%. Yellow solid. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.69 (s, 3H), 4.30 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 6.38 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.24–7.16 (m, 3H), 7.54 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H) ppm. <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 49.53, 54.97, 113.57, 118.22, 119.26, 121.21, 121.36, 124.69, 129.33, 131.15, 131.88, 136.77, 147.10, 152.60, 158.40 ppm. MS (ESI+): *m/z* = 399.06 [M + H]<sup>+</sup>, 421.02 [M + Na]<sup>+</sup>. Elemental analysis calcd (%): C 60.16, H 4.04, N 14.03. Found: C 60.07, H 4.31, N 14.20.

**Pan Assay Interference Compounds.** The activity of **58** was determined in a reporter gene assay and confirmed by gene expression analysis (qRT-PCR) and by isothermal titration calorimetry (ITC) and is not an artifact.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00903.

General procedures, preparation, and analytical data of compounds 6–57, methods for in vitro characterization, and supporting figures (PDF)

Molecular formula strings and some data (CSV)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +49 69 79829327. E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de.

### ORCID

Ewgenij Proschak: 0000-0003-1961-1859

Daniel Merk: 0000-0002-5359-8128

### Author Contributions

<sup>†</sup>D.F., S.-Y.C., and J.S. contributed equally.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The FXR-LBD protein was a generous gift from Dr. Krister Bamberg, AstraZeneca R&D, Mölndal, Sweden. D.F. and P.H. gratefully acknowledge financial support by the Else-Kroener-Fresenius-Foundation at the graduate school “Translational Research Innovation—Pharma (TRIP)”. This research was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; Sachbeihilfe PR 1405/2-2; Heisenberg-Professur PR 1405/4-1; SFB 1039 Teilprojekt A07).

## ■ ABBREVIATIONS USED

BSEP, bile salt export protein; CAR, constitutive androstane receptor; CYP7A1, cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase; FXR, farnesoid X receptor; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; LXR, liver X receptor; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; OST, organic solute transporter; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PXR, pregnane X receptor; RAR, retinoic acid receptor; RXR, retinoid X receptor; SHP, small heterodimer partner; SREBP, sterol-regulatory element binding protein; VDR, vitamin D receptor

## ■ REFERENCES

- (1) 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.
- (2) Halilbasic, E.; Claudel, T.; Trauner, M. Bile Acid Transporters and Regulatory Nuclear Receptors in the Liver and beyond. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 155–168.
- (3) Modica, S.; Gadaleta, R. M.; Moschetta, A. Deciphering the Nuclear Bile Acid Receptor FXR Paradigm. *Nucl. Recept. Signaling* **2010**, *8*, e005.
- (4) Neuschwander-Tetri, B. A.; Loomba, R.; Sanyal, A. J.; Lavine, J. E.; Van Natta, M. L.; Abdelmalek, M. F.; Chalasani, N.; Dasarthy, S.; Diehl, A. M.; Hameed, B.; Kowdley, K. V.; McCullough, A.; Terrault, N.; Clark, J. M.; Tonascia, J.; Brunt, E. M.; Kleiner, D. E.; Doo, E. Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* **2015**, *385*, 956–965.
- (5) Mudaliar, S.; Henry, R. R.; Sanyal, A. J.; Morrow, L.; Marschall, H. U.; Kipnes, M.; Adorini, L.; Sciacca, C. I.; Clopton, P.; Castelloe, E.; Dillon, P.; Pruzanski, M.; Shapiro, D. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients with Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2013**, *145*, 574–582.
- (6) Hollman, D. a a; Milona, A.; Van Erpecum, K. J.; Van Mil, S. W. C. Anti-Inflammatory and Metabolic Actions of FXR: Insights into Molecular Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2012**, *1821*, 1443–1452.
- (7) Lamers, C.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Medicinal Chemistry and Pharmacological Effects of Farnesoid X Receptor (FXR) Antagonists. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2188–2205.
- (8) Wang, Y.-D.; Chen, W.-D.; Wang, M.; Yu, D.; Forman, B. M.; Huang, W. Farnesoid X Receptor Antagonizes Nuclear Factor kappaB in Hepatic Inflammatory Response. *Hepatology* **2008**, *48*, 1632–1643.
- (9) Ho, P. P.; Steinman, L. Obeticholic Acid, a Synthetic Bile Acid Agonist of the Farnesoid X Receptor, Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 1600–1605.
- (10) Merk, D.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M. Medicinal Chemistry of Farnesoid X Receptor Ligands: From Agonists and Antagonists to Modulators. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 1015–1036.
- (11) Xu, Y. Recent Progress on Bile Acid Receptor Modulators for Treatment of Metabolic Diseases. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6553–6579.
- (12) Pellicciari, R.; Passeri, D.; De Franco, F.; Mostarda, S.; Filippini, P.; Colliva, C.; Gadaleta, R. M.; Franco, P.; Carotti, A.; Macchiarulo, A.; Roda, A.; Moschetta, A.; Gioiello, A. Discovery of 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,11 $\beta$ -Trihydroxy-6 $\alpha$ -Ethyl-5 $\beta$ -Cholan-24-Oic Acid (TC-100), a Novel Bile Acid as Potent and Highly Selective FXR Agonist for Enteropathic Disorders. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9201–9214.
- (13) 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.
- (14) Maloney, P. R.; Parks, D. J.; Haffner, C. D.; Fivush, a. M.; Chandra, G.; Plunket, K. D.; Creech, K. L.; Moore, L. B.; Wilson, J. G.; Lewis, M. C.; Jones, S. a.; Willson, T. M. Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2971–2974.
- (15) 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.
- (16) 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.
- (17) Akwabi-Ameyaw, A.; Bass, J. Y.; Caldwell, R. D.; Caravella, J. a.; Chen, L.; Creech, K. L.; Deaton, D. N.; Jones, S. a.; Kaldor, I.; Liu, Y.;



Madauss, K. P.; Marr, H. B.; McFadyen, R. B.; Miller, A. B.; Iii, F. N.; Parks, D. J.; Spearing, P. K.; Todd, D.; Williams, S. P.; Wisely, G. B. Conformationally Constrained Farnesoid X Receptor (FXR) Agonists: Naphthoic Acid-Based Analogs of GW 4064. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4339–4343.

(18) Flatt, B.; Martin, R.; Wang, T. L.; Mahaney, P.; Murphy, B.; Gu, X. H.; Foster, P.; Li, J.; Pircher, P.; Petrowski, M.; Schulman, L.; Westin, S.; Wrobel, J.; Yan, G.; Bischoff, E.; Daige, C.; Mohan, R. 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.

(19) Singh, N.; Yadav, M.; Singh, A. K.; Kumar, H.; Dwivedi, S. K. D.; Mishra, J. S.; Gurjar, A.; Manhas, A.; Chandra, S.; Yadav, P. N.; Jagavelu, K.; Siddiqi, M. I.; Trivedi, A. K.; Chattopadhyay, N.; Sanyal, S. Synthetic FXR Agonist GW4064 Is a Modulator of Multiple G Protein-Coupled Receptors. *Mol. Endocrinol.* **2014**, *28*, 659–673.

(20) Sepe, V.; Festa, C.; Renga, B.; Carino, A.; Cipriani, S.; Finamore, C.; Masullo, D.; del Gaudio, F.; Monti, M. C.; Fiorucci, S.; Zampella, A. Insights on FXR Selective Modulation. Speculation on Bile Acid Chemical Space in the Discovery of Potent and Selective Agonists. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19008.

(21) Festa, C.; Renga, B.; D'Amore, C.; Sepe, V.; Finamore, C.; De Marino, S.; Carino, A.; Cipriani, S.; Monti, M. C.; Zampella, A.; Fiorucci, S. Exploitation of Cholane Scaffold for the Discovery of Potent and Selective Farnesoid X Receptor (FXR) and G-Protein Coupled Bile Acid Receptor 1 (GP-BAR1) Ligands. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8477–8495.

(22) Gioiello, A.; Macchiarulo, A.; Carotti, A.; Filipponi, P.; Costantino, G.; Rizzo, G.; Adorini, L.; Pellicciari, R. Extending SAR of Bile Acids as FXR Ligands: Discovery of 23-N-(Carbocinnamyl-oxyl)-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -Dihydroxy-6 $\alpha$ -Ethyl-24-nor-5 $\beta$ -Cholan-23-Amine. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2650–2658.

(23) Richter, H. G. F.; Benson, G. M.; Bleicher, K. H.; Blum, D.; Chaput, E.; Clemann, N.; Feng, S.; Gardes, C.; Grether, U.; Hartman, P.; Kuhn, B.; Martin, R. E.; Plancher, J. M.; Rudolph, M. G.; Schuler, F.; Taylor, S. 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*, 1134–1140.

(24) *Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET*; Smith, D. A., Ed.; RSC Drug Discovery; Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 2010.

(25) Achenbach, J.; Gabler, M.; Steri, R.; Schubert-Zsilavecz, M.; Proschak, E. Identification of Novel Farnesoid X Receptor Modulators Using a Combined Ligand- and Structure-Based Virtual Screening. *MedChemComm* **2013**, *4*, 920.

(26) Groebke, K.; Weber, L.; Mehlin, F. Synthesis of Imidazo[1,2-a]Annulated Pyridines, Pyrazines and Pyrimidines by a Novel Three-Component Condensation. *Synlett* **1998**, *1998*, 661–663.

(27) McKeown, M. R.; Shaw, D. L.; Fu, H.; Liu, S.; Xu, X.; Marineau, J. J.; Huang, Y.; Zhang, X.; Buckley, D. L.; Kadam, A.; Zhang, Z.; Blacklow, S. C.; Qi, J.; Zhang, W.; Bradner, J. E. Biased Multi-component Reactions to Develop Novel Bromodomain Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9019–9027.

(28) Flesch, D.; Schubert-Zsilavecz, M. Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines in a Sequential One-Pot Groebke-Blackburn Modification Using 2-Aminopyridines, Aldehydes and Amines. *Pharmazie* **2015**, *70*, 507–510.

(29) Merk, D.; Lamers, C.; Ahmad, K.; Gomez, R. C.; Schneider, G.; Steinhilber, D.; Schubert-zsilavecz, M. Extending the Structure–Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives As Farnesoid X Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8035–8055.

(30) Costantino, G.; Entrena-Guadix, A.; Macchiarulo, A.; Gioiello, A.; Pellicciari, R. Molecular Dynamics Simulation of the Ligand Binding Domain of Farnesoid X Receptor. Insights into Helix-12 Stability and Coactivator Peptide Stabilization in Response to Agonist Binding. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3251–3259.

(31) Beno, B. R.; Yeung, K.-S.; Bartberger, M. D.; Pennington, L. D.; Meanwell, N. A. A Survey of the Role of Noncovalent Sulfur Interactions in Drug Design. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4383–4438.

(32) Schmidt, J.; Klingler, F.-M.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac Do Not Interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14782.

(33) Gioiello, A.; Cerra, B.; Mostarda, S.; Guercini, C.; Pellicciari, R.; Macchiarulo, A. Bile Acid Derivatives as Ligands of the Farnesoid X Receptor: Molecular Determinants for Bile Acid Binding and Receptor Modulation. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2159–2174.

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

### 11.3 A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis (*Journal of Medicinal Chemistry*)

Schmidt, J., Rotter, M., Weiser, T., Wittmann, W., Weizel, L., Kaiser, A., Heering, J., Goebel, T., Angioni, C., Wurglics, M., Paulke, A., Geisslinger, G., Kahnt, A., Steinhilber, D., Proschak, E. & Merk, D. (2017). A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase to Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60 (18), 7703-7724.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00398

Link: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.7b00398>

*Reproduced with permission from Schmidt, J., Rotter, M., Weiser, T., Wittmann, W., Weizel, L., Kaiser, A., Heering, J., Goebel, T., Angioni, C., Wurglics, M., Paulke, A., Geisslinger, G., Kahnt, A., Steinhilber, D., Proschak, E. & Merk, D. Journal of Medicinal Chemistry 2017, 60 (18), 7703-7724. Copyright 2017 American Chemical Society*

## A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase To Counter Nonalcoholic Steatohepatitis

Jurema Schmidt,<sup>†</sup> Marco Rotter,<sup>†</sup> Tim Weiser,<sup>†</sup> Sandra Wittmann,<sup>†</sup> Lilia Weizel,<sup>†</sup> Astrid Kaiser,<sup>†</sup> Jan Heering,<sup>‡</sup> Tamara Goebel,<sup>†</sup> Carlo Angioni,<sup>§</sup> Mario Wurglics,<sup>†</sup> Alexander Paulke,<sup>||</sup> Gerd Geisslinger,<sup>§</sup> Astrid Kahnt,<sup>†</sup> Dieter Steinhilber,<sup>†</sup> Ewgenij Proschak,<sup>†</sup> and Daniel Merk<sup>\*,†</sup>

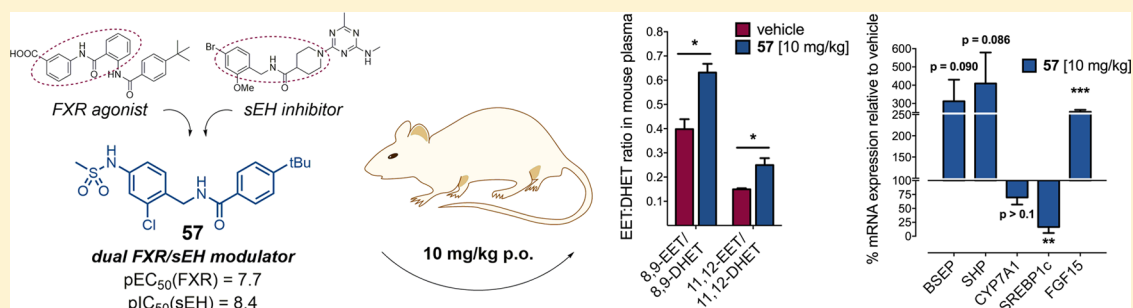
<sup>†</sup>Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 9, D-60438 Frankfurt, Germany

<sup>‡</sup>Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt am Main, Germany

<sup>§</sup>Institute of Clinical Pharmacology, Goethe University Frankfurt, Theodor-Stern-Kai 7, D-60590 Frankfurt, Germany

<sup>||</sup>Department of Forensic Toxicology, Institute of Forensic Medicine, Goethe University Frankfurt, Kennedyallee 104, D-60596 Frankfurt, Germany

### Supporting Information



**ABSTRACT:** Nonalcoholic steatohepatitis arising from Western diet and lifestyle is characterized by accumulation of fat in liver causing inflammation and fibrosis. It evolves as serious health burden with alarming incidence, but there is no satisfying pharmacological therapy to date. Considering the disease's multifactorial nature, modulation of multiple targets might provide superior therapeutic efficacy. In particular, farnesoid X receptor (FXR) activation that revealed antisteatotic and antifibrotic effects in clinical trials combined with inhibition of soluble epoxide hydrolase (sEH) as anti-inflammatory strategy promises synergies. To exploit this dual concept, we developed agents exerting partial FXR agonism and sEH inhibitory activity. Merging known pharmacophores and systematic exploration of the structure–activity relationship on both targets produced dual modulators with low nanomolar potency. Extensive in vitro characterization confirmed high dual efficacy in cellular context combined with low toxicity, and pilot in vivo data revealed favorable pharmacokinetics as well as engagement on both targets in vivo.

### INTRODUCTION

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) resulting from overnutrition and sedentary lifestyle increasingly affects adults especially in Western civilizations and all over the world. Recent estimates assume that up to every third adult in the world carries NAFLD and that up to 15% of adults proceed to nonalcoholic steatohepatitis (NASH). Most alarmingly, up to 11% of adolescents are thought to be affected by NAFLD. The disease complex of NAFLD and NASH (often considered as hepatic manifestation of the metabolic syndrome) therefore constitutes a serious health threat. However, current NAFLD treatment is limited and pharmacological options are insufficient. Hence, novel pharmacological interventions to treat NAFLD and NASH are urgently required.<sup>1–3</sup>

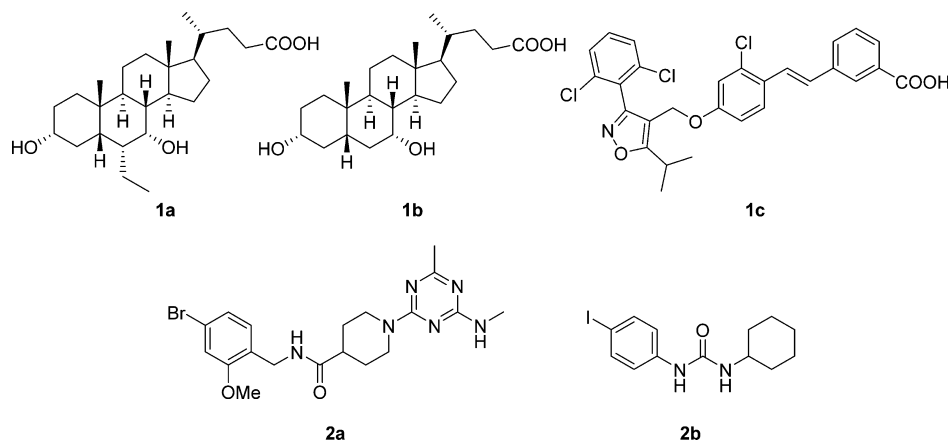
In vivo models and clinical trials have identified several strategies with therapeutic potential for the treatment of

NAFLD/NASH. Particularly the nuclear farnesoid X receptor (FXR)<sup>4</sup> seems a very promising target for NAFLD/NASH therapy since obeticholic acid (6 $\alpha$ -ethyl-CDCA, OCA, **1a**), which was developed from the endogenous FXR agonist chenodeoxycholic acid (CDCA, **1b**), has already revealed clinical efficacy in NASH treatment.<sup>5,6</sup> FXR is a ligand-activated transcription factor mainly found in liver, intestine, and kidney and is physiologically activated by bile acids.<sup>7–9</sup> It acts as metabolic regulator by controlling several genes involved in bile acid, lipid, and glucose homeostasis and as an important liver protector by sensing toxic levels of accumulating bile acids.<sup>10,11</sup> Clinical trials have reported improved histological features and clinical markers of NAFLD/NASH as well as improved

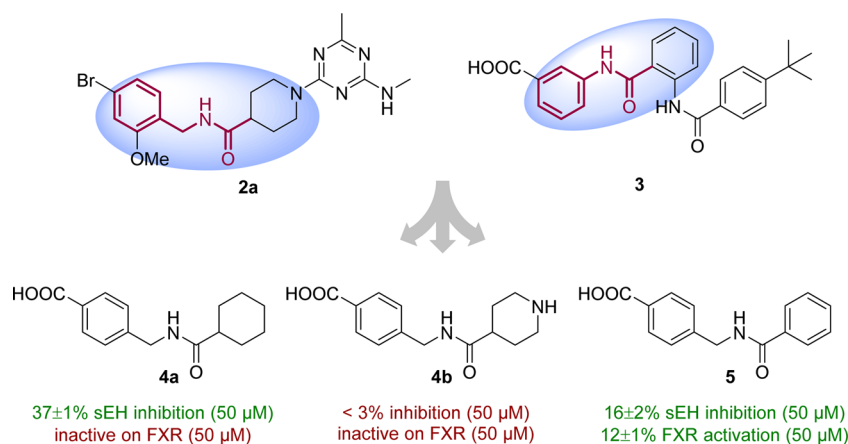
Received: March 14, 2017

Published: August 28, 2017

Scheme 1. FXR Agonists 1a–c and sEH Inhibitors 2a and 2b



Scheme 2. Discovery of Lead Compound 5 by Merging the Pharmacophores of sEH Inhibitor 2a and Partial FXR Agonist 3



metabolic parameters after treatment with **1a** (Scheme 1) which has validated FXR as target to treat fatty liver disorders and, potentially, other metabolic diseases.<sup>6,12,13</sup> However, full activation of FXR might cause undesirable accumulation of cholesterol since FXR activation leads to repression of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) which is the rate-limiting enzyme in metabolic conversion of cholesterol to bile acids. Partial FXR agonism with lower maximum efficacy than typical FXR agonists such as **1c** seems a promising concept to exploit desirable effects of FXR activation without disturbing cholesterol homeostasis.<sup>14–16</sup>

The soluble epoxide hydrolase (sEH) is a downstream enzyme of the CYP pathway of arachidonic acid metabolism and also holds promise in the treatment of metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus.<sup>17–19</sup> It converts epoxyeicosatrienoic acids (EETs) formed by CYP enzymes from arachidonic acid to the respective dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs).<sup>19,20</sup> Since EETs exhibit robust anti-inflammatory activities, sEH inhibition constitutes an anti-inflammatory strategy. sEH is expressed throughout the body with especially high levels in heart, liver, and kidney. Recent results from mouse models for NASH have revealed that sEH knockout or inhibition reduces hepatic fat accumulation and hepatic inflammation under high fat diet, suggesting a promising role in NASH treatment.<sup>21,22</sup>

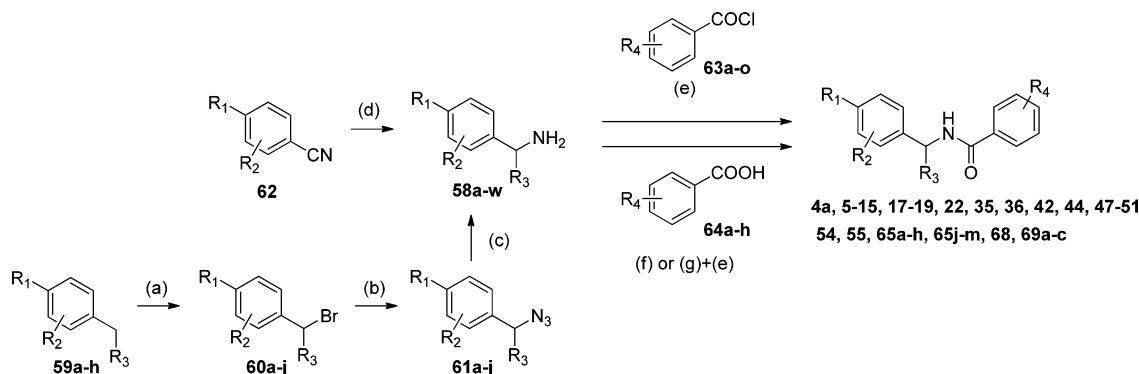
NASH is associated with various risk factors such as type 2 diabetes or obesity and possesses diverse manifestations including steatosis, hepatic inflammation, and fibrosis. Accord-

ingly, several experimental strategies have revealed a therapeutic efficacy in NASH,<sup>2,23,24</sup> and it seems reasonable to face this multifactorial disease with more than one therapeutic mechanism treating its distinct pathological factors. However, the resulting polypharmacy with a multitude of drugs is disadvantageous suffering, e.g., from complex and problematic drug–drug interactions and additional side effects. Multitarget agents addressing the multitude of the desired therapeutic mechanisms can avoid many drawbacks of polypharmacology.<sup>25–28</sup>

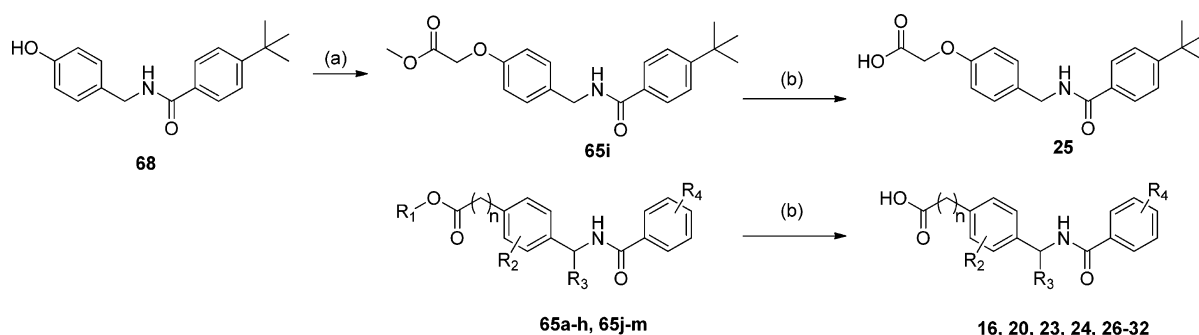
In light of the clinical efficacy of FXR activation in reducing NASH progression and lipid accumulation as well as the hepatic anti-inflammatory and antisteatotic effects of sEH inhibition, dual modulation of FXR and sEH seems a promising strategy to treat NAFLD/NASH that might generate synergistic effects. Therefore, we tended to develop dual modulators with partial agonistic activity on FXR and inhibitory potency on sEH.

## RESULTS

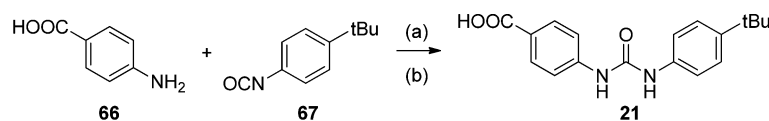
In order to develop agents with potent dual activity on FXR and sEH, we initially screened representative compounds of our in-house library of FXR modulators<sup>14,15,29–31</sup> but failed to identify a lead compound with inhibitory potency on sEH among them. Therefore, we searched for a merged pharmacophore from known partial FXR agonists and known sEH inhibitors. Several sEH inhibitors contain an amide or urea residue mimicking the epoxide moiety cleaved by the enzyme.<sup>32</sup>

Scheme 3<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) NBS, AIBN, CHCl<sub>3</sub>, reflux, 4 h; (b) NaN<sub>3</sub>, DMF, 80 °C, 16 h; (c) PPh<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, THF, rt, 12 h; (d) LiAlH<sub>4</sub>, THF, reflux, 18 h; (e) pyridine, THF, rt, 2 h; (f) EDC·HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 50 °C, 6 h; (g) SOCl<sub>2</sub>, DCM, DMF, reflux, 4 h.

Scheme 4<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) BrCH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>, DMF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 18 h; (b) KOH, H<sub>2</sub>O, MeOH, microwave, 15 min.

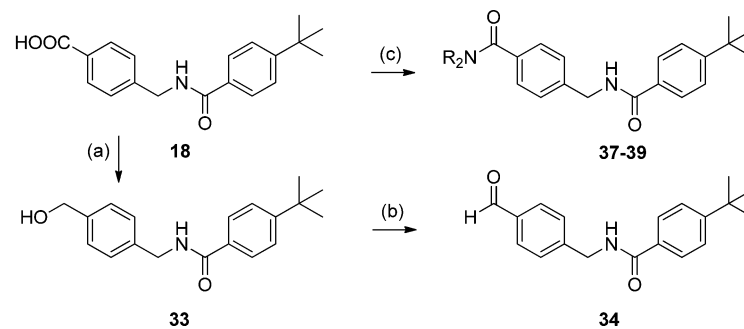
Scheme 5<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) DCM, NEt<sub>3</sub>, rt, 24 h; (b) LiOH, THF, MeOH, H<sub>2</sub>O, rt, 15 h.

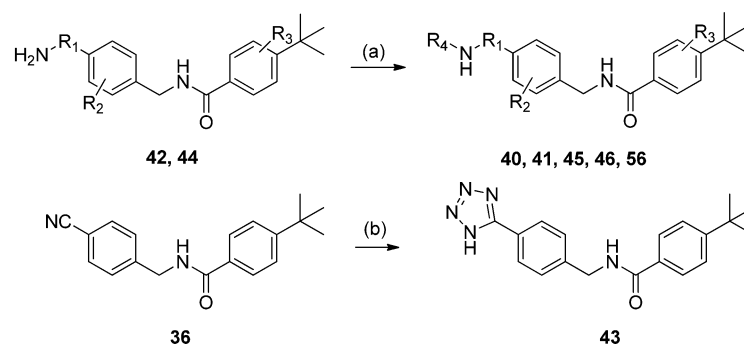
The sEH inhibitor GSK2188931B<sup>33</sup> (**2a**) comprising an *N*-benzylamide residue as pharmacophore shares some structural similarity with recently reported<sup>15</sup> partial FXR agonists such as **3**. We therefore extracted the similar structural features of both compounds and combined them in the minimal dual pharmacophore **4a** containing the *N*-benzylamide residue for sEH inhibition and a carboxylic acid group for FXR activation (Scheme 2). Compound **4a** exhibited moderate sEH inhibition of 37 ± 1% at 50 μM but was inactive on FXR. **4b** incorporating the piperidine moiety of template **2** displayed even lower activity and was inactive on sEH and FXR. However, when we replaced the saturated ring in **4a** and **4b** by an aromatic moiety in **5**, we achieved the desired dual activity with 12 ± 1% FXR activation and 16 ± 2% sEH inhibition at 50 μM concentration. For the low fragment-like size (MW 255 Da) of **5** we considered this moderate potency sufficient and systematically investigated the structure–activity relationship (SAR) of **5** as dual sEH and FXR modulator.

**Synthesis.** *N*-Benzylbenzamide derivatives **4–57** and **77–78** were prepared according to Schemes 3–9. Synthesis of aminomethylbenzene precursors **58a–j** started with radical bromination of the respective methylbenzene derivatives **59a–j**

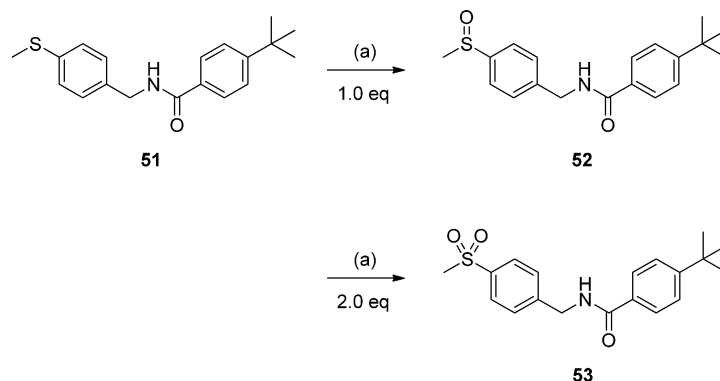
using NBS and AIBN to bromomethylbenzenes **60a–j**. Subsequently, bromomethylbenzenes **60a–j** were applied to a two-step Staudinger reaction using sodium azide to generate azides **61a–j** and triphenylphosphine in water for their reduction. Aminomethylbenzene derivative **58k** was prepared by reduction of 4-amino-2-chlorobenzonitrile **62** using LiAlH<sub>4</sub>. Aminomethylbenzene derivatives **58l–w** were commercially available. Subsequently, **58a–w** were reacted with carbonyl chlorides **63a–o** in the presence of pyridine or with carboxylic acids **64a–f** in the presence of EDC and 4-DMAP to yield compounds **18**, **19**, **22**, **35**, **36**, **44**, **47–51**, **54**, **55**, **68**, and **69a–c** or the esters **65a–h** (Scheme 3). Compound **68** was treated with BrCH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub> to generate the ester **65i**. All esters **65a–i** were hydrolyzed to the final products **16**, **20**, and **23–32** under alkaline conditions (Scheme 4). Urea **21** was prepared from 4-aminobenzoic acid (**66**) and 4-*tert*-butylphenyl isocyanate (**67**) with NEt<sub>3</sub> and subsequent hydrolysis with lithium hydroxide (Scheme 5). The free carboxylic acid **18** served for the preparation of amides **37–39** using ammonium chloride, methylammonium chloride or dimethylammonium chloride, and EDC/DMAP. Reduction of **18** with LiAlH<sub>4</sub> yielded ethyl alcohol derivative **33** which was further converted

Scheme 6<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) LiAlH<sub>4</sub>, THF, rt, 18 h; (b) PCC, DCM, rt, 2 h; (c) R<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·Cl, EDC·HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 50 °C, 4 h.

Scheme 7<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) R-OH, EDC·HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 50 °C, 4 h or mesyl chloride, THF, rt, 2 h; (b) Cu<sub>2</sub>O, NaN<sub>3</sub>, DMF, MeOH, 90 °C, 24 h; (c) BBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C to rt, 2 h.

Scheme 8<sup>a</sup>

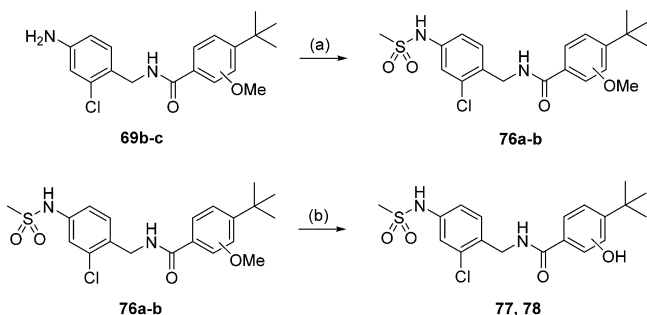
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) mCPBA, CHCl<sub>3</sub>, 0 °C for 2 h or rt for 18 h.

to aldehyde **34** with PCC (Scheme 6). The inverted amides **40**, **41**, and **56**, the inverted sulfonamides **46** and **57**, and *N*-acylsulfonamide **45** were generated from **42**, **44**, and **69a** with EDC/DMAP for carboxylic acid activation. Tetrazole **43** was available from nitrile **36** by cycloaddition of NaN<sub>3</sub> under Cu<sub>2</sub>O catalysis (Scheme 7). Oxidation of methylmercaptan **51** to sulfoxide **52** and sulfone **53** was achieved using suitable equivalents of meta-chloroperbenzoic acid (mCPBA, Scheme 8), and finally, preparation of methoxy derivatives **76a,b** according to the standard procedure (Scheme 3) and their demethylation with BBr<sub>3</sub> yielded phenolic derivatives **77** and **78** (Scheme 9).

**Biological Evaluation.** To determine FXR agonistic activity, test compounds **4–57** were characterized in a full-

length (fl) FXR reporter gene assay in HeLa cells. This assay is based on a reporter construct containing a firefly luciferase under the control of the FXR response element from bile salt export protein (BSEP). FXR and its heterodimer partner retinoid X receptor (RXR) as expression constructs under the control of a CMV promoter as well as a constitutively expressed renilla luciferase (SV40 promoter) for normalization and toxicity control were co-transfected. The synthetic FXR agonist GW4064 (**1c**)<sup>34</sup> was used as reference agonist, and its transactivation activity at 3 μM was defined as 100% activation. The assay was validated with diverse known FXR agonists which yielded potencies in good agreement with literature (**1a**, EC<sub>50</sub> = 0.16 ± 0.02 μM; **1b**, EC<sub>50</sub> = 18 ± 1 μM; **1c**, EC<sub>50</sub> = 0.51 ± 0.16 μM). The well-characterized sEH inhibitor CIU<sup>35</sup>



Scheme 9<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) mesyl chloride, THF, rt, 2 h; (b) BBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C to rt, 2 h.

(2b) had no activity in this assay at 10  $\mu$ M excluding unspecific effects of sEH inhibitors. The sEH inhibitory potency of the test compounds was quantified in a fluorescence-based assay using recombinant enzyme and the fluorogenic sEH substrate PHOME<sup>36</sup> that is hydrolyzed to a fluorescent 6-methoxynaphthaldehyde by sEH.

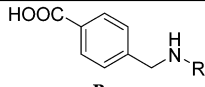
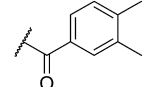
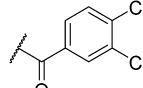
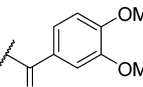
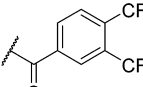
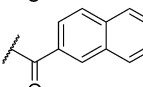
**Structure–Activity Relationship and Structural Optimization.** As first step in the SAR study (Table 1), we introduced additional methyl groups (6–8) in every position of the benzamide partial structure of 5. While all methylated derivatives 6–8 exhibited weak sEH inhibitory activity, FXR only tolerated a 4-methyl group in 8 indicating that the FXR binding pocket offers additional space especially in this direction. A 3-methyl group (7) generated the highest sEH

Table 1. In Vitro Activity of 4–13 on FXR and sEH<sup>a</sup>

#	 R =	<b>FXR activation</b> EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	<b>sEH inhibition</b> IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
4a		inactive (50 $\mu$ M)	37 $\pm$ 1% inhibition (50 $\mu$ M)
4b		inactive (50 $\mu$ M)	inactive (50 $\mu$ M)
5		12 $\pm$ 1% activation (50 $\mu$ M)	16 $\pm$ 2% inhibition (50 $\mu$ M)
6		inactive (50 $\mu$ M)	14 $\pm$ 1% inhibition (50 $\mu$ M)
7		inactive (50 $\mu$ M)	37 $\pm$ 1% inhibition (50 $\mu$ M)
8		15 $\pm$ 3% activation (50 $\mu$ M)	24 $\pm$ 1% inhibition (50 $\mu$ M)
9		inactive (50 $\mu$ M)	7 $\pm$ 2% inhibition (50 $\mu$ M)
10		0.32 $\pm$ 0.03 $\mu$ M (12 $\pm$ 1%)	52 $\pm$ 1% inhibition (50 $\mu$ M)
11		22 $\pm$ 1% activation (50 $\mu$ M)	19 $\pm$ 2% inhibition (50 $\mu$ M)
12		0.67 $\pm$ 0.17 $\mu$ M (14 $\pm$ 1%)	10.0 $\pm$ 1.2 $\mu$ M
13		0.44 $\pm$ 0.04 $\mu$ M (24 $\pm$ 1%)	8.1 $\pm$ 0.1 $\mu$ M

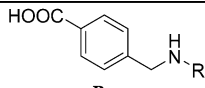
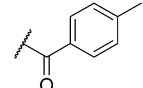
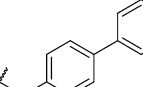
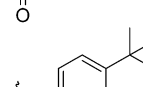
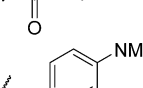
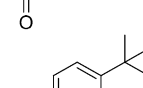
<sup>a</sup>Data represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ –6.

Table 2. In Vitro Activity of 14–17 on FXR and sEH<sup>a</sup>

#	 R =	<b>FXR activation</b> EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	<b>sEH inhibition</b> IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
10		0.32±0.03 μM (12±1%)	52±1% inhibition (50 μM)
14		inactive (50 μM)	10.5±0.3 μM
15		0.37±0.02 μM (18±1%)	26±2% inhibition (50 μM)
16		inactive (50 μM)	55±1% inhibition (50 μM)
17		1.36±0.08 μM (18±1%)	45±1% inhibition (50 μM)

<sup>a</sup>Data represent the mean ± SEM, *n* = 3–6.

Table 3. In Vitro Activity of 18–20 on FXR and sEH<sup>a</sup>

#	 R =	<b>FXR activation</b> EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	<b>sEH inhibition</b> IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
8		15±3% activation (50 μM)	24±1% inhibition (50 μM)
13		0.44±0.04 μM (24±1%)	8.1±0.1 μM
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
19		inactive (50 μM)	19±1% inhibition (50 μM)
20		1.2±0.4 μM (23±1%)	5.04±0.30 μM

<sup>a</sup>Data represent the mean ± SEM, *n* = 3–6.

inhibition among the methylated derivatives, and therefore we prepared compounds (9, 10) comprising two methyl substituents in order to combine the improvements on both targets. 2,4-Dimethyl derivative 9 was nearly inactive, while 3,4-dimethyl derivative 10 exhibited improved dual activity although its maximum relative activation on FXR was rather low.

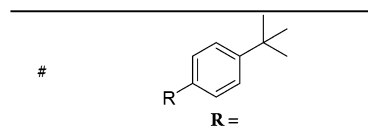
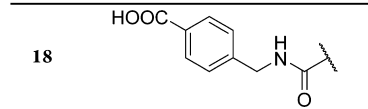
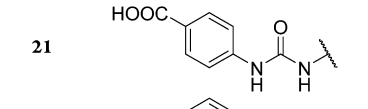
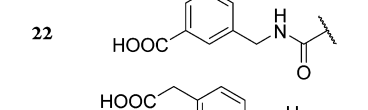
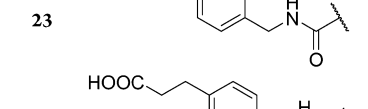
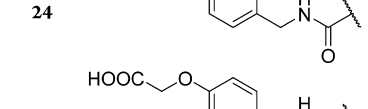
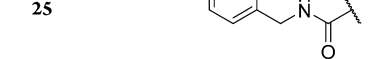
As the additional methyl groups did not significantly improve the potency on either target, we also investigated the introduction of larger residues on the benzamide moiety and

characterized biphenyl derivatives 11–13. All three biphenyls 11–13 revealed considerably higher potency than the respective methylbenzamides 6–8 while the rank order of potency remained unchanged. FXR tolerated 3-substitution (12) but favored 4-substitution (13), and sEH could equally be inhibited by the 3- (12) and the 4-biphenyl derivative (13).

The initial SAR results suggested that 3- and 4-substitution at the benzamide residue in 5 was tolerated by both targets, potentially improving the dual potency, and therefore, we studied various 3,4-disubstitutions (14–16) as well as 2-



Table 4. In Vitro Activity of 21–25 on FXR and sEH<sup>a</sup>

#		FXR activation EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	sEH inhibition IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
21		3.8±1.7 μM (14±1%)	18.5±2.8 μM
22		1.70±0.03 μM (14±1%)	26±2% inhibition (50 μM)
23		6.4±1.2 μM (19±1%)	20.0±5.1 μM
24		0.35±0.03 μM (16±1%)	1.63±0.02 μM
25		0.73±0.18 μM (21±1%)	19.0±0.7 μM

<sup>a</sup>Data represent the mean ± SEM, *n* = 3–6.

naphthyl derivative **17** (Table 2). However, **14**–**17** failed to produce a significant improvement in the dual potency on FXR and sEH. 3,4-Dichloro (**14**) and 3,4-bis(trifluoromethyl) (**16**) substitutions were only tolerated by sEH, and 2-naphthyl derivative **17** was less active on FXR than **10**. Only 3,4-dimethoxybenzamide **15** was favorable since it improved the maximum relative activation on FXR without affecting the EC<sub>50</sub> value and weakly inhibited sEH activity.

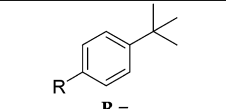
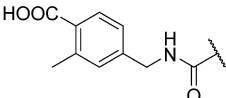
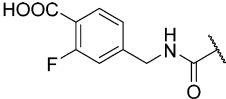
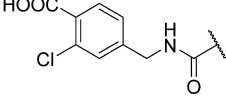
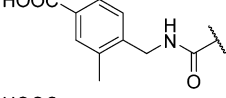
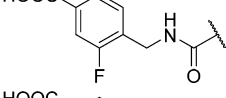
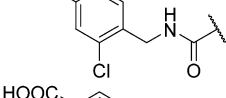
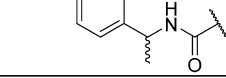
So far, 4-biphenyl derivative **13** revealed the highest dual potency indicating that both targets tolerated bulky 4-substituents at the benzamide residue (Table 3). Introduction of a 4-*tert*-butyl moiety in **18** led to further improvement of the dual activity, while the more polar 4-dimethylaminobenzamide **19** as *tert*-butyl mimic was considerably less active. Combination of the favorable bulky *tert*-butyl residue of **18** and the 3-methoxy group of **15** in **20** did not generate additive effects, and therefore, we selected 4-*tert*-butyl derivative **18** for further optimization.

With **18** as new lead we then focused on optimization of the *N*-benzyl substituent (Table 4). Exchanging the *N*-benzylbenzamide structure of **18** by a diphenylurea in **21** as classical sEH pharmacophore was poorly tolerated by both targets. Similarly, shifting the carboxylic acid moiety from 4-position in **18** to 3-position in **22** caused a marked decline in potency. Variation of the side chain length from benzoic acid (**18**) to phenylacetic acid (**23**) diminished potency on both targets, while phenylpropionic acid **24** exerted about equal activity as **18**. This SAR might eventually be explained by a water-mediated interaction of **18** and displacement of the water by **24** as observed in previous studies.<sup>15</sup> Phenoxyacetic acid **25** exhibited similar activity on FXR as phenylpropionic acid **24**, but the ether residue was poorly tolerated by sEH and significantly diminished inhibitory potency by about a factor 10.

As no significant improvement in dual potency was achieved by variations in the molecular geometry and distance between pharmacophoric features (**21**–**25**), we then explored the possibility of introducing additional substituents at the benzoic acid aromatic ring of **18** (Table 5). Substituents in 2-position (**26**–**28**) remarkably increased potency on FXR with 2-chloro derivative **28** as highly potent partial FXR agonist. However, sEH inhibitory activity simultaneously dropped significantly. In contrast, 3-substitution (**29**–**31**) with increasing substituent size was beneficial for inhibitory potency on sEH with 3-chlorobenzoic acid **31** as highly potent sEH inhibitor. On FXR, 3-methyl substitution (**29**) entirely abolished activity, while 3-chloro derivative **31** was still active but with considerably lower potency. 3-Fluorobenzoic acid **30** was highly potent on FXR. Methylation in benzylic position (**32**) significantly enhanced agonistic activity on FXR, but not surprisingly it was not tolerated by sEH. As the amide moiety mimics the epoxide of EETs and an attacking water molecule in the enzyme's active site,<sup>32</sup> steric hindrance in benzylic position remarkably diminishes inhibitory potency on sEH. Altogether, several additional residues on the benzoic acid residue improved the activity on FXR or sEH but no position could be identified where further substitution generated enhanced and balanced dual potency.

Therefore, we investigated the SAR of the carboxylic acid in **18** and introduced several alternative polar residues and bioisosters (Table 6). Alcohol **33** was equally potent as **18** on sEH but inactive on FXR, whereas aldehyde **34** still activated FXR with about 10-fold lower potency but was significantly more potent on sEH compared to **18**. Methyl ketone **35** showed remarkably improved activity on both targets and was the first dual modulator with nanomolar potency on FXR and sEH. This SAR indicated that a carbonyl moiety but not an alcohol instead of the carboxylic acid was sufficient for

Table 5. In Vitro Activity of 26–32 on FXR and sEH<sup>a</sup>

#	R =	FXR activation EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	sEH inhibition IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
26		0.16±0.05 μM (14±1%)	53±1% inhibition (50 μM)
27		0.14±0.06 μM (28±2%)	20.3±1.2 μM
28		0.0088±0.0033 μM (21±2%)	50±1% inhibition (50 μM)
29		inactive (50 μM)	0.68±0.06 μM
30		0.0078±0.0007 μM (26±1%)	1.43±0.10 μM
31		7.5±0.4 μM (25±1%)	0.17±0.01 μM
32		0.076±0.027 μM (24±1%)	37±1% inhibition (50 μM)

<sup>a</sup>Data represent the mean ± SEM, *n* = 3–6.

FXR activation and that sEH preferred less polar groups in this position. The reduced potency of aldehyde **34** might be due to low stability in the cellular context of the fFXR assay. Nitrile **36** inhibited sEH with nanomolar potency but was inactive on FXR. The amides **37–39** were only moderately potent sEH inhibitors which again indicated that more polar residues in this position were disadvantageous. On FXR, the amides **37–39** significantly gained in potency with increasing substitution on the nitrogen atom. Primary amide **37** was considerably less active than carboxylic acid **18**, while *N*-methylamide **38** comprised equal potency as **18**. Another methyl group in *N,N*-dimethylamide **39** further enhanced the potency. Inversion of the amide in *N*-acetylaniline **40** reduced FXR agonistic activity but introduction of three fluorine atoms in *N*-trifluoroacetylaniline **41** was very favorable and generated a balanced nanomolar dual modulator. Free aniline **42** still inhibited sEH but was inactive on FXR.

Tetrazole **43** as classical bioisoster of the carboxylic acid possessed slightly enhanced potency on FXR accompanied by reduced sEH inhibitory activity compared to **18**. The considerably less acidic sulfonamide **44** somewhat inverted the activity profile of **18** and was more potent on sEH than on FXR. In order to increase the acidity of **44**, we prepared *N*-acetylsulfonamide **45**, but it was inactive on FXR and remarkably lost potency on sEH compared to **44**. Inversion

of the sulfonamide residue in **46** had a similar effect as inversion of the amide in **40** and also yielded a potent dual modulator.

Finally, we exchanged the carboxylic acid of **18** by a methoxy group in **47** which surprisingly resulted in considerable potency on both targets. Ethoxy derivative **48** revealed equal potency on FXR and sEH, while isopropoxy analogue **49** was equally active on FXR but could not be characterized on sEH due to insolubility. A slight improvement in potency on sEH was achieved with trifluoromethoxy derivative **50** which revealed high and well-balanced dual potency. Replacement of oxygen by sulfur in methylmercaptan **51** generated an even more potent dual modulator with half-maximal activity on both targets at approximately 0.1 μM. When mercaptan **51** was oxidized to sulfoxide **52** or sulfone **53**, potency on FXR dropped remarkably while **52** was still quite active on sEH and only **53** revealed significantly diminished inhibitory potency. In the case of the mercaptan as carboxylic acid replacement, introduction of a trifluoromethyl group in **54** led to a marked increase in potency on FXR and generated a subnanomolar partial agonist. However, trifluoromethylmercaptan **54** revealed slightly diminished activity on sEH compared to methylmercaptan **51** and therefore comprised a high but poorly balanced dual potency.

Since neither single modification of our optimized lead compound **18** alone was able to improve potency on both targets to low nanomolar values, we evaluated the possibility of

Table 6. In Vitro Activity of 33–54 on FXR and sEH<sup>a</sup>

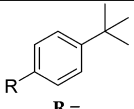
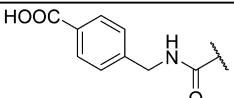
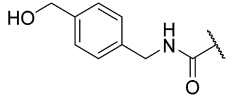
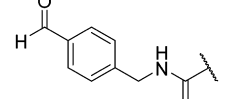
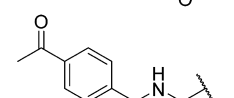
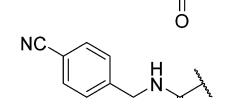
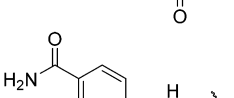
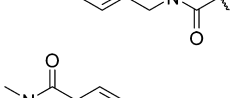
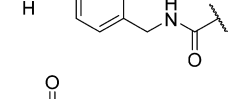
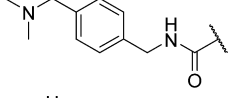
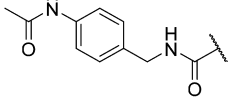
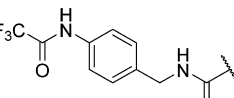
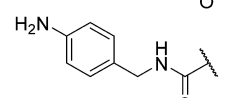
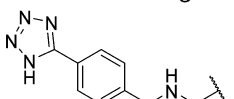
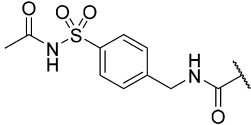
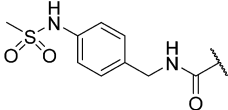
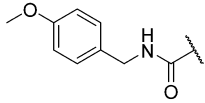
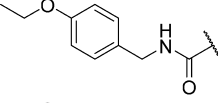
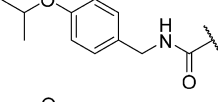
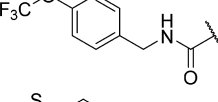
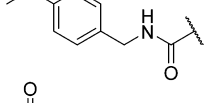
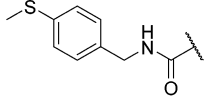
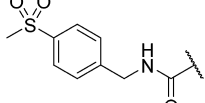
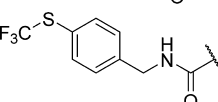
#	 R =	FXR activation EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	sEH inhibition IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
18		0.37±0.04 μM (13±1%)	4.2±0.8 μM
33		inactive (50 μM)	2.05±0.31 μM
34		5.3±1.5 μM (22±2%)	0.51±0.04 μM
35		0.10±0.01 μM (29±1%)	0.157±0.009 μM
36		inactive (50 μM)	0.91±0.07 μM
37		3.8±0.3 μM (27±1%)	1.2±0.2 μM
38		0.34±0.03 μM (29±1%)	1.9±0.3 μM
39		0.17±0.01 μM (17±1%)	4.6±0.5 μM
40		2.9±0.2 μM (31±1%)	1.12±0.02 μM
41		0.26±0.11 μM (20±1%)	0.66±0.01 μM
42		inactive (50 μM)	3.5±0.2 μM
43		0.12±0.02 μM (23±1%)	18.2±3.2 μM
44		1.4±0.2 μM (16±1%)	0.28±0.12 μM

Table 6. continued

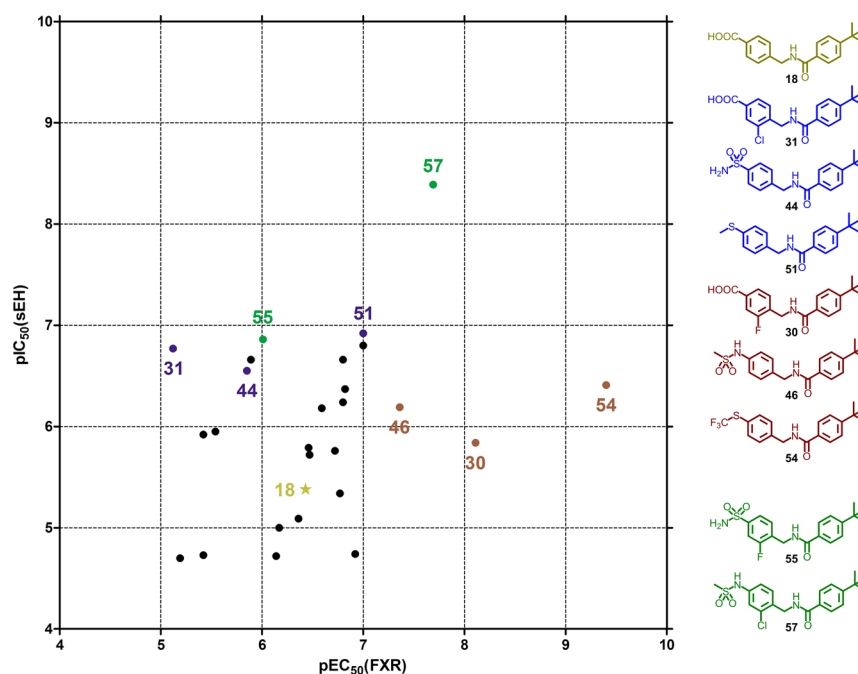
45		inactive (50 $\mu$ M)	12.7 $\pm$ 0.4 $\mu$ M
46		0.044 $\pm$ 0.009 $\mu$ M (22 $\pm$ 1%)	0.65 $\pm$ 0.04 $\mu$ M
47		0.15 $\pm$ 0.04 $\mu$ M (19 $\pm$ 1%)	0.43 $\pm$ 0.01 $\mu$ M
48		0.16 $\pm$ 0.01 $\mu$ M (31 $\pm$ 1%)	0.57 $\pm$ 0.05 $\mu$ M
49		0.17 $\pm$ 0.01 $\mu$ M (26 $\pm$ 1%)	n.d. (poor solubility)
50		0.16 $\pm$ 0.04 $\mu$ M (26 $\pm$ 1%)	0.22 $\pm$ 0.06 $\mu$ M
51		0.10 $\pm$ 0.01 $\mu$ M (33 $\pm$ 1%)	0.12 $\pm$ 0.01 $\mu$ M
52		1.3 $\pm$ 0.4 $\mu$ M (24 $\pm$ 1%)	0.22 $\pm$ 0.03 $\mu$ M
53		3.8 $\pm$ 0.5 $\mu$ M (34 $\pm$ 1%)	1.2 $\pm$ 0.1 $\mu$ M
54		0.00040 $\pm$ 0.00004 $\mu$ M (19 $\pm$ 1%)	0.39 $\pm$ 0.05 $\mu$ M

<sup>a</sup>Data represent the mean  $\pm$  SEM,  $n = 3-6$ .

combining the most favorable structural alterations for each target in one molecule. To identify derivatives with outstanding activity on one of the targets, we plotted pIC<sub>50</sub> (sEH) versus pEC<sub>50</sub> (FXR) values of the most potent compounds (Figure 1). This potency plot revealed a 3-fluoro substitution at the benzyl moiety (30), the trifluoromethylmercaptan residue (54), and the inverted sulfonamide 46 as very favorable on FXR. Since trifluoroacetamide 41 structurally resembled 46 and also possessed high potency on FXR, it was additionally selected for combination. Concerning sEH inhibition, 3-chlorosubstitution at the benzyl moiety (31), the methylmercaptan residue (51), and sulfonamide 44 protruded from the other derivatives. 51 and 54 were omitted for recombination for their proportionally poor solubility and because the two moieties could not be merged. Instead, 30, 31, 41, 44, and 46 were selected for structural recombination (Table 7).

Introduction of the 3-fluoro atom of 30 in sulfonamide 44 yielded the dual modulator 55 that revealed the anticipated increase in FXR potency. However, this improvement was merely moderate and did not produce the desired dual

modulator with low nanomolar potency. In contrast, merging of 31 and 41 in *N*-(3-chlorophenyl)trifluoroacetamide 56 and combination of 31 and 46 in *N*-(3-chlorophenyl)methanesulfonamide 57 were accompanied by a remarkable rise in potency on both targets. With respective EC<sub>50</sub> values of 14  $\pm$  1 nM and 20.4  $\pm$  4.2 nM for partial FXR activation as well as IC<sub>50</sub> values of 8.9  $\pm$  1.6 nM and 4.1  $\pm$  0.4 nM for sEH inhibition, the dual modulators 56 and 57 finally comprised the desired low nanomolar potency on both targets. Among these two dual modulators, 57 revealed significantly higher aqueous solubility (1.5  $\mu$ g/mL) than 56 (<0.1  $\mu$ g/mL (LLOQ)) and was, therefore, selected for further in vitro evaluation. Isothermal titration calorimetry (ITC, Supporting Information Figure S7) revealed a  $K_d$  of 0.13  $\mu$ M for 57 and indicated enthalpic binding ( $\Delta H = -19.5$  kcal/mol,  $\Delta S = -34.0$  cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). The discrepancy between cellular EC<sub>50</sub> value and  $K_d$  seems due to absence of coactivators in the ITC experiment that might significantly affect the binding equilibrium. The high binding energy might partly arise from potentially marked conformational changes in the FXR-LBD upon binding.



**Figure 1.** A potency plot of the dual modulators indicated 30, 46, and 54 (red) as the most potent partial FXR agonists, while 31, 44, and 51 (blue) emerged for highest sEH inhibitory potency. Consequently, the structural features of these compounds were combined to increase the dual activity resulting in 55 and 57 (green, Table 7).

**Table 7.** In Vitro Activity of 55–57 on FXR and sEH<sup>a</sup>

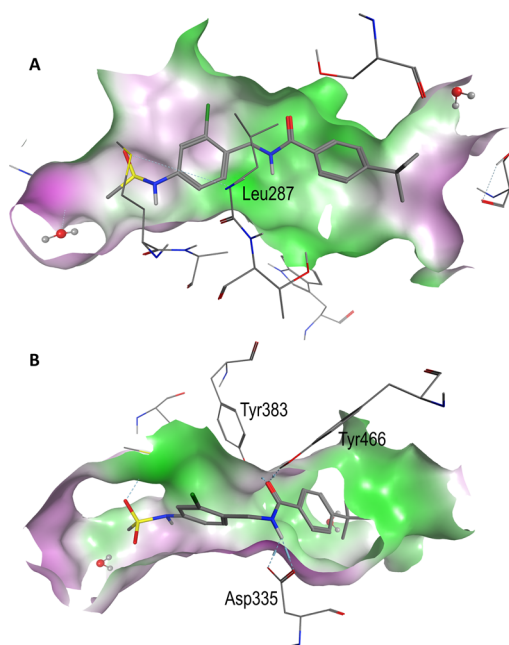
#	R =	FXR activation EC <sub>50</sub> (max. rel. activation) or % activation at indicated conc.	sEH inhibition IC <sub>50</sub> or % inhibition at indicated conc.
55		0.97±0.11 μM (34±1%)	0.137±0.018 μM
56		0.014±0.001 μM (21±1%)	0.0089±0.0016 μM
57		0.0204±0.0042 μM (35±1%)	0.0041±0.0004 μM

<sup>a</sup>Data represent the mean ± SEM, *n* = 3–6.

**Molecular Docking Analysis.** Binding of compound 57 was analyzed in silico by molecular docking using the X-ray structures of sEH and FXR containing the ligands from which lead compound 5 was constructed (compound 3/PDB code 4QE8 for FXR and compound 2/PDB code 3I28 for sEH). The resulting binding modes (shown in Figure 2) are in congruence with the SAR of *N*-benzylbenzamides 5–57 on both targets. In the binding mode of 57 in FXR (Figure 2A), the *tert*-butyl moiety tightly fits into the binding pocket and is responsible for partial receptor activation mediated through stabilizing effects on helix 12 similar to the cocrystallized partial agonist in 4QE8. The adjacent phenyl ring is well positioned into the lipophilic pocket that does not allow variations in 2- or 3-position. The sulfonamide occupies a hydrophilic region and does not exhibit specific interactions, which explains the wide tolerability of

hydrophilic moieties in this position of the benzyl moiety. The amide moiety does not participate in any directed H-bonds. However, this is also the case for the reference partial agonist 3 from FXR X-ray structure 4QE8. As reported by Costantino et al.,<sup>37</sup> in contrast, full agonists such as 1b stabilize the active conformation via distinct and stable hydrogen bonds toward Tyr361 and His447 which cannot be observed in the binding mode of 57 (Supporting Information Figure S1) and underline the partial agonistic character of 57. The methylene bridge is bound in proximity to Leu287 explaining the enhanced potency of compound 32 which carries an additional methyl group in this position. The chlorine atom points toward a tight subpocket defined by Ile352 and the phenolic moiety of Tyr369 (Supporting Information Figure S1) that tolerates





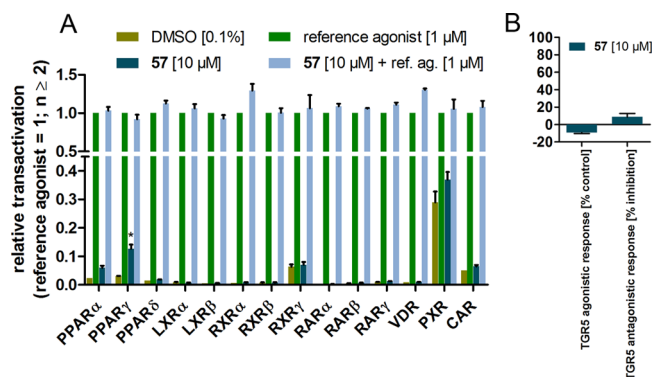
**Figure 2.** Molecular docking of 57: (A) binding mode of compound 57 in the FXR-LBD (PDB code 4QE8); (B) binding mode of compound 57 in the sEH (PDB code 3I28). Molecular surface is colored by lipophilicity (green, lipophilic; magenta, hydrophilic). Selected side chains are shown as lines, and compound 57 is displayed as sticks.

chlorine or fluorine (30) but no purely lipophilic residues as the methyl substituent in 29.

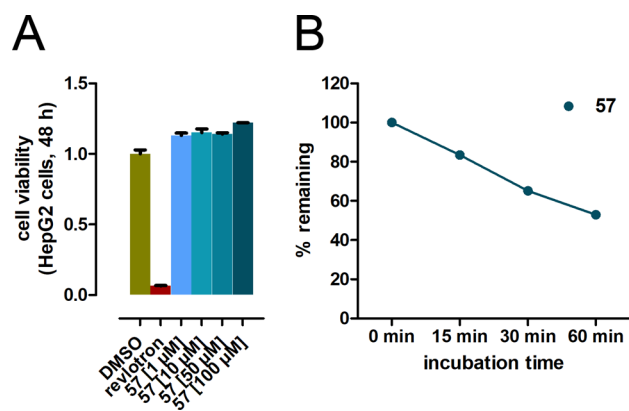
The proposed binding mode of 57 to sEH (Figure 2B) reveals that its amide group interacts with the catalytic residues Tyr383, Tyr466, and Asp335. The methylene bridge is located in a narrow tunnel that does not allow any structural modifications. The chlorine substituent of the benzyl moiety points toward a lipophilic pocket and is crucial for binding. Similar to the FXR binding mode, the sulfonamide moiety binds in a more hydrophilic subpocket and does not form specific interactions. The 4-*tert*-butylphenyl residue is located in a tight hydrophobic pocket offering space for substituents in position 4 or 3 but not in position 2 of the aromatic ring.

**In Vitro Pharmacological Characterization.** To study the selectivity profile of 57 among related nuclear receptors, we determined its activity on PPARs, LXRs, RXRs, RARs, PXR, CAR, and VDR at 10  $\mu\text{M}$  concentration in Gal4-hybrid reporter gene assays for the respective receptors (Figure 3A). 57 was inactive on all 14 nuclear receptors except PPAR $\gamma$  where it exhibited weak partial agonism with an  $\text{EC}_{50}$  value of  $14.7 \pm 0.9 \mu\text{M}$  and, therefore, is highly selective for FXR among nuclear receptors (selectivity of  $\geq 720$ ). Moreover, 57 was inactive on the membrane bile acid receptor TGR5 (Figure 3B) and displayed no cytotoxic activity up to a concentration of 100  $\mu\text{M}$  in a water-soluble tetrazolium (WST-1) assay (Figure 4A). To estimate metabolic stability, 57 was incubated with liver microsomes of Wistar rats which revealed an acceptable stability with >50% of the compound remaining after 60 min (Figure 4B).

Still, we studied metabolic conversion of 57 more in detail in vitro and identified its metabolites (Scheme 10). According to LC-MS-MS analysis (Supporting Information Figures S2–S6), 57 is metabolized by hydrolysis of the sulfonamide moiety resulting in aniline 69a, by hydroxylation on the *tert*-



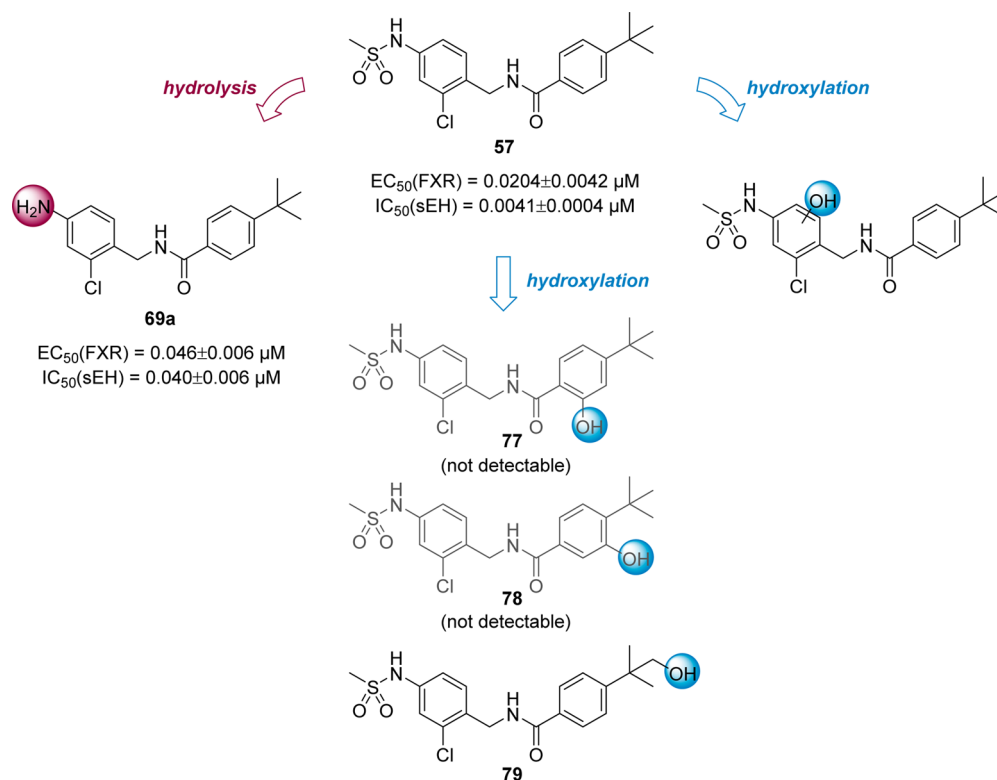
**Figure 3.** Selectivity profile of 57 on nuclear receptors (A) and the membrane bile acid receptor TGR5 (B). Except for a moderate activity on PPAR $\gamma$  ( $\text{EC}_{50} = 14.7 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ,  $30 \pm 1\%$  max), 57 was inactive on related nuclear receptors as well as TGR5 and therefore highly selective for FXR (values are mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ).



**Figure 4.** In vitro characterization of 57. (A) 57 revealed no cytotoxicity in a common WST-1 assay on HepG2 cells up to 100  $\mu\text{M}$  (values are mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). (B) 57 displayed an acceptable in vitro microsomal stability with more than 50% remaining after 60 min incubation with Wistar rat liver microsomes (values are mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ).

butylbenzamide moiety which can lead to the three isomers 77, 78, and 79 (Scheme 10), and by hydroxylation on the aromatic ring of the benzyl substituent. We synthesized 77 and 78 carrying a hydroxyl group on the benzamide aromatic ring, but both isomers were not detectable in the metabolized residue confirming 79 as metabolite of 57. Metabolite 69a retains considerable potency activating FXR with an  $\text{EC}_{50}$  value of  $0.046 \pm 0.006 \mu\text{M}$  and inhibiting sEH with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $0.040 \pm 0.006 \mu\text{M}$ . Hence, metabolite 69a may contribute to the pharmacodynamic activity of dual modulation in vivo and prolong the pharmacologic effect of the original compound 57.

To evaluate the FXR agonistic effect of 57 under less artificial conditions than in a reporter gene assay, we also quantified the effect of the compound on FXR target gene expression in HepG2 hepatoma cells (Figure 5A,B). For this purpose, the cells were incubated with the endogenous FXR agonist 1b at 50  $\mu\text{M}$ , the full agonists 1a at 1  $\mu\text{M}$  and 1c at 3  $\mu\text{M}$ , the partial agonist 57 at 0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  or with DMSO (0.1%) as control for 8 or 16 h and then quantified FXR target gene mRNA. Data were analyzed according to the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method, and all results were normalized to the values of the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Gene expression of vehicle treated control cells

Scheme 10<sup>a</sup>

<sup>a</sup>In vitro metabolism of **57**. Hydrolysis of the sulfonamide moiety of dual modulator **57** generates metabolite **69a** (confirmed by LC–MS–MS) which displays high dual modulatory potency and can contribute to pharmacodynamics activity. LC–MS–MS analysis also indicates the presence of a metabolite resulting from hydroxylation at the *tert*-butylbenzamide residue. Of the three possible isomers **77**, **78**, and **79**, **77** and **78** were not detectable confirming metabolic hydroxylation on the *tert*-butyl group leading to **79**. Furthermore, **57** is hydroxylated on the aromatic ring of the benzyl substituent.

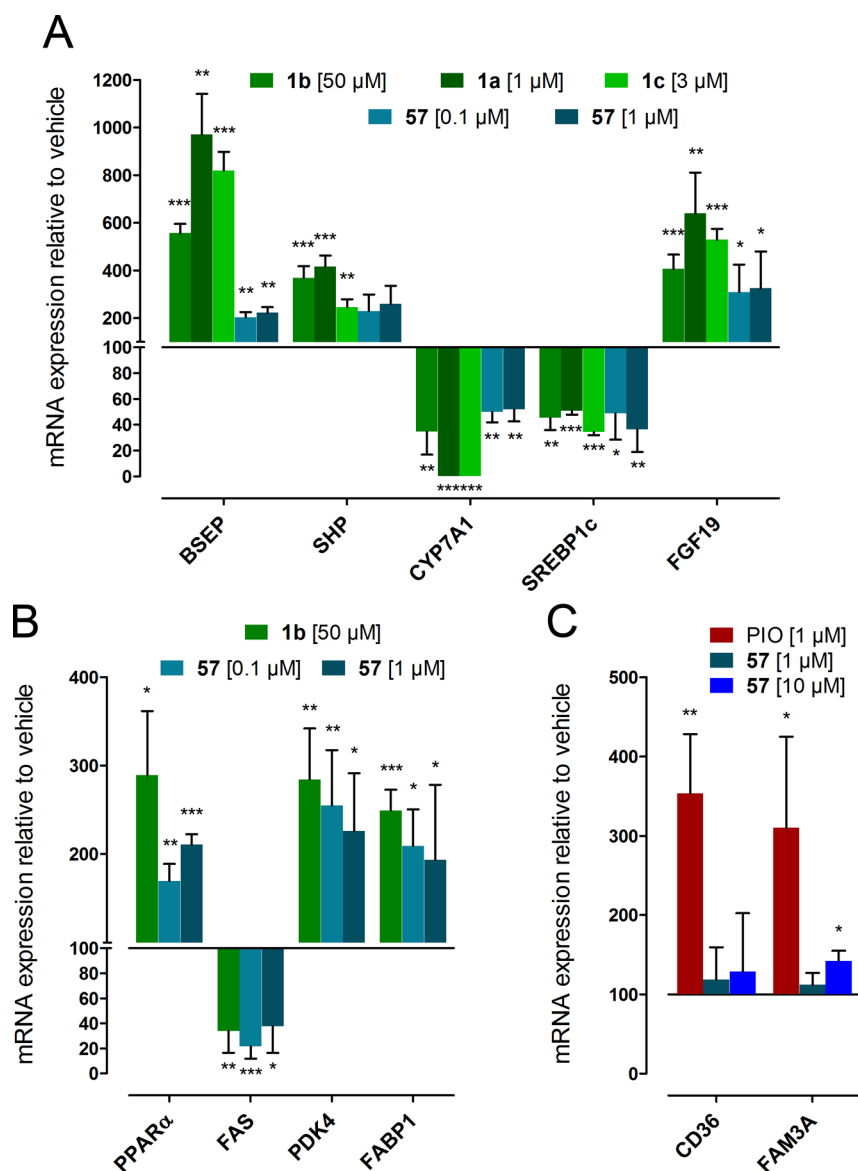
was defined as 100%. **57** revealed a partial FXR agonistic profile and modulated all nine studied genes similar to the endogenous agonist **1b** but with smaller amplitude. For all genes studied, **57** caused an equal effect at 0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ , confirming saturation at these concentrations. Expression of the bile salt export protein (BSEP) was only moderately increased by **57**, while induction of small heterodimer partner (SHP), peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), fibroblast growth factor 19 (FGF19), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), and liver-type fatty acid binding protein (fatty acid binding protein 1, FABP1) reached amplitudes of 50–80% of **1b**. Moreover, **57** repressed cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1), sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c), and fatty acid synthase (FAS), which are indirectly regulated by FXR via induction of SHP. Concerning CYP7A1, **57** behaved as partial agonist and caused less repression than **1b** while repression of SREBP1c and FAS by **57** and **1b** reached equal amplitudes. Also compared to the full FXR agonists **1a** and **1c**, **57** reached different amplitudes of target gene modulation. While efficacy in SREBP1c repression was comparable for **1a–c** and **57**, BSEP and CYP7A1 revealed markedly higher modulation by **1a** and **1c** than by **57**. Concerning SHP and FGF19 induction, **1a** and **1c** were more efficient than **1b** and **57**. In summary, **57** revealed partial FXR agonistic profile compared to **1a** and **1c** and resembled the activity of endogenous agonist **1b**. In contrast, PPAR $\gamma$  target genes scavenger receptor 3B (CD36) and cytokine-like protein 2-19 (FAM3A) were not markedly modulated by **57** even at a

higher concentration of 10  $\mu\text{M}$ , further confirming the compound's selectivity (Figure 5C).

Inhibition of soluble epoxide hydrolase was also studied in a less artificial context in HepG2 cell homogenates by quantifying conversion of the deuterated sEH substrate 14,15-EET-d11 in the presence of varying concentrations of inhibitor **57** (Figure 6). The compound exerted robust inhibition of cellular sEH with a statistically significant increase in the EET/DHET ratio even at 1 nM concentration. In the cellular context, **57** revealed an  $IC_{50}$  value for sEH inhibition of approximately 1 nM.

The dual modulator **57** produced marked anti-inflammatory effects in various cell types (Figure 7). In hepatocarcinoma cells (HepG2), it robustly repressed the nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) with significantly higher efficacy than FXR agonist **1a**, suggesting an additive effect of FXR activation and sEH inhibition. In the T-cell line HuT-78, **57** remarkably reduced TNF $\alpha$  release after stimulation with the Toll-like receptor 2/1 (TLR2/TLR1) agonist Pam3CSK4 while FXR agonist **1a** had no effect. Moreover, **57** reduced the release of the proinflammatory cytokine interleukin 12 (IL-12p70) from primary human monocytes after stimulation with lipopolysaccharide (LPS) with greater efficacy than the FXR agonist **1a** and the sEH inhibitor **2b**. In contrast, the release of the anti-inflammatory cytokine interleukin 10 (IL-10) was not affected. Altogether, these in vitro data suggest anti-inflammatory effects of the dual modulator **57** beyond its FXR agonistic activity.

**In Vivo Characterization.** Encouraged by the high potency and very favorable in vitro characteristics of **57**, we conducted a



**Figure 5.** Determination of cellular activity of 57 on FXR. (A, B) FXR target gene mRNA quantification in HepG2 cells after 8 or 16 h incubation with 57 at 0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$  compared to 1b at 50  $\mu\text{M}$ , 1a at 1  $\mu\text{M}$ , and 1c at 3  $\mu\text{M}$ . 57 caused a concentration-independent partial induction of BSEP, SHP, PPAR $\alpha$ , GLUT4, FGF19, PDK4, and FABP1 as well as a concentration-independent partial repression of CYP7A1, SREBP1c, and FAS (vehicle treated control cells are defined as 100%; values are mean  $\pm$  SEM;  $n = 4$ ). (C) 57 did not cause significant modulation of PPAR $\gamma$  target genes CD36 and FAM3A (pioglitazone (PIO) as positive control; values are mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ). (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

pilot in vivo study of the compound in male wild-type C57BL6/J mice (Figure 8). To record a pharmacokinetic profile and to evaluate pharmacodynamic data concerning FXR activation and sEH inhibition in vivo, six mice received a single dose of 57 (po, 10 mg/kg body weight). Three additional animals served as vehicle control.

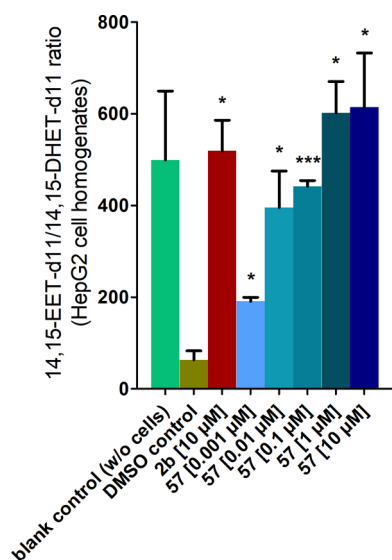
The dual modulator 57 displayed favorable oral bioavailability ( $c_{\text{max}} = 1182 \text{ ng/mL}$ ) and rapid uptake ( $t_{\text{max}} = 0.5 \text{ h}$ ) accompanied by a moderate half-life ( $t_{1/2} = 0.7 \text{ h}$ ). Altogether, the single dose of 57 produced effective concentrations above the  $\text{EC}_{50}$  (FXR) and  $\text{IC}_{50}$  (sEH) values over approximately 3–4 h (Figure 8A). To evaluate pharmacodynamic effects of 57, mouse plasma was analyzed for EET/DHET ratio, and FXR target gene expression was determined in mouse livers 8 h after application (Figure 8B). The EET/DHET ratios for the 8.9- and 11.12-isomers were increased by approximately a factor 2 upon treatment with 57, indicating that sEH activity was

inhibited by the dual modulator in vivo. Moreover, FXR target gene expression was altered in livers of mice receiving 57 with increased expression of BSEP (approximately 3-fold), SHP (approximately 4-fold), and FGF15 (approximately 2.5-fold) as well as reduced SREBP1c (approximately 5-fold) levels which also suggested FXR activation in vivo (Figure 8C). CYP7A1 mRNA levels showed a slight trend to repression. Expression of the PPAR $\gamma$  target gene fatty acid transport protein (FATP) was not affected by 57 in vivo. Hence, the pilot animal study revealed acceptable pharmacokinetics and clearly indicated dual target engagement of 57 in vivo.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The growing incidence of NASH with hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis as their most serious potential consequences represents a rapidly growing global health concern. While liver transplantation is the only effective therapy available to date,





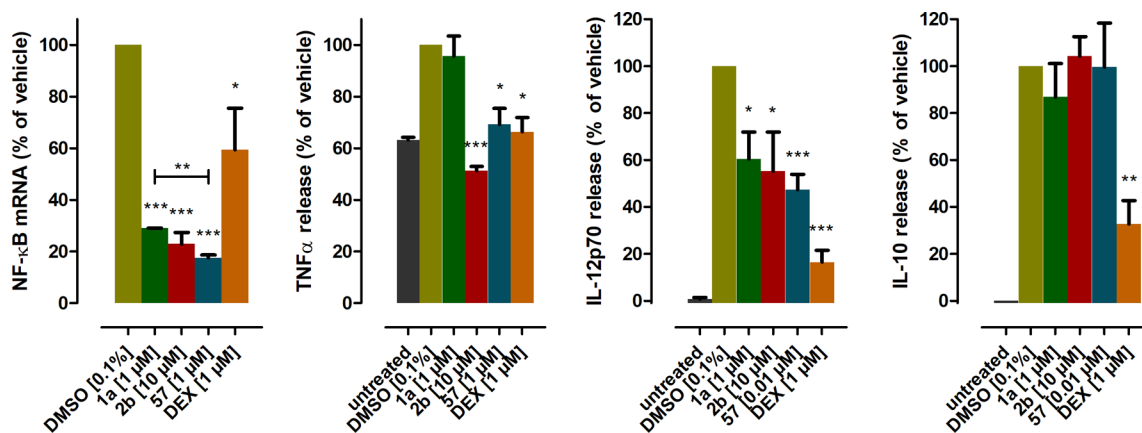
**Figure 6.** Determination of cellular activity of 57 on sEH: soluble epoxide hydrolase activity in cell homogenates from HepG2 cells. Dual modulator 57 inhibits conversion of 14.15-EET-d11 to 14.15-DHET-d11 by cellular sEH with an  $IC_{50}$  value of approximately 10 nM and exerts statistically significant inhibition at concentrations as low as 1 nM (values are mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ). (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

research on pharmacological options is very intensive. The FXR agonist **1a** is leading the pipeline and holds much promise to be the first effective drug to counter NASH. It exhibited antisteatotic and antifibrotic effects accompanied by several metabolic improvements in clinical trials.<sup>6,12</sup> The dual PPAR $\alpha$ / $\delta$  agonist elafibranor has successfully completed phase II trials and might succeed **1a** as therapeutic option.<sup>38</sup> Still, the multifactorial nature of NASH involving steatosis, fibrosis, and (importantly) inflammation might require a broader therapeutic strategy that addresses all participating factors. In light of the impressive efficacy of FXR activation on steatosis<sup>6,12</sup> and promising reports on hepatic antisteatotic as well as anti-inflammatory effects of sEH inhibition,<sup>21,39</sup> we assumed that combination of these strategies might be synergistic. Therefore,

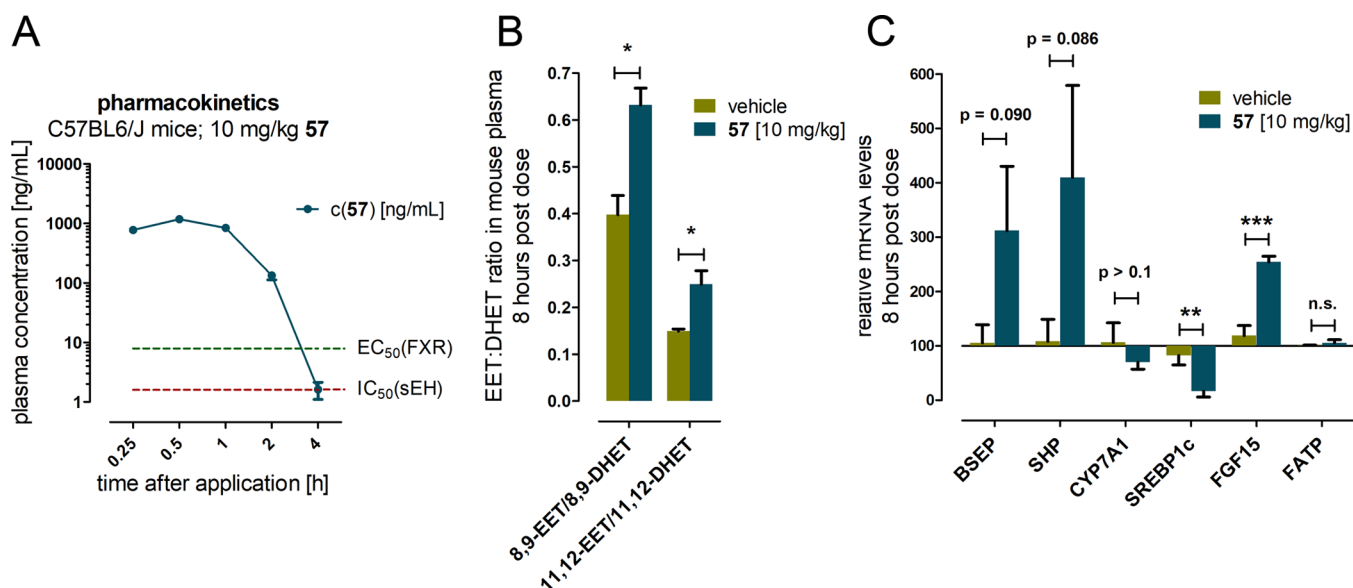
we have developed a highly potent dual modulator of FXR and sEH with well-balanced activity.

We successfully merged known pharmacophores of partial FXR agonists and sEH inhibitors to generate our lead structure **5** that displayed weak but statistically significant activity on both targets. The low fragment-like properties and structural flexibility of this lead compound allowed considerable structural variation to achieve optimization, and therefore, the moderate activity seemed sufficient. In four consecutive steps, we systematically investigated the SAR of the compound class on FXR and sEH and achieved strong optimization of dual potency. However, although we identified several highly potent modulators of the single targets, no compound with low nanomolar potency on both targets was discovered in the systematic SAR study. For the final decisive optimization step we therefore combined structural elements of the most active agents on the single targets which led to the development of **57** as highly potent dual modulator with an  $EC_{50}$  value of  $20.4 \pm 4.2$  nM for partial FXR activation and an  $IC_{50}$  value of  $4.1 \pm 0.4$  nM for sEH inhibition. Broader in vitro characterization of **57** revealed a very favorable selectivity profile over related nuclear receptors and no cytotoxic activity up to a concentration of 100  $\mu$ M. In evaluation of in vitro metabolism **57** turned out to be moderately stable which was confirmed by a moderate half-life in vivo. However, closer evaluation and characterization of the main metabolites indicate that aniline **69a** formed by hydrolysis of the sulfonamide moiety of **57** possesses almost equal potency and is likely to be pharmacologically active, prolonging the dual modulatory effect of **57**.

In HepG2 cells, **57** exerted a partial induction of FXR target genes compared to the endogenous agonist **1b** and the synthetic FXR agonists **1a** and **1c**. This observation in nontransfected liver cells and the fact that the partial agonistic modulation was equal at 1  $\mu$ M and 0.1  $\mu$ M concentrations confirmed the true partial FXR agonistic nature of the dual modulator **57**, although some variations in the relative efficacy of **57** compared to **1a–c** were observed for distinct genes. The clinical development of obeticholic acid (**1a**)<sup>6</sup> has reported disturbed cholesterol homeostasis upon treatment with the full FXR agonist which seems due to strong repression of the FXR target gene cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase (CYP7A1). This



**Figure 7.** Dual FXR/sEH modulator 57 showed pronounced anti-inflammatory activity in various cell types. It repressed the nuclear factor  $\kappa$ -chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) in HepG2 cells with significantly higher efficacy than FXR agonist **1a**. Moreover, **57** reduced the release of the cytokines TNF $\alpha$  from HuT-78 cells after stimulation with Pam3CSK4 and IL-12 from human monocytes after stimulation with lipopolysaccharide (LPS) while it did not affect the release of the anti-inflammatory cytokine IL-10. The anti-inflammatory effects of **57** were significantly stronger than the effects of FXR agonist **1a**. Values are mean  $\pm$  SEM;  $n \geq 3$ ; (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .



**Figure 8.** In vivo characterization of **57**. (A) In vivo pharmacokinetic evaluation of **57** revealed rapid uptake, high bioavailability, and moderate though acceptable half-life of the dual modulator. **57** achieved effective plasma concentrations above  $IC_{50}$  (sEH) and  $EC_{50}$  (FXR) values for roughly 3.5 h after a single oral dose of 10 mg/kg body weight. (B) An approximately 2-fold increase in EET/DHET ratios in mouse plasma 8 h postdose indicated that **57** inhibited sEH in vivo. (C) Quantification of mRNA levels of FXR target genes BSEP, SHP, CYP7A1, SREBP1c, and FGF15 as well as PPAR $\gamma$  target gene FATP 8 h postdose compared to vehicle treated mice (100%). **57** showed a trend to induction of BSEP and SHP and slightly repressed CYP7A1. Moreover, **57** significantly repressed SREBP1c and significantly induced FGF15 indicating FXR modulation in vivo and potentially beneficial effects in NASH. PPAR $\gamma$  target gene FATP was not modulated in vivo.  $n(\text{vehicle}) = 3$ ;  $n(\text{57}) = 6$ ; (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ ; (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

enzyme constitutes the first and rate-limiting enzyme in metabolic conversion of cholesterol to bile acids, and therefore, full FXR activation blocks one of the main pathways of cholesterol elimination. To reduce this side effect, partial FXR activation seems preferable and quantification of FXR target gene expression profile of HepG2 cells after stimulation with various FXR modulators indicated that **57** has a slightly weaker effect on CYP7A1 expression than the endogenous FXR agonist **1b**. Synthetic FXR agonists **1a** and **1c**, in contrast, caused a markedly stronger repression of CYP7A1 than **1b** or **57**.

Furthermore, FXR target gene expression profile of HepG2 cells after stimulation with **57** suggested beneficial effects on NAFLD and NASH. Recent studies reported reduced serum levels of fibroblast factor 19 (FGF19) in NAFLD and NASH patients<sup>40</sup> and treatment with FGF19 improved insulin sensitivity, lowered body weight, and decreased hepatic fat content in mice. Increased levels of FGF19 were observed under treatment with **1a** and considered as important beneficial pharmacodynamic effect.<sup>12</sup> Induction of PPAR $\alpha$ , which is considered as major regulator of hepatic fatty acid degradation by  $\beta$ -oxidation<sup>41</sup> combined with a repression of hepatic FAS causing reduced fatty acid de novo synthesis, is favorable for reducing hepatic steatosis. Notably, hepatic fat content in NAFLD and NASH is dominated by free fatty acids.<sup>4</sup> This effect may be further enhanced by induction of PDK4 leading to reduced glycolysis and, consequently, to fatty acid utilization for energy generation.<sup>42</sup> Liver-type fatty acid binding protein (FABP1) is involved in numerous physiological processes and globally affects lipid homeostasis. In liver, FABP1 has a cytoprotective role and counters oxidative cell damage.<sup>43</sup> Since oxidative stress in hepatocytes is a major factor in NAFLD/NASH development and manifestation, enhanced expression of FABP1 as exerted by **57** seems favorable in NASH.

Inhibitory potency of **57** on soluble epoxide hydrolase was also studied in a less artificial setting by quantifying the conversion of the deuterated sEH substrate 14,15-EET-d11 in HepG2 cell lysates. In this system, **57** possessed an  $IC_{50}$  value of  $1.6 \pm 0.5$  nM which is in perfect agreement with the results obtained in the cell-free fluorescence-based assay on recombinant protein. Hence, the dual modulator **57** is equally potent in inhibiting the human sEH in the presence of other proteins and cellular components from liver cells.

Inhibition of sEH has been associated with anti-inflammatory effects mediated by reduced NF- $\kappa$ B signaling and TNF $\alpha$  release.<sup>44,45</sup> Accordingly, **57** robustly repressed NF- $\kappa$ B in hepatocarcinoma cells and reduced the Pam3CSK4 stimulated release of TNF $\alpha$  from the T-cell line HuT-78. In both activities, the dual modulator **57** was superior to FXR agonist **1a**, suggesting that the anti-inflammatory effects are due to sEH inhibition. Additionally, **57** diminished the release of the proinflammatory cytokine IL-12 from human monocytes but did not affect the anti-inflammatory cytokine IL-10. FXR agonist **1a** as well as sEH inhibitor **2b** caused NF- $\kappa$ B repression and reduced IL-12 release. In both activities, the dual modulator **57** was superior to the selective compounds **1a** and **2b**, suggesting additive effects.

Encouraged by the promising in vitro profile, we applied **57** to a pilot in vivo study in male wild-type C57BL6/J mice to evaluate pharmacokinetics and pharmacodynamic effects of the dual modulator. **57** displayed favorably rapid uptake and oral bioavailability, and although the molecule possessed a rather short half-life, we observed active concentrations over a period of around 3.5–4 h after a single oral dose of 10 mg/kg body weight. The quantification of FXR target gene mRNA in mouse livers 8 h after application of **57** revealed a clear trend to upregulation of SHP and BSEP that only curiously failed to reach statistical significance and marked effects on the expression of

FGF15 and SREBP1c. CYP7A1 displayed a slight trend to down-regulation. Particularly the induction of BSEP points to activation of FXR by **57** in vivo since this gene is almost exclusively regulated by FXR.<sup>46–48</sup> Moreover, as discussed above, repression of SREBP1c and induction of FGF15 suggest favorable effects in NAFLD/NASH treatment. Concerning sEH inhibition in vivo, we evaluated the effect of **57** on the ratios of sEH substrates (EETs) to sEH products (DHETs) in plasma which were significantly shifted to EETs in mice receiving the dual modulator. This accumulation of EETs indicates that **57** inhibited sEH in vivo as well and might exhibit anti-inflammatory activity which would highly contribute to beneficial effects in NASH.

To our knowledge, the here reported dual modulator **57** that partially activates FXR and inhibits sEH with low nanomolar potency is the first compound with such activity. Its pharmacodynamic effects with modulation of FXR target gene expression and EET/DHET ratios indicate that **57** hits both targets in vivo. For this unique activity, the dual modulator perfectly qualifies for larger animal models to study its therapeutic efficacy and the concept of dual FXR/sEH modulation in NASH and related metabolic or cardiovascular disorders.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemistry. General.** All chemicals and solvents were of reagent grade and used without further purification unless otherwise specified. All reactions were conducted in oven-dried glassware under argon atmosphere and in absolute solvents. NMR spectra were recorded on a Bruker AV 400, Bruker AV 300, Bruker am250xp, or a Bruker AV 500 spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) as reference. Multiplicity is reported: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; dt, doublet of triplets; m, multiplet. Approximate coupling constants ( $J$ ) are shown in hertz (Hz). Mass spectra were obtained on a VG Platform II (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using electrospray ionization (ESI). High resolution mass spectra were recorded on a MALDI LTQ ORBITRAP XL instrument (Thermo Fisher Scientific). Compound purity was analyzed on a Varian ProStar HPLC (SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Canada) equipped with a MultoHigh100 phenyl-5  $\mu$  240 mm + 4 mm column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) using a gradient (H<sub>2</sub>O/MeOH 80:20 + 0.1% formic acid isocratic for 5 min to MeOH + 0.1% formic acid after additional 45 min and MeOH + 0.1% formic acid for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV detection at 245 and 280 nm. Compound **16** was analyzed by elemental analysis because no molecular ion was found in MS. All final compounds for biological evaluation had a purity of  $\geq 95\%$ .

**Preparation of Dual Modulator 57. 1-(4-Amino-1-chlorophenyl)methanamine (58k).** LiAlH<sub>4</sub> (1 M in THF, 16.4 mL, 16.4 mmol, 2.5 equiv) was cooled to 0 °C. 4-Amino-2-chlorobenzonitrile **62** (1.0 g, 6.6 mmol, 1.0 equiv) in 3 mL of THF was slowly added to the mixture. After evolution of H<sub>2</sub> had ceased, the mixture was allowed to warm to room temperature and then refluxed for 16 h. After cooling to room temperature, the mixture was diluted with 10 mL of THF and then cooled to 0 °C. 1 mL of 10% NaOH solution and 1.8 mL of water were added dropwise. The colorless precipitate was filtered through Celite and washed with 15 mL of diethyl ether. Evaporation of the organic solvents from the filtrate yielded **58k** as yellow oil (0.77 g, 75%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 7.11 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 6.58 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 6.48 (dd,  $J$  = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.59 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  = 148.56, 132.33, 129.67, 127.74, 113.63, 112.72, 42.88.

**N-(4-Amino-2-chlorobenzyl)-4-(tert-butyl)benzamide (69a).** 1-(4-Amino-1-chlorophenyl)methanamine **58k** (0.31 g, 2.0 mmol, 1.1 equiv) was dissolved in 10 mL of CHCl<sub>3</sub>. An amount of 5 mL of

NEt<sub>3</sub> was added, and the mixture was cooled to 0 °C. 4-*tert*-Butylbenzoyl chloride **63o** (0.35 mL, 1.8 mmol, 1.0 equiv) was slowly added over 10 min, and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, an amount of 50 mL of 10% aqueous hydrochloric acid was added, phases were separated, and the aqueous layer was washed with 30 mL of EtOAc. The aqueous layer was brought to pH 10 with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and extracted three times with 80 mL of EtOAc at a time. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with petroleum ether/EtOAc (9:1) as mobile phase to obtain **69a** as yellow solid (0.57 g, 97%). *R*<sub>f</sub>(petroleum ether/EtOAc = 2:1) = 0.26. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 7.81 (dt,  $J$  = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.53 (dt,  $J$  = 8.6, 2.3 Hz, 2H), 7.45 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.31 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.15 (dd,  $J$  = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 4.64 (s, 2H), 1.36 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 170.32, 156.67, 140.89, 135.23, 132.33, 131.39, 128.29, 126.59, 122.96, 120.82, 119.16, 42.13, 35.36, 31.54. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 317.14152 for C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O, found 317.14130 [M + H]<sup>+</sup>.

**4-(tert-Butyl)-N-(2-chloro-4-(methylsulfonamido)benzyl)-benzamide (57).** N-(4-Amino-2-chlorobenzyl)-4-(*tert*-butyl)-benzamide **69a** (0.04 g, 0.12 mmol, 1.0 equiv) was dissolved in 5 mL of CHCl<sub>3</sub>, and 0.5 mL of pyridine was added. Mesyl chloride **70** (0.02 mL, 0.14 mmol, 1.2 equiv) was carefully added, and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. Then, an amount of 15 mL of 10% aqueous hydrochloric acid was added and the mixture was extracted three times with 30 mL of EtOAc at a time. The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvent was evaporated in vacuum. Further purification was performed by column chromatography using petroleum ether/EtOAc (4:1) as mobile phase to obtain **57** as colorless solid (0.047 g, 66%). *R*<sub>f</sub>(petroleum ether/EtOAc = 2:1) = 0.13. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 7.80 (dt,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 2H), 7.52 (dt,  $J$  = 8.6, 2.0 Hz, 2H), 7.36 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (dd,  $J$  = 8.4, 2.3 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 2.97 (s, 3H), 1.35 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$  = 170.30, 156.55, 139.90, 134.88, 133.07, 132.46, 130.99, 128.29, 126.56, 121.75, 119.62, 42.06, 39.36, 35.81, 31.55. MS (ESI<sup>-</sup>): *m/z* 393.1 (100, [M - H]<sup>-</sup>). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 395.11907 for C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S, found 395.11892 [M + H]<sup>+</sup>.

For preparation and characterization of compounds **4–56**, **77**, and **78** as well as the respective intermediates, refer to [Supporting Information](#).

**Biological Evaluation. Full Length FXR Transactivation Assay. Plasmids.** pcDNA3-hFXR contains the sequence of human FXR and was already published elsewhere.<sup>49</sup> pGL3basic (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) was used as a reporter plasmid, with a shortened construct of the promoter of the bile salt export protein (BSEP) cloned into the SacI/NheI cleavage site in front of the luciferase gene.<sup>50</sup> pRL-SV40 (Promega) was transfected as a control for normalization of transfection efficiency and cell growth. pSG5-hRXR was already published elsewhere as well.<sup>51</sup>

**Assay Procedure.** HeLa cells were grown in DMEM high glucose supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. 24 h before transfection, HeLa cells were seeded in 96-well plates with a density of 8000 cells per well. 3.5 h before transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), and 0.5% charcoal-stripped FCS. Transient transfection of HeLa cells with BSEP-pGL3, pRL-SV40, and the expression plasmids pcDNA3-hFXR and pSG5-hRXR was carried out using calcium phosphate transfection method. 16 h after transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), and 0.5% charcoal-stripped FCS. 24 h after transfection, medium was changed to DMEM without phenol red, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), L-glutamine (2 mM), and 0.5% charcoal-stripped FCS, now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound 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) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with a Tecan Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data multiplied by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of the tested compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of the tested compound at a respective concentration by the fold activation of FXR full agonist **1c** at 3  $\mu\text{M}$ .  $\text{EC}_{50}$  and standard error of the mean values were calculated with the mean relative activation values of at least three independent experiments by SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) using a four-parameter logistic regression. The assay was validated with FXR agonists **1a** ( $\text{EC}_{50} = 0.16 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ,  $87 \pm 3\%$  rel max act.), **1b** ( $\text{EC}_{50} = 18 \pm 1 \mu\text{M}$ ,  $88 \pm 3\%$  rel max act.), and **1c** ( $\text{EC}_{50} = 0.51 \pm 0.16 \mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  defined as 100%).<sup>15</sup>

**sEH Activity Assay.** The sEH inhibitory potency of the compounds was determined in a fluorescence-based 96-well sEH activity assay using recombinant human enzyme.<sup>52,53</sup> Nonfluorescent PHOME (3-phenylcyano-(6-methoxy-2-naphthalenyl)methyl ester 2-oxiraneacetic acid; Cayman Chemicals) which can be hydrolyzed by the sEH to fluorescent 6-methoxynaphthaldehyde served as substrate. Recombinant human sEH (in Bis-Tris buffer, pH 7, with 0.1 mg/mL BSA containing a final concentration of 0.01% Triton-X 100) was preincubated with test compounds (in DMSO, final DMSO concentration of 1%) for 30 min at room temperature. Then, substrate was added (final concentration of 50  $\mu\text{M}$ ) and hydrolysis of the substrate was determined by measuring fluorescent product formation on a Tecan Infinite F200 Pro ( $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$ ) for 30 min (one point every minute). A blank control (no protein and no compound) and a positive control (no compound) were executed. All experiments were conducted in triplicate and repeated in at least three independent experiments. For  $\text{IC}_{50}$  calculation, dose-response curves of increasing compound concentrations were recorded.

**Hybrid Reporter Gene Assays for PPAR $\alpha/\gamma/\delta$ , LXR $\alpha/\beta$ , RXR $\alpha/\beta/\gamma$ , RAR $\alpha/\beta/\gamma$ , VDR, CAR, and PXR. Plasmids.** The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-hPPAR $\alpha$ -LBD,<sup>54</sup> pFA-CMV-hPPAR $\gamma$ -LBD,<sup>54</sup> pFA-CMV-hPPAR $\delta$ -LBD,<sup>54</sup> pFA-CMV-hLXR $\alpha$ -LBD,<sup>30</sup> pFA-CMV-hLXR $\beta$ -LBD,<sup>30</sup> pFA-CMV-hRXR $\alpha$ -LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hRXR $\beta$ -LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hRXR $\gamma$ -LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hRAR $\alpha$ -LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hRAR $\beta$ -LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hRAR $\gamma$ -LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hVDR-LBD,<sup>55</sup> pFA-CMV-hCAR-LBD,<sup>55</sup> and pFA-CMV-hPXR-LBD<sup>55</sup> coding for the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the canonical isoform of the respective nuclear receptor have been reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth.

**Assay Procedure.** HEK293T cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$ . The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ( $2.5 \times 10^4$  cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega), and pFA-CMV-hRXR $\alpha$ -LBD. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in triplicates, and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (12–14 h) incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo luciferase assay system (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of trans-

fection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of a test compound at a respective concentration by the fold activation of a respective reference agonist at 1  $\mu\text{M}$  (PPAR $\alpha$ , GW7647; PPAR $\gamma$ , pioglitazone; PPAR $\delta$ , L165,041; LXR $\alpha/\beta$ , T0901317; RXRs, bexarotene; RARs, tretinoin; VDR, calcitriol; CAR, CITCO; PXR, SR12813). All hybrid assays were validated with the above-mentioned reference agonists which yielded  $\text{EC}_{50}$  values in agreement with literature.

#### Target Gene Quantification (Quantitative Real-Time PCR).

FXR target gene quantification was performed as described previously.<sup>15</sup> In brief, HepG2 cells were incubated with test compound **57** (0.1  $\mu\text{M}$  and 1  $\mu\text{M}$ ) or **1b** (50  $\mu\text{M}$ ) or 0.1% DMSO alone as untreated control for 8 or 16 h, harvested, washed with cold phosphate buffered saline (PBS), and then directly used for RNA extraction. An amount of 2  $\mu\text{g}$  of total RNA was extracted from HepG2 cells by the total RNA Mini Kit (R6834-02, Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA). RNA was reverse-transcribed into cDNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (4368814, Thermo Fischer Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol. FXR target gene expression was evaluated by quantitative real time PCR analysis with a StepOnePlus System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using PowerSYBRGreen (Life Technologies; 12.5  $\mu\text{L}$  per well). The primers are listed in the Supporting Information. Each sample was set up in duplicates and repeated in at least four independent experiments. The expression was quantified by the comparative  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as reference gene. Results (expressed as mean  $\pm$  SEM % expression compared to vehicle (0.1% DMSO) which was set as 100%;  $n \geq 4$ ) were the following: BSEP: **1a** (1  $\mu\text{M}$ ),  $970 \pm 148$ ; **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $557 \pm 28$ ; **1c** (3  $\mu\text{M}$ ),  $819 \pm 68$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $216 \pm 18$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $222 \pm 20$ . SHP: **1a** (1  $\mu\text{M}$ ),  $416 \pm 41$ ; **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $368 \pm 35$ ; **1c** (3  $\mu\text{M}$ ),  $245 \pm 30$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $242 \pm 61$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $317 \pm 78$ . CYP7A1: **1a** (1  $\mu\text{M}$ ),  $0.19 \pm 0.04$ ; **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $34 \pm 12$ ; **1c** (3  $\mu\text{M}$ ),  $0.03 \pm 0.01$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $50 \pm 7$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $52 \pm 8$ . PPAR $\alpha$ : **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $289 \pm 59$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $170 \pm 11$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $211 \pm 10$ . SREBP1c: **1a** (1  $\mu\text{M}$ ),  $51 \pm 3$ ; **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $45 \pm 7$ ; **1c** (3  $\mu\text{M}$ ),  $34 \pm 2$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $49 \pm 17$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $36 \pm 12$ . FAS: **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $34 \pm 14$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $22 \pm 8$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $38 \pm 15$ . FGF19: **1a** (1  $\mu\text{M}$ ),  $640 \pm 99$ ; **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $407 \pm 42$ ; **1c** (3  $\mu\text{M}$ ),  $529 \pm 27$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $309 \pm 101$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $325 \pm 77$ . PDK4: **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $284 \pm 50$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $255 \pm 54$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $226 \pm 57$ . FABP1: **1b** (50  $\mu\text{M}$ ),  $249 \pm 17$ ; **57** (0.1  $\mu\text{M}$ ),  $183 \pm 34$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $194 \pm 42$ . CD36: pioglitazone (1  $\mu\text{M}$ ),  $353 \pm 43$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $119 \pm 33$ ; **57** (10  $\mu\text{M}$ ),  $129 \pm 42$ . FAM3A: pioglitazone (1  $\mu\text{M}$ ),  $310 \pm 66$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $112 \pm 12$ ; **57** (10  $\mu\text{M}$ ),  $142 \pm 7$ . NF- $\kappa\text{B}$ : **1a** (1  $\mu\text{M}$ ),  $29.0 \pm 0.1$ ; **2b** (10  $\mu\text{M}$ ),  $22.9 \pm 3.1$ ; **57** (1  $\mu\text{M}$ ),  $17.6 \pm 0.8$ ; dexamethasone (1  $\mu\text{M}$ ),  $59.4 \pm 11.4$ .

**Cellular sEH Assay.** Quantification of cellular sEH metabolic activity was performed as described by Zha et al.<sup>56</sup> Accordingly, 1  $\mu\text{g}$  of total cell homogenate from HepG2 cells (diluted in 100  $\mu\text{L}$  of PBS containing 0.1 mg/mL BSA) was incubated with varying concentrations of **57**, *N*-cyclohexyl-*N'*-(4-iodophenyl)urea (CIU, 10  $\mu\text{M}$ )<sup>35</sup> as positive control, or vehicle (DMSO in a final concentration of 1%) as negative control for 15 min at 37 °C. An amount of 25 ng of ( $\pm$ )14(15)-EET-d11 (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA) was added, and incubation was continued for additional 10 min at 37 °C. A blank test was performed with PBS (containing 0.1 mg/mL BSA) treated likewise. The reactions were stopped by adding 100  $\mu\text{L}$  of ice cold methanol. After centrifugation (2000 rpm, 4 °C, 5 min), supernatants were analyzed by LC-MS/MS and the amounts of ( $\pm$ )14(15)-EET-d11 and the corresponding ( $\pm$ )14(15)-DHET-d11 were determined. Quantification of ( $\pm$ )14(15)-EET-d11 and ( $\pm$ )14(15)-DHET-d11 from supernatants was performed by LC-MS according to the procedure reported for quantification of EETs and DHETs from mouse plasma (see below). Results (expressed as mean ( $\pm$ )14(15)-EET-d11/( $\pm$ )14(15)-DHET-d11 ratio  $\pm$  SEM;  $n = 3$ )

were the following: blank (w/o cells),  $499 \pm 123$ ; DMSO (1%),  $63 \pm 16$ ; CIU ( $10 \mu\text{M}$ ),  $519 \pm 55$ ; S7,  $0.001 \mu\text{M}$ ,  $191 \pm 7$ ;  $0.01 \mu\text{M}$ ,  $396 \pm 65$ ;  $0.1 \mu\text{M}$ ,  $442 \pm 7$ ;  $1 \mu\text{M}$ ,  $602 \pm 56$ ;  $10 \mu\text{M}$ ,  $614 \pm 96$ .

**Quantification of TNF $\alpha$  Release from HuT-78 Cells.** HuT-78 cells were grown in RPMI 1640, supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were seeded in 6-well plates ( $2.0 \times 10^6$  cells/well) with RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was repeated independently at least three times. After 24 h the medium was changed to RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and Pam3CSK4 (20 ng/mL), additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Following overnight (18 h) incubation, the supernatants were collected and assayed for TNF $\alpha$  using the Novex TNF- $\alpha$  human ELISA kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Absorbance at 450 nm was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH).

**Cytokine Quantification from Primary Human Monocytes. Macrophage Differentiation.** Monocytes were freshly isolated from leukocyte concentrates (Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie DRK-Blutspendedienst, Frankfurt, Germany). For this purpose, blood samples were drawn with the informed consent of the patients. Leukocytes were isolated by dextran sedimentation for 30 min followed by 10 min centrifugation, without deceleration, at 800g on Nycoprep cushions (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) sedimented on top of the separation medium were collected and washed twice with warm PBS (37 °C). The cell pellet was then resuspended in RPMI1640, and the suspension was transferred to 24-well plates for adherence. After 1 h incubation (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, humidified atmosphere) adherent monocytes were washed twice with RPMI1640 to remove residual lymphocytes. Cells were then differentiated into macrophages by treatment with GM-CSF (10 ng/mL) for 7 days and additionally with IFN $\gamma$  (10 ng/mL) for the last 48 h. Cells were then stimulated with LPS (100 ng/mL) and the test compounds for 16 h, and cytokine formation in the supernatants was analyzed by cytometric bead array.

**Cytometric Bead Array.** IL-10 and IL-12p70 levels in the macrophage supernatants were determined using cytometric bead array (CBA) Flex Sets (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's protocol. Measurements were carried out using a BD FACSVers flow cytometer and FACSuite and FCAP Array software version 3.0.

**Animal Study. Animals and Compound Application.** Nine male C57BL/6J mice (23–26 g body weight, purchased from Janvier Labs, France) were used in the present study. The animals were housed in a temperature-controlled room (20–24 °C) and maintained in a 12 h light/12 h dark cycle. Food and water were available ad libitum. The in life phase was performed by the contract research organization Pharmacelsius (Saarbrücken, Germany). All experimental procedures were approved by and conducted in accordance with the regulations of the local animal welfare authorities (Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Abteilung Lebensmittel- und Veterinärwesen, Saarbrücken). Six animals received a single oral dose of 10 mg/kg body weight of dual modulator S7 in water containing 1% HPMC/Tween 80 (99:1). Three animals received the vehicle (water containing 1% HPMC/Tween 80 (99:1)). All animals behaved normally throughout the study and showed no adverse effects.

**Blood and Liver Sampling.** At six time points (15, 30, 60, 120, 240, and 480 min after application of S7), blood (20  $\mu\text{L}$ ) of the six restrained and conscious mice was obtained from the lateral tail vein. For the last time-point (480 min), mice were anesthetized under isoflurane and blood ( $\sim 500 \mu\text{L}$ ) was obtained by retro-orbital puncture. A part of the blood was centrifuged (6000 rpm, 10 min, +4 °C) to obtain plasma for quantification of EET/DHET ratio and

stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until further evaluation. For liver collection, mice were sacrificed by cervical dislocation after the last blood sampling (8 h postdose). Complete liver was immediately snap-frozen and stored at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  until further evaluation. Plasma and liver were equally obtained from three control mice which received oral application of the vehicle (1% HPMC/Tween 80 (99:1)).

**Quantification of S7 from Blood Samples. Calibration Samples.** Stock solutions of the test items (1 mg/mL in DMSO) were diluted in DMSO to a final concentration of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (start solution). Further working solutions were prepared by dilution of the working solutions in DMSO. Individual stock solutions were used for preparation of calibration standards and QCs. Calibration standards and QCs were prepared by spiking 20  $\mu\text{L}$  of drug free blank blood with 2.4  $\mu\text{L}$  of working solution. Accordingly, unknown samples, zero samples, and blanks were spiked with 2.4  $\mu\text{L}$  of DMSO. The calibration standards and quality controls were prepared in duplicates. A volume of 40  $\mu\text{L}$  of acetonitrile containing the internal standard (griseofulvin, 600 ng/mL) was added to 22.4  $\mu\text{L}$  of unknown sample, zero sample, calibration standard, and QC sample. Acetonitrile without internal standard was added to blank samples. All samples were vigorously shaken and centrifuged for 10 min at 6000g and room temperature. The particle free supernatant (50  $\mu\text{L}$ ) was diluted with an equal volume water. An aliquot was transferred to 200  $\mu\text{L}$  sampler vials and subsequently subjected to LC-MS with an injection volume of 15  $\mu\text{L}$ .

**LC-MS Analysis.** The HPLC pump flow rate was set to 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ , and the compounds were separated on a Kinetex Phenyl-Hexyl, 2.6  $\mu\text{m}$ , 50 mm  $\times$  2.1 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) analytical column with a precolumn (Kinetex Phenyl-Hexyl, SecurityGuard Ultra, 2.1 mm). Gradient elution with water and 0.1% formic acid as aqueous phase (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid as organic phase (B) was used: % B ( $t$  (min)), 0 (0–0.1) to 97 (0.4–1.7) to 0 (1.8–3.0). Full scan mass spectra were acquired in the positive ion mode using syringe pump infusion to identify the protonated quasi-molecular ions  $[M + H]^+$ . Autotuning was carried out for maximizing ion abundance followed by the identification of characteristic fragment ions using a generic parameter set: ion-transfer capillary temperature 350 °C, capillary voltage 3.8 kV, collision gas 0.8 mbar of argon, sheath gas, ion sweep gas, and auxiliary gas pressures were 20, 2, and 8 (arbitrary units), respectively.

**Pharmacokinetic analysis** was performed applying a noncompartment model using the Kinetica 5.0 software (Thermo Scientific, Waltham, USA).

**Quantification of FXR Target Gene mRNA from Mouse Livers: Hepatocyte Isolation of Mouse Liver Tissue for RT-qPCR.** To homogenize the liver samples, one-third of each liver was placed on one Falcon cell strainer with 40  $\mu\text{m}$  pore size (BD Bioscience, Erembodegem, Belgium) in a 50 mL Falcon tube. Every tissue was rinsed with PBS buffer containing 10% FCS and 1% PenStrep and pressed through the cell strainer until 5 mL of cell suspension had been collected. The samples were centrifuged at 1200 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the pellets were washed with 5 mL of cold PBS buffer and again centrifuged at 1200 rpm for 10 min at 4 °C. After discarding the supernatant, the cell pellets were resuspended in 1 mL of PBS and total RNA was extracted using the E. Z. A. total RNA kit I (Omega Bio-Tek Inc., Narcoss, GA, USA) following the animal tissue protocol. The extracted RNA was used for qRT-PCR and equally treated as described for mRNA quantification from HepG2 cells (see above). PCR primers for the murine genes are listed in the Supporting Information. Results (expressed as mean  $\pm$  SEM % change in expression compared to vehicle set as 100%;  $n = 6$  for S7,  $n = 3$  for vehicle). **BSEP:** vehicle,  $105 \pm 24$ ; S7 (10 mg/kg),  $312 \pm 103$ . **SHP:** vehicle,  $108 \pm 29$ ; S7 (10 mg/kg),  $410 \pm 147$ . **CYP7A1:** vehicle,  $106 \pm 25$ ; S7 (10 mg/kg),  $70 \pm 11$ . **SREBP1c:** vehicle,  $82 \pm 14$ ; S7 (10 mg/kg),  $17 \pm 10$ . **FGF15:** vehicle,  $119 \pm 15$ ; S7 (10 mg/kg),  $254 \pm 9$ . **FATP:** vehicle,  $101 \pm 1$ ; S7 (10 mg/kg),  $105 \pm 5$ .

**EET/DHET Ratio Analysis from Mouse Plasma Samples (Determination of Epoxyeicosatrienoic Acids (EETs) and Their Metabolites Dihydroxyepoxyeicosatrienoic Acids (DHETs) by LC-MS/MS).** 8.9-EET, 11.12-EET, and their dehydro-



metabolites content of the extracted samples were analyzed employing liquid chromatography tandem mass spectroscopy (LC–MS/MS). The LC–MS/MS system comprised an API 5500 QTrap (AB Sciex, Darmstadt, Germany), equipped with a Turbo-V-source operating in negative ESI mode, an Agilent 1200 binary HPLC pump and degasser (Agilent, Waldbronn, Germany), and an HTC Pal autosampler (Chromtech, Idstein, Germany) fitted with a 25  $\mu$ L LEAP syringe (Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, Germany). High purity nitrogen for the mass spectrometer was produced by a NGM 22-LC/MS nitrogen generator (cmc Instruments, Eschborn, Germany). All compounds were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA). Stock solutions with 2500 ng/mL of all analytes were prepared in methanol. Working standards with a concentration range of 0.1–250 ng/mL were obtained by further dilution for epoxyeicosatrienoic acids and their dehydrometabolites. Extraction of mouse plasma samples was performed by liquid–liquid extraction. An amount of 150  $\mu$ L of sample/matrix homogenate was gently mixed with 20  $\mu$ L of internal standard (8,9-EET-d8 and 11,12-EET-d8 with a concentration of 200 ng/mL in methanol) and was extracted twice with 600  $\mu$ L of ethyl acetate. To prepare samples for standard curve and quality control, an amount of 150  $\mu$ L of PBS was added, additional 20  $\mu$ L of methanol, 20  $\mu$ L of working standard, and 20  $\mu$ L of internal standard were added instead of 150  $\mu$ L of matrix homogenates. The organic solvent was evaporated at a temperature of 45 °C under a gentle stream of nitrogen. The residues were reconstituted with 50  $\mu$ L of methanol/water (50:50, v/v), centrifuged for 2 min at 10 000g, and then transferred to glass vials (Macherey-Nagel, Düren, Germany) prior to injection into the LC–MS/MS system. For the chromatographic separation a Gemini NX C18 column and precolumn were used (150 mm  $\times$  2 mm i.d., 5  $\mu$ m particle size, and 110 Å pore size from Phenomenex, Aschaffenburg, Germany). A linear gradient was employed at a flow rate of 0.5 mL/min mobile phase with a total run time of 17.5 min. Mobile phase was A, water/ammonia (100:0.05, v/v), and B, acetonitrile/ammonia (100:0.05, v/v). The gradient started from 85% A to 10% within 12 min; this was held for 1 min at 10% A. Within 0.5 min the mobile phase shifted back to 85% A and was held for 3.5 min to equilibrate the column for the next sample. The injection volume of samples was 20  $\mu$ L. Quantification was performed with Analyst Software version 1.5.1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) employing the internal standard method (isotope-dilution mass spectrometry). Ratios of analyte peak area and internal standard area (*y*-axis) were plotted against concentration (*x*-axis), and calibration curves were calculated by least-squares regression with 1/*c*<sup>2</sup> weighting. Results were the following (expressed as mean ratio  $\pm$  SEM; *n* = 6 for 57, *n* = 3 for vehicle). **8,9-EET/8,9-DHET**: vehicle, 0.40  $\pm$  0.03; 57 (10 mg/kg), 0.63  $\pm$  0.03. **11,12-EET/11,12-DHET**: vehicle, 0.15  $\pm$  0.01; 57 (10 mg/kg), 0.25  $\pm$  0.03.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00398.

Preparation, purification, and characterization of test compounds 4–56 and the respective intermediates, methods for molecular docking, determination of aqueous solubility, metabolism study and isothermal titration calorimetry, PCR primer sequences, and supporting figures (PDF)

Molecular formula strings and in vitro biological activity (CSV)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +49 69 798 29327. Fax: +49 69 798 29332. E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de.

## ORCID

Ewgenij Proschak: 0000-0003-1961-1859

Daniel Merk: 0000-0002-5359-8128

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The FXR-LBD was a generous gift from Dr. Krister Bamberg (AstraZeneca, Mölndal, Sweden). This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; Sachbeihilfe PR1405/2-2; Heisenbergstipendium PR1405/3-1; SFB 1039 Teilprojekte A07 and Z01).

## ■ ABBREVIATIONS USED

approx, approximately; BSEP, bile salt export protein; CAR, constitutive androstane receptor; CD36, scavenger receptor 3B; CDCA, chenodeoxycholic acid; CIU, *N*-cyclohexyl-*N'*-(iodophenyl)urea; *c*<sub>max</sub>, maximum plasma concentration; CYP7A1, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; Da, Dalton; DHET, dihydroxyeicosatrienoic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide; EET, epoxyeicosatrienoic acid; FABP1, fatty acid binding protein 1; FAM3A, cytokine-like protein 2-19; FAS, fatty acid synthase; FATP, fatty acid transport protein; FCS, fetal calf serum; FGF15, fibroblast factor 15; FGF19, fibroblast factor 19; fl, full length; FXR, farnesoid X receptor; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GLUT4, glucose transporter type 4; HeLa cells, human cervical cancer cells; HepG2 cells, human hepatocarcinoma cells; HPMC, hydroxypropylmethylcellulose; Hut-78 cells, human lymphoma T-cells; IL, interleukin; ITC, isothermal titration calorimetry; *K*<sub>d</sub>, dissociation constant; LLOQ, lower limit of quantification; LXR, liver X receptor; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; Opti-MEM, reduced-serum medium; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PHOME, 3-phenylcyano-(6-methoxy-2-naphthalenyl)methyl ester 2-oxiraneacetic acid; PIO, pioglitazone; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PXR, pregnane X receptor; QC, quality control; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RAR, retinoic acid receptor; rel, relative; RLU, relative light units; RXR, retinoid X receptor; sEH, soluble epoxide hydrolase; SHP, small heterodimer partner; SREBP1c, sterol regulatory element-binding protein 1c; *t*<sub>1/2</sub>, half-life; *t*<sub>max</sub>, plasma peak concentration time; VDR, calcitriol receptor/vitamin D receptor; w/o, without; WST, water-soluble tetrazolium

## ■ REFERENCES

- (1) Rinella, M. E. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review. *JAMA* **2015**, *313* (22), 2263–2273.
- (2) Gawrieh, S.; Chalasani, N. Pharmacotherapy for Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin. Liver Dis.* **2015**, *35* (3), 338–348.
- (3) Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J. E.; Diehl, A. M.; Brunt, E. M.; Cusi, K.; Charlton, M.; Sanyal, A. J. The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* **2012**, *55* (6), 2005–2023.
- (4) Arab, J. P.; Karpen, S. J.; Dawson, P. A.; Arrese, M.; Trauner, M. Bile Acids and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Molecular Insights and Therapeutic Perspectives. *Hepatology* **2017**, *65* (1), 350–362.

- (5) Adorini, L.; Pruzanski, M.; Shapiro, D. Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Drug Discovery Today* **2012**, *17* (17–18), 988–997.
- (6) Neuschwander-Tetri, B. A.; Loomba, R.; Sanyal, A. J.; Lavine, J. E.; Van Natta, M. L.; Abdelmalek, M. F.; Chalasani, N.; Dasarthy, S.; Diehl, A. M.; Hameed, B.; Kowdley, K. V.; McCullough, A.; Terrault, N.; Clark, J. M.; Tonascia, J.; Brunt, E. M.; Kleiner, D. E.; Doo, E. Farnesoid X Nuclear Receptor Ligand Obeticholic Acid for Non-Cirrhotic, Non-Alcoholic Steatohepatitis (FLINT): A Multicentre, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* **2015**, *385* (9972), 956–965.
- (7) 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* (5418), 1362–1365.
- (8) 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.; Lehmann, J. M. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* **1999**, *284* (5418), 1365–1368.
- (9) 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* (5), 543–553.
- (10) Gadaleta, R. M.; Cariello, M.; Sabbà, C.; Moschetta, A. Tissue-Specific Actions of FXR in Metabolism and Cancer. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2015**, *1851*, 30–39.
- (11) Pellicciari, R.; Costantino, G.; Fiorucci, S. Farnesoid X Receptor: From Structure to Potential Clinical Applications. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (17), 5383–5403.
- (12) Mudaliar, S.; Henry, R. R.; Sanyal, A. J.; Morrow, L.; Marschall, H. U.; Kipnes, M.; Adorini, L.; Sciacca, C. I.; Clopton, P.; Castelloe, E.; Dillon, P.; Pruzanski, M.; Shapiro, D. Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients with Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **2013**, *145* (3), 574–582.
- (13) Ali, A. H.; Carey, E. J.; Lindor, K. D. Recent Advances in the Development of Farnesoid X Receptor Agonists. *Ann. Transl. Med.* **2015**, *3* (1), 5.
- (14) Merk, D.; Gabler, M.; Gomez, R. C.; Flesch, D.; Hanke, T.; Kaiser, A.; Lamers, C.; Werz, O.; Schneider, G.; Schubert-Zsilavecz, M. Anthranilic Acid Derivatives as Novel Ligands for Farnesoid X Receptor (FXR). *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (8), 2447–2460.
- (15) Merk, D.; Lamers, C.; Ahmad, K.; Gomez, R. C.; Schneider, G.; Steinhilber, D.; Schubert-zsilavecz, M. Extending the Structure–Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives As Farnesoid X Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (19), 8035–8055.
- (16) Merk, D.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M. Medicinal Chemistry of Farnesoid X Receptor Ligands: From Agonists and Antagonists to Modulators. *Future Med. Chem.* **2012**, *4* (8), 1015–1036.
- (17) 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* (5), 1789–1808.
- (18) Imig, J. D. Epoxides and Soluble Epoxide Hydrolase in Cardiovascular Physiology. *Physiol. Rev.* **2012**, *92* (1), 101–130.
- (19) Huang, H.; Weng, J.; Wang, M.-H. EETs/sEH in Diabetes and Obesity-Induced Cardiovascular Diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* **2016**, *125*, 80–89.
- (20) Harris, T. R.; Hammock, B. D. Soluble Epoxide Hydrolase: Gene Structure, Expression and Deletion. *Gene* **2013**, *526* (2), 61–74.
- (21) Liu, Y.; Dang, H.; Li, D.; Pang, W.; Hammock, B. D.; Zhu, Y. Inhibition of Soluble Epoxide Hydrolase Attenuates High-Fat-Diet-Induced Hepatic Steatosis by Reduced Systemic Inflammatory Status in Mice. *PLoS One* **2012**, *7* (6), e39165.
- (22) Schuck, R. N.; Zha, W.; Edin, M. L.; Gruzdev, A.; Vendrov, K. C.; Miller, T. M.; Xu, Z.; Lih, F. B.; DeGraff, L. M.; Tomer, K. B.; Jones, H. M.; Makowski, L.; Huang, L.; Poloyac, S. M.; Zeldin, D. C.; Lee, C. R. The Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway Regulates the Hepatic Inflammatory Response in Fatty Liver Disease. *PLoS One* **2014**, *9* (10), e110162.
- (23) Sanyal, A. J. Novel Therapeutic Targets for Steatohepatitis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **2015**, *39* (Suppl. 1), S46–S50.
- (24) Milic, S.; Mikolasevic, I.; Krznaric-Zrnica, I.; Stanic, M.; Poropat, G.; Stimac, D.; Vlahovic-Palcevski, V.; Orlic, L. Nonalcoholic Steatohepatitis: Emerging Targeted Therapies to Optimize Treatment Options. *Drug Des., Dev. Ther.* **2015**, *9*, 4835–4845.
- (25) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (21), 6523–6543.
- (26) Morphy, R.; Rankovic, Z. Designing Multiple Ligands - Medicinal Chemistry Strategies and Challenges. *Curr. Pharm. Des.* **2009**, *15* (6), 587–600.
- (27) Bansal, Y.; Silakari, O. Multifunctional Compounds: Smart Molecules for Multifactorial Diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 31–42.
- (28) Peters, J.-U. Polypharmacology - Foe or Friend? *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 8955–8971.
- (29) Merk, D.; Lamers, C.; Weber, J.; Flesch, D.; Gabler, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M. Anthranilic Acid Derivatives as Nuclear Receptor modulators—Development of Novel PPAR Selective and Dual PPAR/FXR Ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (3), 499–514.
- (30) Lamers, C.; Merk, D.; Gabler, M.; Flesch, D.; Kaiser, A.; Schubert-Zsilavecz, M. SAR Studies on FXR Modulators Led to the Discovery of the First Combined FXR antagonistic/TGR5 Agonistic Compound. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (2), 133–148.
- (31) Flesch, D.; Gabler, M.; Lill, A.; Gomez, R. C.; Steri, R.; Schneider, G.; Stark, H.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Fragmentation of GW4064 Led to a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist with Improved Drug-like Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (13), 3490–3498.
- (32) Gomez, G. A.; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. Structure of Human Epoxide Hydrolase Reveals Mechanistic Inferences on Bifunctional Catalysis in Epoxide and Phosphate Ester Hydrolysis. *Biochemistry* **2004**, *43* (16), 4716–4723.
- (33) Kompa, A. R.; Wang, B. H.; Xu, G.; Zhang, Y.; Ho, P.-Y.; Eisennagel, S.; Thalji, R. K.; Marino, J. P.; Kelly, D. J.; Behm, D. J.; Krum, H. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibition Exerts Beneficial Anti-Remodeling Actions Post-Myocardial Infarction. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *167* (1), 210–219.
- (34) Maloney, P. R.; Parks, D. J.; Haffner, C. D.; Fivush, A. M.; Chandra, G.; Plunket, K. D.; Creech, K. L.; Moore, L. B.; Wilson, J. G.; Lewis, M. C.; Jones, S. A.; Willson, T. M. Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (16), 2971–2974.
- (35) Morisseau, C.; Goodrow, M. H.; Newman, J. W.; Wheelock, C. E.; Dowdy, D. L.; Hammock, B. D. Structural Refinement of Inhibitors of Urea-Based Soluble Epoxide Hydrolases. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63* (9), 1599–1608.
- (36) Jones, P. D.; Wolf, N. M.; Morisseau, C.; Whetstone, P.; Hock, B.; Hammock, B. D. Fluorescent Substrates for Soluble Epoxide Hydrolase and Application to Inhibition Studies. *Anal. Biochem.* **2005**, *343* (1), 66–75.
- (37) Costantino, G.; Entrena-Guadix, A.; Macchiarulo, A.; Gioiello, A.; Pellicciari, R. Molecular Dynamics Simulation of the Ligand Binding Domain of Farnesoid X Receptor. Insights into Helix-12 Stability and Coactivator Peptide Stabilization in Response to Agonist Binding. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (9), 3251–3259.
- (38) Ratziu, V.; Harrison, S. A.; Franque, S.; Bedossa, P.; Lehert, P.; Serfaty, L.; Romero-Gomez, M.; Boursier, J.; Abdelmalek, M.; Caldwell, S.; Drenth, J.; Anstee, Q. M.; Hum, D.; Hanf, R.; Roudot, A.; Megnien, S.; Staels, B.; Sanyal, A.; Mathurin, P.; Gournay, J.; Nguyen-Khac, E.; De Ledinghen, V.; Larrey, D.; Tran, A.; Bourliere, M.; Maynard-Muet, M.; Asselah, T.; Henrion, J.; Nevens, F.; Cassiman, D.; Geerts, A.; Moreno, C.; Beuers, U. H.; Galle, P. R.; Spengler, U.; Bugianesi, E.; Craxi, A.; Angelico, M.; Fargion, S.; Voiculescu, M.; Gheorghe, L.; Preotescu, L.; Caballeria, J.; Andrade, R.

- J.; Crespo, J.; Callera, J. L.; Ala, A.; Aithal, G.; Abouda, G.; Luketic, V.; Huang, M. A.; Gordon, S.; Pockros, P.; Poordad, F.; Shores, N.; Moehlen, M. W.; Bambha, K.; Clark, V.; Satapathy, S.; Parekh, S.; Reddy, R. K.; Sheikh, M. Y.; Szabo, G.; Vierling, J.; Foster, T.; Umpierrez, G.; Chang, C.; Box, T.; Gallegos-Orozco, J. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  and - $\delta$ , Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **2016**, *150* (5), 1147–1159.
- (39) Schuck, R. N.; Zha, W.; Edin, M. L.; Gruzdev, A.; Vendrov, K. C.; Miller, T. M.; Xu, Z.; Lih, F. B.; DeGraff, L. M.; Tomer, K. B.; Jones, H. M.; Makowski, L.; Huang, L.; Poloyac, S. M.; Zeldin, D. C.; Lee, C. R. The Cytochrome P450 Epoxygenase Pathway Regulates the Hepatic Inflammatory Response in Fatty Liver Disease. *PLoS One* **2014**, *9* (10), e110162.
- (40) Alisi, A.; Ceccarelli, S.; Panera, N.; Prono, F.; Petrini, S.; De Stefanis, C.; Pezzullo, M.; Tozzi, A.; Villani, A.; Bedogni, G.; Nobili, V. Association between Serum Atypical Fibroblast Growth Factors 21 and 19 and Pediatric Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One* **2013**, *8* (6), e67160.
- (41) Lamers, C.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Therapeutic Modulators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR): A Patent Review (2008–present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2012**, *22* (7), 803–841.
- (42) Savkur, R. S.; Bramlett, K. S.; Michael, L. F.; Burris, T. P. Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression by the Farnesoid X Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329* (1), 391–396.
- (43) Wang, G.; Bonkovsky, H. L.; de Lemos, A.; Burczynski, F. J. Recent Insights into the Biological Functions of Liver Fatty Acid Binding Protein 1. *J. Lipid Res.* **2015**, *56* (12), 2238–2247.
- (44) Dong, L.; Zhou, Y.; Zhu, Z.-Q.; Liu, T.; Duan, J.-X.; Zhang, J.; Li, P.; Hammock, B. D.; Guan, C.-X. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor Suppresses the Expression of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 by Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation in Murine Macrophage. *Inflammation* **2017**, *40* (1), 13–20.
- (45) Zhou, Y.; Liu, T.; Duan, J.-X.; Li, P.; Sun, G.-Y.; Liu, Y.-P.; Zhang, J.; Dong, L.; Lee, K. S. S.; Hammock, B. D.; Jiang, J.-X.; Guan, C.-X. Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury and Improves Survival in Mice. *Shock* **2017**, *47* (5), 638–645.
- (46) Trauner, M.; Boyer, J. L. Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* **2003**, *83* (2), 633–671.
- (47) Soroka, C. J.; Boyer, J. L. Biosynthesis and Trafficking of the Bile Salt Export Pump, BSEP: Therapeutic Implications of BSEP Mutations. *Mol. Aspects Med.* **2014**, *37*, 3–14.
- (48) Schmidt, J.; Klingler, F.-M.; Proschak, E.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac Do Not Interact with Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14782.
- (49) Steri, R.; Achenbach, J.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, 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* (12), 1674–1681.
- (50) Ananthanarayanan, M.; Balasubramanian, N.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D. J.; Suchy, F. J. Human Bile Salt Export Pump Promoter Is Transactivated by the Farnesoid X Receptor/bile Acid Receptor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (31), 28857–28865.
- (51) 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, Mol. Cell Biol. Lipids* **2007**, *1771* (7), 864–872.
- (52) Klingler, F.-M.; Wolf, M.; Wittmann, S.; Gribbon, P.; Proschak, E. Bacterial Expression and HTS Assessment of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase. *J. Biomol. Screening* **2016**, *21* (7), 689–694.
- (53) Blöcher, R.; Lamers, C.; Wittmann, S. K.; Merk, D.; Hartmann, M.; Weizel, L.; Diehl, O.; Brüggerhoff, A.; Boß, M.; Kaiser, A.; Schader, T.; Göbel, T.; Grundmann, M.; Angioni, C.; Heering, J.; Geisslinger, G.; Wurglics, M.; Kostenis, E.; Brüne, B.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M.; Kahnt, A. S.; Proschak, E. N-Benzylbenzamide: A Novel Merged Scaffold for Orally Available Dual Soluble Epoxide Hydrolase/peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Modulators. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (1), 61–81.
- (54) Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-Tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**, *72* (10), 881–887.
- (55) Flesch, D.; Cheung, S.-Y.; Schmidt, J.; Gabler, M.; Heitel, P.; Kramer, J. S.; Kaiser, A.; Hartmann, M.; Lindner, M.; Lüddens-Dämgen, K.; Heering, J.; Lamers, C.; Lüddens, H.; Wurglics, M.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7199–7205.
- (56) Zha, W.; Edin, M. L.; Vendrov, K. C.; Schuck, R. N.; Lih, F. B.; Jat, J. L.; Bradbury, J. A.; DeGraff, L. M.; Hua, K.; Tomer, K. B.; Falck, J. R.; Zeldin, D. C.; Lee, C. R. Functional Characterization of Cytochrome P450-Derived Epoxyeicosatrienoic Acids in Adipogenesis and Obesity. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (10), 2124–2136.



#### 11.4 Structural optimization and *in vitro* profiling of *N*-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*)

Schmidt, J., Schierle, S., Gellrich, L., Kaiser, A., Schubert-Zsilavecz, M., & Merk, D. (2018). Structural optimization and *in vitro* profiling of *N*-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26 (14), 4240-4253.

DOI: 10.1016/j.bmc.2018.07.017

Link: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808961831006X>

*Reproduced with permission from* Schmidt, J., Schierle, S., Gellrich, L., Kaiser, A., Schubert-Zsilavecz, M., & Merk, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2018, 26 (14), 4240-4253. Copyright 2018. This manuscript version is made available under the CC-BY-NC-ND 4.0 license <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



# Structural optimization and *in vitro* profiling of *N*-phenylbenzamide-based farnesoid X receptor antagonists



Jurema Schmidt, Simone Schierle, Leonie Gellrich, Astrid Kaiser, Daniel Merk\*

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

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Metabolic syndrome  
Non-alcoholic steatohepatitis  
Nuclear receptor modulator  
Bile acid receptor

## ABSTRACT

Activation of the nuclear farnesoid X receptor (FXR) which acts as cellular bile acid sensor has been validated as therapeutic strategy to counter liver disorders such as non-alcoholic steatohepatitis by the clinical efficacy of obeticholic acid. FXR antagonism, in contrast, is less well studied and potent small molecule FXR antagonists are rare. Here we report the systematic optimization of a novel class of FXR antagonists towards low nanomolar potency. The most optimized compound antagonizes baseline and agonist induced FXR activity in a full length FXR reporter gene assay and represses intrinsic expression of FXR regulated genes in hepatoma cells. With this activity and a favorable toxicity-, stability- and selectivity-profile it appears suitable to further study FXR antagonism *in vitro* and *in vivo*.

## 1. Introduction

The nuclear farnesoid X receptor (FXR) is a ligand-activated transcription factor and a key metabolic regulator that acts as cellular sensor for bile acids.<sup>1–3</sup> It takes part in the self-regulation of bile acid homeostasis with the result that bile acid synthesis is blocked and their catabolism is enhanced when high levels of toxic bile acids occur. Hence, FXR is an important liver protector.<sup>4</sup> Moreover, FXR is involved in glucose and lipid homeostasis regulation and seems to have anti-inflammatory effects. The most potent endogenous FXR activator is the bile acid chenodeoxycholic acid (**1a**, CDCA, *Scheme 1*).<sup>3</sup> Furthermore, a number of synthetic FXR agonists and antagonists were discovered in the past years.<sup>5</sup> Their diversity, however, is confined to few scaffolds. The 6 $\alpha$ -ethyl derivative of **1a**, obeticholic acid (**1b**, OCA), was the first FXR agonist to gain market approval while the most widely used non-steroidal FXR agonist, the synthetic isoxazole GW4064 (**2a**), is not suitable as drug due to toxicity and poor bioavailability.<sup>6</sup> However, replacement of the stilbene moiety and the di-chlorinated phenyl group led to Tropifexor (**2b**, LJN452), which has already reached phase 2 clinical trials for primary biliary cholangitis (PBC) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH) treatment.<sup>7</sup> In addition to these full agonists, several partial agonists were developed to prevent hyperactivation and reduce side effects.<sup>8–10</sup>

Thus, FXR agonists are widely available and FXR activation is already validated as therapeutic strategy for several liver disorders and metabolic diseases. In contrast, antagonism on FXR needs further

investigation to uncover its potential therapeutic value. FXR seems to be overexpressed in some cancer cells, especially in pancreatic and colon cancer,<sup>11</sup> Barrett's Esophagus and adenoma suggesting therapeutic potential for FXR antagonism<sup>12</sup> and on the other hand it might be a treatment strategy for cholestasis. However, in hepatic cancer, reduced FXR activity is connected with tumor growth and FXR antagonism might disturb adipogenesis.<sup>13</sup> As a consequence of impaired bile acid metabolism through FXR antagonism, high levels of bile acids could also lead to liver toxicity.

The most described FXR antagonist is Guggulsterone (**1c**), which is extracted from the gum resin of *Commiphora mukul*. The extract contains a number of compounds, but the isolated stereoisomers E- and Z-Guggulsterone showed a decline of hepatic cholesterol in rodent models.<sup>14</sup> **1c** inhibits CDCA-induced FXR activation by blocking co-activator recruitment. Still, the precise mechanism of action of **1c** remains to be elucidated and the compound is known to modulate various other nuclear receptors limiting its use as tool compound.<sup>15</sup> According to recent studies, inhibition of intestinal FXR activity through glycine- $\beta$ -muricholic acid (**1d**, Gly- $\beta$ -MCA) reduced weight gain, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and insulin resistance in obese mice.<sup>16</sup> Intestinal FXR knockout abrogated these beneficial metabolic effects.<sup>16,17</sup> Altogether, the study suggests significant therapeutic value of FXR antagonism but only few non-steroidal FXR antagonist chemotypes were reported including 1,3,4-trisubstituted-pyrazolones (e.g. **3**),<sup>18</sup> pyrazole-4-carboxamides (e.g. **4**),<sup>19</sup> benzimidazoles (e.g. **5**)<sup>20</sup>, NDB (**6**)<sup>21</sup> and GW4064-analogue **2c**<sup>22</sup> with *in vitro* potencies ranging

\* Corresponding author.

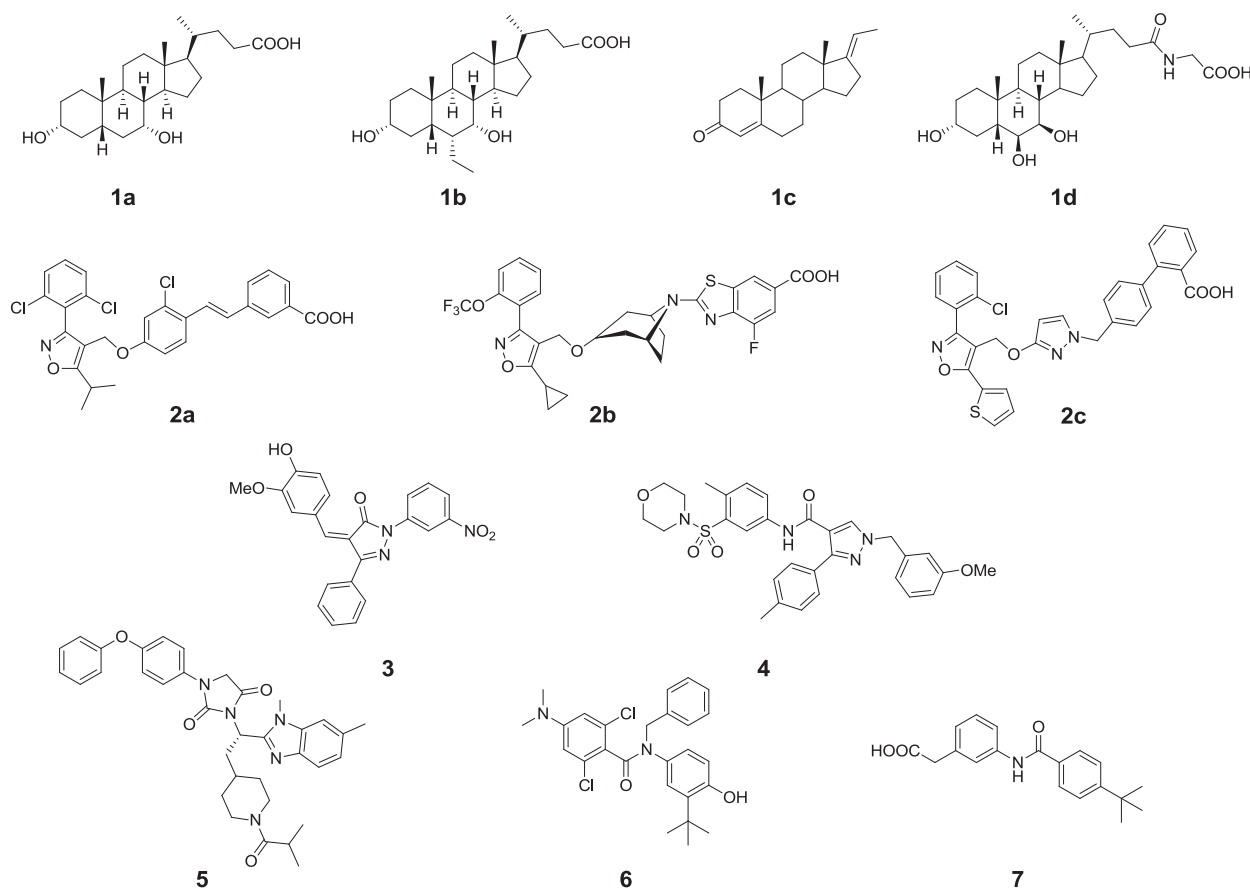
E-mail address: [merk@pharmchem.uni-frankfurt.de](mailto:merk@pharmchem.uni-frankfurt.de) (D. Merk).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.017>

Received 26 May 2018; Received in revised form 8 July 2018; Accepted 10 July 2018

Available online 11 July 2018

0968-0896/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

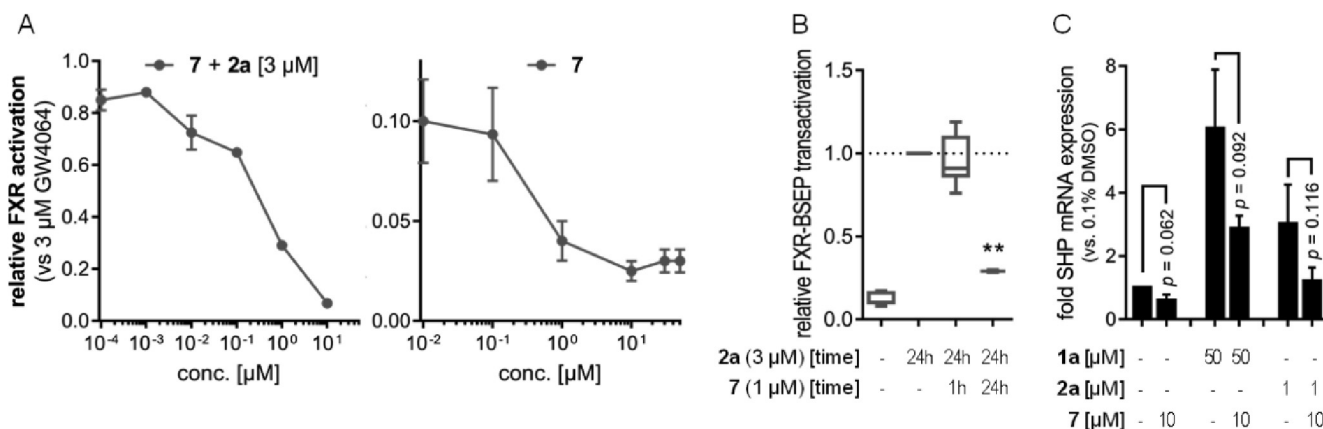


**Scheme 1.** Natural and synthetic FXR ligands: Steroidal agonists CDCA (**1a**) and OCA (**1b**), antagonists (Z)-Guggulsterone (**1c**) and Gly-β-MCA (**1d**). Synthetic agonists GW4064 (**2a**) and Tprofexor (**2b**) and antagonists **2c** & **3–6**. Antagonistic lead compound **7**.

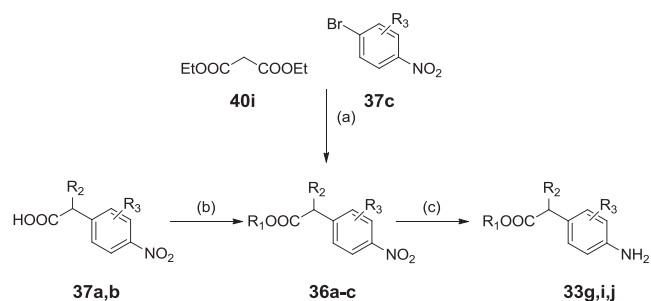
from 0.04 to 12.2  $\mu\text{M}$ . Therefore, novel potent, non-steroidal and selective FXR antagonists are required to further study FXR antagonism as potential therapeutic strategy.<sup>5,13,22</sup>

During structure activity relationship (SAR) studies on partial FXR agonists<sup>9,10</sup> we discovered marked FXR antagonistic potency of **7**. It robustly reduced baseline FXR activity in our bile salt export protein (BSEP)-based full-length FXR reporter gene assay with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $0.35 \pm 0.04 \mu\text{M}$  and competed with reference FXR agonist **2a** ( $3 \mu\text{M}$ )

with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $0.44 \pm 0.15 \mu\text{M}$  (Fig. 1A). However, a similar scaffold as **7** has been reported as potential firefly luciferase inhibitor<sup>23</sup> which might affect our reporter gene assay leading to false positive results. To exclude such activity, we conducted two control experiments. First, we fully induced firefly expression in our assay with **2a** ( $3 \mu\text{M}$ ) and added **7** ( $10 \mu\text{M}$ ) only one hour before cell lysis which had no effect on firefly activity (Fig. 1B). If **7** would directly bind and inhibit the enzyme firefly luciferase, reduced firefly activity would be



**Fig. 1.** Characterization of lead compound **7**: (A) Compound **7** antagonized GW4064-induced (left panel) and intrinsic (right panel) FXR activity in a bile salt export protein (BSEP)-based fFXR reporter gene assay (mean  $\pm$  SEM,  $n \geq 4$ ). (B) When **7** ( $1 \mu\text{M}$ ) was added one hour before lysis to cells treated with GW4064 (**2a**,  $3 \mu\text{M}$ ) for 23 h in the reporter gene assay, no effect on firefly activity was observed (mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ). Would **7** directly bind and inhibit firefly luciferase, the compound would also lower firefly activity in this setting. When **2a** and **7** were co-incubated for 24 h, significant (\*\* $p < 0.01$ ) repression of firefly activity was observed confirming that **7** is not a firefly inhibitor but that its effects are FXR mediated. (C) Compound **7** suppressed intrinsic, GW4064- and CDCA-induced expression of FXR target gene small heterodimer partner (SHP) in HepG2 cells (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ).



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) NaH, DMF, 0 °C–80 °C, 16 h (b) SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C–80 °C, 2 h (c) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH, rt, 16 h.

observable in this experiment. Second, we studied the effect of **7** on the expression of the FXR regulated gene small heterodimer partner (SHP). **7** diminished baseline SHP expression and GW4064-induced as well as CDCA-induced SHP expression (Fig. 1C). Thus, the control experiments confirmed FXR mediated activity of **7** and we selected the compound as lead for FXR modulator development.

## 2. Results

### 2.1. Chemistry

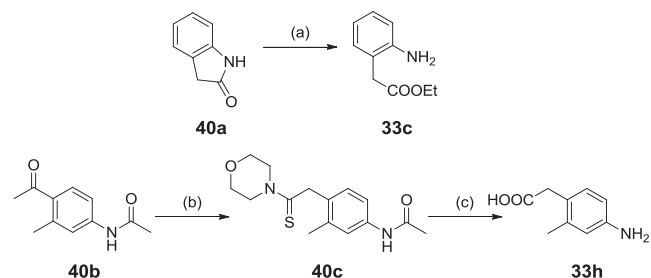
N-Phenylbenzamides **7–32** were prepared according to Schemes 2–5.

Anilines **33a,b,d–f** were commercially available, derivatives **33c,g–j** were synthesized. **36c** was prepared from bromo-nitrobenzene **37c** and diethyl malonate **40i** with NaH in DMF. Carboxylic acids **37a,b** were esterified with SOCl<sub>2</sub> in MeOH to **36a–c** before their nitro groups were reduced to amines using Pd/C and H<sub>2</sub> to obtain the anilines **33g,i,j**.

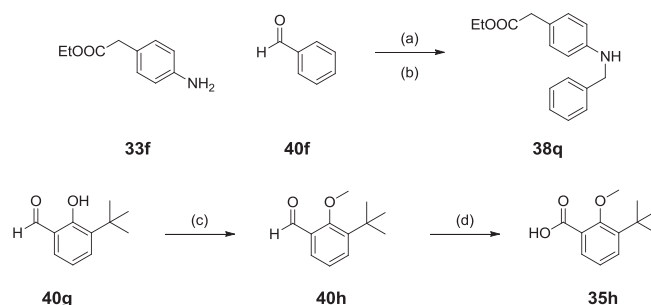
Ester **33c** was synthesized by ring opening of lactam **40a** under acidic conditions. Precursor **33h** was obtained in a two-step Willgerodt-Kindler reaction starting with **40b**, sulfur and morpholine.

N-substituted derivative **38q** was available by reductive amination of ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and benzaldehyde (**40f**) with NaBH(OAc)<sub>3</sub>. Benzoic acid **35h** was synthesized from salicyl aldehyde **40g** through methylation of the alcohol with MeI followed by oxidation of the aldehyde using KMnO<sub>4</sub>.

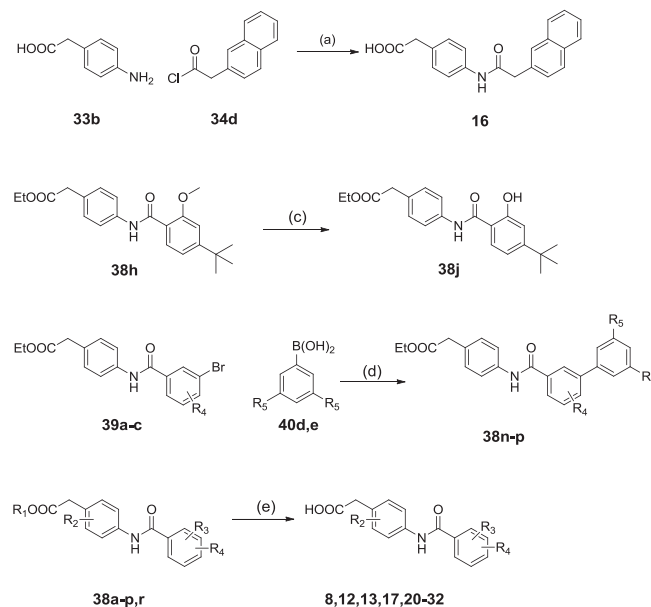
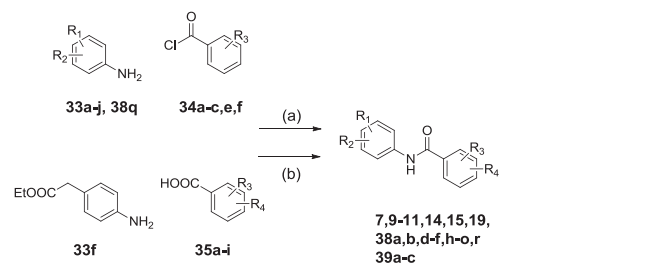
Building blocks **33a–j** and **38q** were fused with carbonyl chlorides **34a–f** in the presence of pyridine or by coupling with carboxylic acids **35a–i** in the presence of EDC and 4-DMAP leading to compounds **7, 9–11, 14, 15, 19**, esters **38a,b,d–f,h–o,r**, and **39a–c**. Bromides **39a–c** were coupled with boronic acids **40d,e** under Suzuki conditions to yield esters **38n–p**. The methoxy group of **38h** was cleaved to a free hydroxyl function in **38j** by BBr<sub>3</sub>. As final step, all esters **38a–p,r** were hydrolyzed under basic conditions to compounds **8, 12, 13, 17, 20–32** (Scheme 5).



**Scheme 3.** Reagents and conditions: (a) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, EtOH, 80 °C, 16 h (b) sulfur, morpholine, 135 °C, 6 h (c) KOH, EtOH, 80 °C, 6 h.



**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) HOAc, DCE, rt, 2 h (b) NaBH(OAc)<sub>3</sub>, rt, 16 h (c) MeI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, rt, 18 h (d) KMnO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, acetone, rt, 18 h.



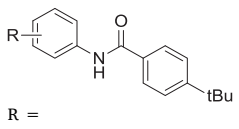
**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) pyridine, DMF, THF, rt, 2 h (b) EDC·HCl, DMAP, CHCl<sub>3</sub>, 0 °C–80 °C, 4 h (c) BBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C–rt, 2 h (d) Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, EtOH, toluene, 80 °C, 16 h (e) LiOH, THF, H<sub>2</sub>O, 60 °C, 16 h.

### 2.2. Biological evaluation

FXR antagonists **7–32** were characterized *in vitro* in a full-length FXR reporter gene assay relying on a FXR inducible firefly luciferase under the control of the human FXR response element from the promoter region of FXR target gene BSEP. The assay was conducted in HeLa cells that were transiently transfected by the calcium phosphate method with constitutive (CMV promoter) expression plasmids for the full-length human FXR and its heterodimer partner RXR, the FXR inducible firefly construct as reporter gene and a constitutively active *renilla* luciferase (SV40 promoter) for transfection efficiency normalization and toxicity control. For antagonistic characterization, dose-response curves were recorded for **7–32** in competition with FXR agonist **2a** at 3 μM.

**Table 1**

FXR-antagonistic potency of compounds **7–11** in competition with **2a** (3  $\mu$ M) *in vitro* (mean  $\pm$  SEM, n  $\geq$  4).

ID		IC <sub>50</sub> (hFXR) [ $\mu$ M]
	R =	
<b>7</b>	3-CH <sub>2</sub> -COOH	0.4 $\pm$ 0.2
<b>8</b>	2-CH <sub>2</sub> -COOH	0.102 $\pm$ 0.007
<b>9</b>	4-CH <sub>2</sub> -COOH	0.076 $\pm$ 0.009
<b>10</b>	4-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	0.63 $\pm$ 0.03
<b>11</b>	4-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	0.7 $\pm$ 0.1

### 2.3. Structure-activity relationship

With **7** as lead pharmacophore, we explored the structure activity relationship of this novel class of nonsteroidal FXR antagonists by systematically evaluating all molecular building blocks. We entered this FXR antagonist optimization with identifying the most suitable position and length of the acidic side chain (**7–11**, Table 1). Compared to 2-(3-phenyl)acetic acid in **7**, 2-(2-phenyl)acetic acid **8** and 2-(4-phenyl)acetic acid **9** improved FXR antagonistic activity with **9** as slightly more potent isomer. Chain elongation from 2-(4-phenyl)acetic acid **9** to 3-(4-phenyl)propionic acid **10** and 4-(4-phenyl)butyric acid **11** diminished potency rendering **9** as improved lead for further optimization.

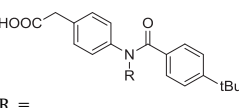
Using **9** as lead, we evaluated optimization potential of introducing substituents at the amide nitrogen (Table 2) but neither a small methyl group in **12** nor a bulky lipophilic benzyl substituent in **13** retained the nanomolar potency of **9**.

Further focusing on **9** as lead, we then replaced the 4-*tert*-butyl moiety by alternative bulky and lipophilic residues (Table 3). Both naphthyl isomers **14** and **15** were significantly less active and introduction of a methylene linker in **16** strongly diminished potency to intermediate micromolar values. Biphenyls **17–19** displayed a distinguished SAR with 2-biphenyl **17** being inactive, 3-biphenyl **18** being almost equally potent as **9** and 4-biphenyl **19** as intermediate FXR antagonist. In previous FXR modulator SAR studies,<sup>24</sup> we had observed potent antagonistic activity of a 3-(3,5-dichlorophenyl)pyridine scaffold which was compatible for combination with 3-biphenyl **18**. However, the SAR of this compound series turned out different as introduction of two chlorine atoms in **20** significantly diminished potency.

As no improvement in potency compared to **9** was achieved with alternative lipophilic backbones (**14–20**) or residues on the amide bond (**12**, **13**), we analyzed the potential of introducing further substituents on **9** (Table 4). Systematic introduction of an additional methyl group in every free position of the acidic head group scaffold (**21–23**) only revealed comparable potency for 3-methyl derivative **22** suggesting that this position might offer an opportunity for optimization. However, even slight enlargement to a methoxy group (**24**) caused a significant loss in antagonistic activity. Both,  $\alpha$ -methyl analogue **21** and 2-methyl derivative **23** were significantly less active than **9** and indicated that

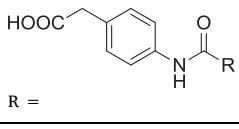
**Table 2**

FXR-antagonistic potency of compounds **12** and **13** in competition with **2a** (3  $\mu$ M) *in vitro* (mean  $\pm$  SEM, n  $\geq$  4).

ID		IC <sub>50</sub> (hFXR) [ $\mu$ M]
	R =	
<b>9</b>	-H	0.076 $\pm$ 0.009
<b>12</b>	-CH <sub>3</sub>	8.1 $\pm$ 0.6
<b>13</b>	-CH <sub>2</sub> -Ph	2.2 $\pm$ 0.4

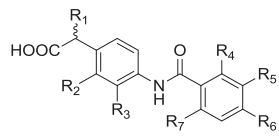
**Table 3**

FXR-antagonistic potency of compounds **14–20** in competition with **2a** (3  $\mu$ M) *in vitro* (mean  $\pm$  SEM, n  $\geq$  4).

ID		IC <sub>50</sub> (hFXR) [ $\mu$ M]
	R =	
<b>9</b>	4- <i>t</i> Bu-Ph	0.076 $\pm$ 0.009
<b>14</b>	1-naphthyl	0.81 $\pm$ 0.02
<b>15</b>	2-naphthyl	0.68 $\pm$ 0.01
<b>16</b>	-CH <sub>2</sub> -2-naphthyl	27 $\pm$ 1
<b>17</b>	2-biphenyl	Inactive at 30 $\mu$ M
<b>18</b>	3-biphenyl	0.28 $\pm$ 0.02
<b>19</b>	4-biphenyl	0.85 $\pm$ 0.01
<b>20</b>	3',5'-dichloro-3-biphenyl	9.1 $\pm$ 0.2

**Table 4**

FXR-antagonistic potency of compounds **21–32** in competition with **2a** (3  $\mu$ M) *in vitro* (mean  $\pm$  SEM, n  $\geq$  4).

ID								IC <sub>50</sub> (hFXR) [ $\mu$ M]
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	
<b>9</b>	H	H	H	H	H	<i>t</i> Bu	H	0.076 $\pm$ 0.009
<b>21</b>	-CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	<i>t</i> Bu	H	0.97 $\pm$ 0.04
<b>22</b>	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	H	<i>t</i> Bu	H	0.08 $\pm$ 0.01
<b>23</b>	H	H	-CH <sub>3</sub>	H	H	<i>t</i> Bu	H	1.5 $\pm$ 0.3
<b>24</b>	H	-OCH <sub>3</sub>	H	H	H	<i>t</i> Bu	H	3.7 $\pm$ 0.2
<b>25</b>	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	H	<i>t</i> Bu	H	0.0092 $\pm$ 0.0006
<b>26</b>	H	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	<i>t</i> Bu	H	0.22 $\pm$ 0.01
<b>27</b>	H	H	H	-OH	H	<i>t</i> Bu	H	0.14 $\pm$ 0.03
<b>18</b>	H	H	H	H	-Ph	H	H	0.28 $\pm$ 0.02
<b>28</b>	H	H	H	H	H	<i>t</i> Bu	H	0.19 $\pm$ 0.02
<b>29</b>	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	<i>t</i> Bu	H	H	3.3 $\pm$ 0.3
<b>30</b>	H	H	H	H	<i>t</i> Bu	H	-OCH <sub>3</sub>	Inactive at 30 $\mu$ M
<b>31</b>	H	H	H	-OCH <sub>3</sub>	-Ph	H	H	5 $\pm$ 1
<b>32</b>	H	H	H	H	-Ph	H	-OCH <sub>3</sub>	0.17 $\pm$ 0.02

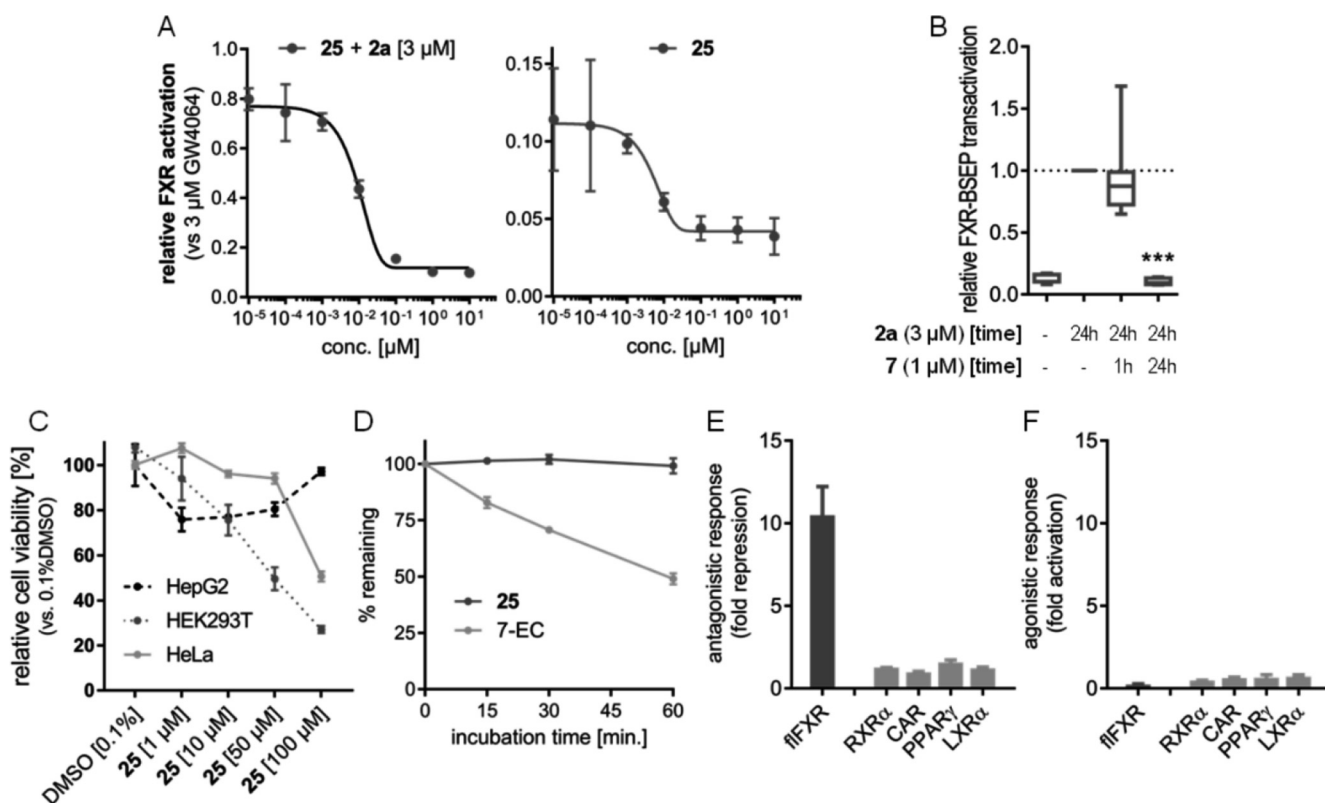
expansion in these positions was not tolerated. Thus, further variations in the 2-(4-aminophenyl)acetic acid head group failed to improve potency.

Next, we focused on the 4-*tert*-butylbenzamide moiety as remaining molecular building block to be optimized. Shifting the *tert*-butyl residue from 4 (**9**) to 3-position (**28**) only slightly diminished potency and was superior to 3-biphenyl **18** suggesting that the *tert*-butyl substituent was already an optimal moiety for FXR antagonism. Following a similar strategy as for the 2-(4-aminophenyl)acetic acid group by introducing methoxy groups in the free positions of **9** produced a remarkable improvement in antagonistic activity for 4-*tert*-butyl-2-methoxybenzamide **25** which revealed a single-digit nanomolar IC<sub>50</sub> value. The 3-methoxy isomer **26** was significantly less active. Replacing the 2-methoxy substituent (**25**) by a 2-hydroxy group (**27**) to eventually enhance polarity and solubility failed to retain high potency of **25**. In an attempt to combine our findings, we also studied the introduction of methoxy groups in the favorable 3-biphenyl (**18**) and 3-*tert*-butyl (**28**) derivatives but neither combination (**29–32**) revealed a comparable low nanomolar activity as **25** rendering 4-*tert*-butyl-2-methoxybenzamide **25** the most potent FXR modulator of this study.

### 2.4. *In vitro* pharmacological characterization

FXR modulator **25** was, therefore, characterized in more detail *in vitro*. **25** competed with **2a** (3  $\mu$ M) in our assay with an IC<sub>50</sub> value of 9.2  $\pm$  0.6 nM and antagonized intrinsic FXR activation with an IC<sub>50</sub>





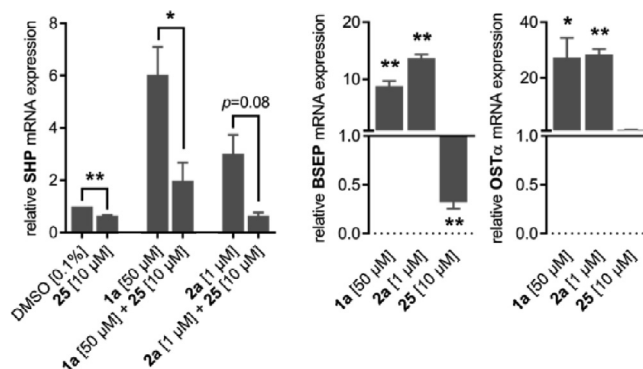
**Fig. 2.** *In vitro* profiling of FXR antagonist **25**: (A) **25** repressed intrinsic FXR activity (light grey) and antagonized GW4064-induced FXR activity (dark grey) in the full-length FXR reporter gene assay with low nanomolar  $IC_{50}$  values (mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ). (B) Control experiments revealed no direct influence on firefly luciferase activity (incubation with **25** for 1 h) whereas 24 h co-incubation significantly ( $*** p < 0.001$ ) repressed firefly activity confirming FXR-mediated effects of **25** (mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ). (C) **25** possessed no cytotoxicity in HepG2 cells up to 100  $\mu$ M or in HeLa cells up to 50  $\mu$ M while HEK293T cells were more sensitive and revealed marked toxic effects above 10  $\mu$ M (mean  $\pm$  SEM,  $n = 4$ ). (D) *In vitro* metabolism studies revealed high microsomal stability of **25** with > 95% parent compound remaining after 60 min incubation (7-EC: 7-ethoxycoumarin as control; mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ). (E/F) Selectivity profiling of **25** on related nuclear receptors revealed no antagonistic (E) or agonistic (F) activity at 1  $\mu$ M concentration (mean  $\pm$  SEM,  $n = 3$ ; reference compounds bexarotene (RXR $\alpha$ ), CITCO (CAR), pioglitazone (PPAR $\gamma$ ) and T0901317 (LXR $\alpha$ ) were used at 1  $\mu$ M concentration).

value of  $1.3 \pm 0.7$  nM (Fig. 2A) rendering the compound one of the most potent FXR antagonists in literature. Control experiments as described above for **7** excluded firefly inhibition by **25** confirming FXR mediated activity (Fig. 2B). **25** turned out non-toxic in a WST-1 assay in HepG2 cells (used for qRT-PCR) up to 100  $\mu$ M and in HeLa cells (used for the reporter gene assay) up to 50  $\mu$ M whereas in HEK293T cells considerable toxicity was observable above 10  $\mu$ M (Fig. 2C). Moreover, antagonist **25** comprised favorable aqueous solubility (16 mg/L) and showed high metabolic stability with 95% of the compound remaining after 60 min incubation with rat liver microsomes (Fig. 2D). Selectivity profiling on nuclear receptors related to FXR (Fig. 2E and F) revealed no agonistic or antagonistic activity of **25** at 1  $\mu$ M on retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), constitutive androstane receptor (CAR), peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), or liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ).

To further analyze FXR modulation by **25**, we studied its effects on FXR regulated gene expression in human hepatocytes (HepG2 cells) on mRNA level by qRT-PCR (Fig. 3). **25** robustly diminished intrinsic expression (compared to 0.1% DMSO) of the FXR target genes small heterodimer partner (SHP) and BSEP but surprisingly had virtually no effect on organic solute transporter  $\alpha$  (OST $\alpha$ ) expression indicating gene selective activity. Moreover, **25** strongly diminished FXR agonist (**1a** or **2a**) induced SHP expression which further confirmed its potent FXR antagonistic activity.

### 3. Discussion & conclusion

FXR is experiencing remarkable interest as innovative drug target for the treatment of liver disorders and metabolic diseases. Particularly



**Fig. 3.** Effects of **25** on FXR regulated gene expression: FXR antagonist **25** significantly diminishes intrinsic expression of FXR target genes small heterodimer partner (SHP) and bile salt export protein (BSEP) but does not affect organic solute transporter  $\alpha$  (OST $\alpha$ ) expression. Values are mean  $\pm$  SEM of mRNA expression compared to DMSO (0.1%) treated cells.  $n = 3$ .  $^* p < 0.05$ ;  $^{**} p < 0.01$ .

the high incidence of NAFLD and NASH as hepatic manifestation of the metabolic syndrome<sup>25</sup> is promoting FXR targeted drug discovery with OCA (**1b**) leading the NASH pipeline.<sup>26</sup> While the clinical efficacy of **1b** has validated FXR activation as therapeutic strategy to counter NAFLD, NASH and the metabolic syndrome, FXR antagonism is far less studied. In contrast to many potent FXR agonists reported in literature, the number and diversity of FXR antagonists are still limited. Several data point to a potential therapeutic value of FXR antagonism including liver

protection in cholestasis<sup>13,27,28</sup> and treatment of some cancers that are characterized by FXR overexpression.<sup>12,13,29</sup> Moreover, also promising metabolic effects of intestine-selective FXR antagonism have been reported<sup>16</sup> that need further evaluation and confirmation. To further study and validate FXR antagonism towards therapeutic applications, novel and more potent FXR antagonists are needed.

Here we report a new class of FXR antagonists that was systematically optimized to **25** comprising low nanomolar potency. Of note, **25** competitively antagonized FXR activation by the reference agonist **2a** but also repressed intrinsic FXR activity in a full-length FXR reporter gene assay and in hepatoma cells indicated by reduced expression of FXR regulated genes SHP and BSEP. Furthermore, FXR antagonist **25** revealed low cytotoxicity, displayed high metabolic stability against microsomal degradation and was selective over related nuclear receptors rendering it a valuable tool to study FXR antagonism *in vitro* and *in vivo*.

## 4. Experimental

### 4.1. General

All chemicals and solvents were of reagent grade and used without further purification unless otherwise specified. All reactions were conducted in oven-dried glassware under argon atmosphere and in absolute solvents. NMR spectra were recorded on a Bruker AV 400, Bruker AV 300, Bruker am250xp, or a Bruker AV 500 spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Chemical shifts ( $\delta$ ) are reported in ppm relative to tetramethylsilane (TMS) as reference. Multiplicity is reported: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; dt, doublet of triplets; m, multiplet. Approximate coupling constants ( $J$ ) are shown in hertz (Hz). Mass spectra were obtained on a VG Platform II (Thermo Fischer Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using electrospray ionization (ESI). High resolution mass spectra were recorded on a MALDI LTQ ORBITRAP XL instrument (Thermo Fisher Scientific). Compound purity was analyzed on a Varian ProStar HPLC (SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Canada) equipped with a MultoHigh100 phenyl-5  $\mu$  240 mm + 4 mm column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) using a gradient (H<sub>2</sub>O/MeOH 80:20 + 0.1% formic acid isocratic for 5 min to MeOH + 0.1% formic acid after additional 45 min and MeOH + 0.1% formic acid for additional 10 min) at a flow rate of 1 mL/min and UV detection at 245 and 280 nm. All final compounds for biological evaluation had a purity of  $\geq 95\%$ .

### 4.2. Synthesis

#### 4.2.1. General procedure A

An aminobenzoic acid or a corresponding ester (**33a–e,g–j**, **38q**, 1.0 eq) was dissolved in THF (abs., 20 mL/mmol), and DMF (abs., 1 mL/mmol) and pyridine (3.0 eq) were added. The respective benzoyl chloride (**34a–c,e,f**, 1.3 eq) was then added dropwise at room temperature. The mixture was stirred for two hours at room temperature. 5% aqueous hydrochloric acid (equal volume as THF) and EtOAc (equal volume as THF) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted twice with EtOAc (equal volume as THF). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography or crystallization.

#### 4.2.2. General procedure B

Ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**, 1.3 eq) was dissolved in CHCl<sub>3</sub> (abs., 25 mL/mmol) and cooled to 0 °C. 4-(Dimethylamino)pyridine (0.10 eq), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (1.1 eq) and the respective benzoic acid (**35a–i**, 1.0 eq) were added. The mixture was warmed to room temperature and afterwards stirred overnight at 80 °C under reflux. 5% aqueous hydrochloric acid (equal

volume as CHCl<sub>3</sub>) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc (equal volume as CHCl<sub>3</sub>). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography or crystallization.

#### 4.2.3. General procedure C

Ester (**38a–p,r**, 1.0 eq) was dissolved in THF (20 mL). H<sub>2</sub>O (2 mL) and LiOH (6.0 eq) were added and the mixture was stirred for 18 h at 60 °C. 5% aqueous hydrochloric acid (20 mL) and EtOAc (20 mL) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2  $\times$  20 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography or crystallization.

#### 4.2.4. 2-(3-(4-*tert*-Butylbenzamido)phenyl)acetic acid (**7**)

Preparation according to general procedure A using 2-(3-amino-phenyl)acetic acid (**33a**) and 4-*tert*-butylbenzoyl chloride (**34a**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.15 g, 50%.  $R_f$ (hexane/EtOAc/acetic acid = 74:24:2) = 0.13. <sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.32 (s, 3H), 3.55 (s, 2H), 6.98–7.00 (d,  $J$  = 7.63 Hz, 1H), 7.26–7.30 (t,  $J$  = 7.84 Hz, 1H), 7.53–7.55 (d,  $J$  = 8.51 Hz, 2H), 7.66–7.71 (m, 2H), 7.88–7.90 (d,  $J$  = 8.49 Hz, 2H), 10.15 (s, 1H), 12.28 (bs, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 30.92, 34.65, 40.97, 118.62, 121.10, 124.60, 125.10, 127.49, 128.41, 132.21, 135.40, 139.22, 154.36, 165.41, 171.95, 172.57. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 312.15941 for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>, found 312.15942 ([M+H]<sup>+</sup>).

#### 4.2.5. 2-(2-(4-*tert*-Butylbenzamido)phenyl)acetic acid (**8**)

Preparation according to general procedure C using **38a**. Crystallization was performed in hexane/EtOAc. Yield 0.20 g, 47%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 9.93 (s, 1H), 7.89–7.87 (m, 2H), 7.55–7.52 (m, 2H), 7.46 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.34–7.27 (m, 2H), 7.20 (td,  $J$  = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 3.65 (s, 2H), 1.32 (s, 9H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 173.26, 165.67, 154.95, 131.45, 131.01, 127.93, 127.69, 126.71, 126.16, 125.86, 125.67, 38.10, 35.14, 31.40. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 312.15942 for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>, found 312.15979 ([M+H]<sup>+</sup>).

#### 4.2.6. 2-(4-(4-*tert*-Butylbenzamido)phenyl)acetic acid (**9**)

Preparation according to general procedure A using 2-(4-amino-phenyl)acetic acid (**33b**) and 4-*tert*-butylbenzoyl chloride (**34a**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.18 g, 58%.  $R_f$ (hexane/EtOAc/acetic acid = 74:24:2) = 0.01. <sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.31 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 7.21–7.23 (d,  $J$  = 8.51 Hz, 2H), 7.53–7.55 (d,  $J$  = 8.51 Hz, 2H), 7.69–7.71 (d,  $J$  = 8.51 Hz, 2H), 7.86–7.89 (d,  $J$  = 8.50 Hz, 2H), 10.13 (s, 1H), 12.29 (bs, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 30.92, 34.65, 120.18, 125.11, 127.47, 129.45, 130.14, 132.25, 137.78, 154.34, 165.35, 172.77. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 312.15942 for C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>3</sub>, found 312.15973 ([M+H]<sup>+</sup>).

#### 4.2.7. 3-(4-(4-*tert*-Butylbenzamido)phenyl)propionic acid (**10**)

Preparation according to general procedure A using 3-(4-amino-phenyl)propionic acid (**33d**) and 4-*tert*-butylbenzoyl chloride (**34a**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.32 g, 98%.  $R_f$ (hexane/EtOAc/acetic acid = 74:24:2) = 0.31. <sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.32 (s, 3H), 2.52–2.54 (m, 2H), 2.78–2.81 (t,  $J$  = 7.56 Hz, 2H), 7.18–7.20 (d,  $J$  = 8.49 Hz, 2H), 7.52–7.54 (d,  $J$  = 8.49 Hz, 2H), 7.65–7.68 (d,  $J$  = 8.52 Hz, 2H), 7.86–7.88 (d,  $J$  = 8.51 Hz, 2H), 10.09 (s, 1H), 12.12 (bs, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100,61 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 29.85, 30.92, 34.64, 35.38, 120.29,

125.09, 127.44, 128.28, 132.31, 136.02, 137.24, 154.28, 165.29. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 326.17507 for  $C_{20}H_{24}NO_3$ , found 326.17484 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.8. 4-(4-(4-*tert*-Butylbenzamido)phenyl)butyric acid (11)

Preparation according to general procedure A using 4-(4-amino-phenyl)butyric acid (**33e**) and 4-*tert*-butylbenzoyl chloride (**34a**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (50:50) as mobile phase. Yield 0.22 g, 64%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 50:50) = 0.11.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 7.88–7.85 (m, 2H), 7.66 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.55–7.51 (m, 2H), 7.15 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 2.56 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 2.21 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 1.83–1.71 (m, 2H), 1.31 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 174.47, 165.49, 154.45, 137.19, 136.86, 132.40, 128.52, 127.57, 125.25, 120.49, 34.77, 33.93, 33.11, 31.04, 26.45. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 340.19072 for  $C_{21}H_{26}NO_3$ , found 340.19093 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.9. 2-(4-(4-*tert*-Butyl-*N*-methylbenzamido)phenyl)acetic acid (12)

**38b** (0.39 g, 1.2 mmol, 1.0 eq) was dissolved in THF (abs., 3 mL) and  $t$ BuONa (0.13 g, 1.4 mmol, 1.2 eq) was added. The mixture was stirred for 15 min at room temperature. Subsequently iodomethane (0.09 mL, 1.4 mmol, 1.2 eq) was added and the mixture was stirred for 12 h at room temperature. Afterwards  $H_2O$  (3 mL) and EtOAc (3 mL) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2  $\times$  3 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$  and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/HOAc (74:24:2) as mobile phase ( $R_f$ (hexane/EtOAc/HOAc = 74:24:2) = 0.26). The residue was then dissolved in THF (20 mL),  $H_2O$  (2 mL) and LiOH (0.03 g, 12.7 mmol, 1.1 eq) were added and the mixture was stirred for 16 h at 60 °C. Afterwards the solution was treated with a 5% aqueous hydrochloric acid. The phases were separated, and the aqueous layer was extracted three times with EtOAc (3  $\times$  20 mL). The combined organic layers were dried over  $Na_2SO_4$  and the solvents were removed in vacuum. No further purification was performed. Yield 0.06 g, 16%.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 7.73–7.66 (m, 6H), 7.56 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 4.03 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 1.68 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 182.18, 180.12, 163.01, 154.73, 144.31, 143.60, 140.66, 139.18, 137.37, 134.99, 50.27, 48.32, 44.87, 41.07, 33.00, 24.03. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 326.17507 for  $C_{20}H_{24}NO_3$ , found 326.17530 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.10. 2-(4-(4-*tert*-Butyl-*N*-benzylbenzamido)phenyl)acetic acid (13)

Preparation according to general procedure C using **38r**. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (78:20:2) as mobile phase. Yield 0.04 g, 29%.  $R_f$  (hexane/EtOAc/acetic acid (78:20:2)) = 0.32.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.32 (s, 1H), 7.32–7.22 (m, 9H), 7.08 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.00 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 5.06 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 1.20 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.37, 169.54, 152.32, 141.68, 137.66, 133.18, 133.15, 130.01, 128.39, 127.59, 127.11, 127.04, 124.61, 53.10, 34.46, 30.88. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 402.20637 for  $C_{26}H_{28}NO_3$ , found 402.20600 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.11. 2-(4-(Naphthalen-1-ylamido)phenyl)acetic acid (14)

Preparation according to general procedure A using 2-(4-amino-phenyl)acetic acid (**33b**) and 1-naphthoyl chloride (**34b**). Further purification was performed by column chromatography with toluene/EtOAc/acetic acid (88:0:2) as mobile phase. Yield 0.36 g, 55%.  $R_f$  (toluene/EtOAc/acetic acid (88:10:2)) = 0.12.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 10.41 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.10–7.99 (m, 4H), 7.75 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.67–7.60 (m, 2H), 7.25 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.90, 165.50, 137.73, 134.28, 132.28, 132.11, 130.56, 129.58, 128.98, 128.03, 127.95, 127.84, 127.70, 126.88, 124.48, 120.31. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 328.09441 for  $C_{19}H_{15}NO_3Na$ , found 328.09443 ( $[M+Na]^+$ ).

#### 4.2.12. 2-(4-(Naphthalen-2-ylamido)phenyl)acetic acid (15)

Preparation according to general procedure A using 2-(4-amino-phenyl)acetic acid (**33b**) and 2-naphthoyl chloride (**34c**). Further purification was performed by column chromatography with toluene/EtOAc/acetic acid (88:10:2) as mobile phase. Yield 0.47 g, 73%.  $R_f$  (toluene/EtOAc/acetic acid (88:10:2)) = 0.13.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.35 (s, 1H), 10.42 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.11–7.99 (m, 4H), 7.76 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.67–7.60 (m, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.86, 165.48, 137.76, 134.27, 132.27, 132.10, 130.40, 129.58, 128.97, 128.01, 127.95, 127.82, 127.69, 126.86, 124.47, 120.31. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 306.11247 for  $C_{19}H_{16}NO_3$ , found 306.11236 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.13. 2-(4-(2-(Naphthalen-2-yl)acetamido)phenyl)acetic acid (16)

Preparation according to general procedure A using 2-(4-amino-phenyl)acetic acid (**33b**) and 2-(naphthalen-2-yl)acetyl chloride (**34d**). Further purification was performed by column chromatography with toluene/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.16 g, 24%.  $R_f$  (toluene/EtOAc/acetic acid (74:24:2)) = 0.41.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.29 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 7.88 (dd,  $J$  = 7.6, 5.2 Hz, 3H), 7.83 (s, 1H), 7.54 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.52–7.45 (m, 3H), 7.18 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.49 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (100,61 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.82, 168.96, 137.76, 133.72, 133.01, 131.85, 129.87, 129.65, 127.73, 127.68, 127.51, 127.45, 127.43, 126.15, 125.62, 119.09, 43.40. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 320.12812 for  $C_{20}H_{18}NO_3$ , found 320.12790 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.14. 2-(4-([1,1'-Biphenyl]-2-carboxamido)phenyl)acetic acid (17)

Preparation according to general procedure C using **38d**. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (78:20:2) as mobile phase. Yield 0.16 g, 42%.  $R_f$ (hexane/EtOAc/acetic acid = 78:20:2) = 0.10.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.30 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 7.57 (dd,  $J$  = 11.1, 4.4 Hz, 2H), 7.50–7.35 (m, 8H), 7.30 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.14 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.48 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.82, 167.72, 140.04, 139.19, 137.60, 137.14, 130.17, 129.97, 129.75, 129.50, 128.30, 128.28, 127.80, 127.29, 127.22, 119.50. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 354.11006 for  $C_{21}H_{17}NO_3Na$ , found 354.11088 ( $[M+Na]^+$ ).

#### 4.2.15. 2-(4-([1,1'-Biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetic acid (18)

Preparation according to general procedure A using 2-(4-amino-phenyl)acetic acid (**33b**) and [1,1'-Biphenyl]-3-carbonyl chloride (**34e**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.04 g, 29%.  $R_f$  (hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2)) = 0.14.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.43 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.91 (dd,  $J$  = 29.0, 8.0 Hz, 2H), 7.79–7.69 (m, 4H), 7.62 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H), 7.42 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 7.25 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 3.53 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.92, 165.29, 140.31, 139.55, 137.57, 135.63, 130.72, 129.75, 129.54, 129.14, 129.05, 127.86, 126.96, 126.85, 125.81, 120.35. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 332.12812 for  $C_{21}H_{18}NO_3$ , found 332.12804 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.16. 2-(4-([1,1'-Biphenyl]-4-carboxamido)phenyl)acetic acid (19)

Preparation according to general procedure A using 2-(4-amino-phenyl)acetic acid (**33b**) and [1,1'-Biphenyl]-4-carbonyl chloride (**34f**). Further purification was performed by column chromatography with DCM/methanol/acetic acid (97:1:2) as mobile phase. Yield 0.04 g, 7%.  $R_f$  (DCM/methanol/acetic acid (97:1:2)) = 0.50.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.35 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 8.06 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.84 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.75 (dd,  $J$  = 13.4, 8.0 Hz, 4H), 7.51 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.43 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.87, 165.05, 143.08, 139.13, 137.73, 133.71, 130.38, 129.55, 129.09, 128.37, 128.17,



126.94, 126.60, 120.30. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 332.12812 for  $C_{21}H_{18}NO_3$ , found 332.12809 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.17. 2-(4-(3',5'-Dichloro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetic acid (20)

Preparation according to general procedure C using **38p**. Yield 0.04 g, 58%. Crystallization was performed in hexane/EtOAc.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.28 (s, 1H), 10.32 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.01–7.96 (m, 2H), 7.88 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2H), 7.72 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.65 (dt,  $J$  = 15.6, 4.8 Hz, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 3.55 (s, 2H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.82, 164.99, 143.06, 137.55, 137.30, 135.71, 134.79, 130.49, 130.15, 129.59, 129.36, 128.20, 127.28, 126.03, 125.72, 120.51, 30.43. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 400.05018 for  $C_{20}H_{24}NO_4$ , found 400.04981 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.18. 2-(4-(4-tert-butylbenzamido)phenyl)propionic acid (21)

Preparation according to general procedure C using **38e**. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (88:10:2) as mobile phase. Yield 0.46 g, 64%. Rf (hexane/EtOAc/acetic acid (88:10:2)) = 0.09.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.26 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.71 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.54 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 3.64 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 1.36 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.32 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 175.48, 165.38, 154.40, 137.94, 136.38, 132.24, 127.54, 127.51, 125.16, 120.37, 44.16, 34.69, 30.95, 18.52. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 326.17485 for  $C_{20}H_{24}NO_3$ , found 326.17541 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.19. 2-(4-(4-tert-Butylbenzamido)-2-methylphenyl)acetic acid (22)

Preparation according to general procedure A using **33h** and 4-tert-butylbenzoyl chloride (**34a**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.04 g, 51%. Rf (hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2)) = 0.39.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 10.07 (s, 1H), 7.90–7.86 (m, 2H), 7.58–7.51 (m, 4H), 7.13 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 3.54 (s, 2H), 2.23 (s, 3H), 1.32 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.72, 172.09, 165.34, 154.37, 137.91, 136.82, 132.30, 130.42, 129.19, 127.51, 125.18, 121.82, 117.84, 30.98, 21.12, 19.43. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 326.17485 for  $C_{20}H_{24}NO_3$ , found 326.17528 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.20. 2-(4-(4-tert-Butylbenzamido)-3-methylphenyl)acetic acid (23)

Preparation according to general procedure C using **38f**. Yield 0.28 g, 86%. Crystallization was performed in hexane/EtOAc.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.30 (s, 1H), 9.76 (s, 1H), 7.91 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.58–7.52 (m, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.14 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H), 7.09 (dd,  $J$  = 8.0, 1.8 Hz, 1H), 3.53 (s, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.32 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.84, 165.25, 154.40, 135.07, 133.49, 132.61, 131.83, 131.29, 127.53, 127.01, 126.47, 125.22, 34.71, 30.99, 17.89. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 326.17485 for  $C_{20}H_{24}NO_3$ , found 326.17507 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.21. 2-(4-(4-tert-Butylbenzamido)-2-methoxyphenyl)acetic acid (24)

Preparation according to general procedure C using **38g**. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (78:20:2) as mobile phase. Yield 0.07 g, 42%. Rf (hexane/EtOAc/acetic acid (78:20:2)) = 0.03.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 10.14 (s, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.54 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.46 (s, 2H), 1.32 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.77, 172.16, 165.46, 157.23, 154.49, 139.44, 132.29, 130.81, 127.54, 125.24, 118.83, 111.85, 103.30, 55.36, 35.12, 34.75, 31.00. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 342.16998 for  $C_{20}H_{24}NO_4$ , found 342.16982 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.22. 2-(4-(4-tert-Butyl-2-methoxybenzamido)phenyl)acetic acid (25)

Preparation according to general procedure C using **38h**. Yield 0.22 g, 86%. Crystallization was performed in EtOAc.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.28 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 7.66 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.60 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.21 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.13–7.06 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), 1.32 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.86, 164.24, 156.42, 155.53, 137.69, 130.04, 129.63, 129.60, 122.00, 119.54, 117.48, 109.08, 55.88, 34.97, 30.96. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 342.16998 for  $C_{20}H_{24}NO_4$ , found 342.17051 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.23. 2-(4-(4-tert-Butyl-3-methoxybenzamido)phenyl)acetic acid (26)

Preparation according to general procedure C using **38i**. Yield 0.24 g, 88%. Crystallization was performed in EtOAc.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.29 (s, 1H), 10.13 (s, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 7.49 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 7.35 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.54 (s, 2H), 1.36 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.83, 165.22, 157.98, 140.92, 137.71, 134.07, 130.24, 129.52, 126.16, 120.35, 119.64, 110.98, 55.43, 34.72, 29.42. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 342.16998 for  $C_{20}H_{24}NO_4$ , found 342.16997 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.24. 2-(4-(4-tert-Butyl-2-hydroxybenzamido)phenyl)acetic acid (27)

Preparation according to general procedure C using **38j**. Yield 0.06 g, 33%. Crystallization was performed in hexane/DCM.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.30 (s, 1H), 11.87 (s, 1H), 10.30 (s, 1H), 7.93 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.62 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.25 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.01 (dd,  $J$  = 8.4, 1.5 Hz, 1H), 6.95 (d,  $J$  = 1.5 Hz, 1H), 3.55 (s, 2H), 1.28 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.76, 166.75, 158.80, 157.24, 136.66, 130.85, 129.66, 128.55, 120.97, 116.40, 114.17, 113.90, 34.66, 30.72. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 328.15433 for  $C_{19}H_{22}NO_4$ , found 328.15427 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.25. 2-(4-(3-tert-Butylbenzamido)phenyl)acetic acid (28)

Preparation according to general procedure C using **38k**. No further purification was performed. Yield 0.10 g, 60%.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.07 (s, 1H), 10.19 (s, 1H), 7.92 (t,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.77 (dd,  $J$  = 6.6, 1.4 Hz, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.62 (ddd,  $J$  = 7.8, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 7.45 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 3.54 (s, 2H), 1.34 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.86, 165.82, 150.94, 137.72, 134.75, 130.33, 129.53, 128.54, 128.14, 124.85, 124.35, 120.49, 34.64, 31.10. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 312.15942 for  $C_{19}H_{22}NO_3$ , found 312.15985 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.26. 2-(4-(3-tert-Butyl-2-methoxybenzamido)phenyl)acetic acid (29)

Preparation according to general procedure C using **38l**. No further purification was performed. Yield 0.14 g, 99%.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.21 (s, 1H), 10.31 (s, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.40 (dd,  $J$  = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.09 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 1.37 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.83, 166.34, 156.78, 141.99, 137.84, 130.78, 130.24, 129.66, 128.26, 127.60, 122.56, 119.58, 60.87, 34.85, 30.50, 30.43. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 342.16998 for  $C_{20}H_{24}NO_4$ , found 342.16989 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.27. 2-(4-(5-tert-Butyl-2-methoxybenzamido)phenyl)acetic acid (30)

Preparation according to general procedure C using **38m**. Crystallization was performed in EtOAc. Yield 0.07 g, 50%.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.29 (s, 1H), 10.07 (s, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 13.7, 5.5 Hz, 3H), 7.52 (dd,  $J$  = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.11 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 1.29 (s, 9H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 172.83, 164.59, 154.38, 142.73, 137.65, 130.08, 129.61, 128.84, 126.24, 124.06, 119.55, 111.78, 55.98, 33.88, 31.22. HRMS (MALDI):  $m/z$  calculated 342.16998 for  $C_{20}H_{24}NO_4$ , found 342.17016 ( $[M+H]^+$ ).

#### 4.2.28. 2-(4-(2-Methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetic acid (**31**)

Preparation according to general procedure C using **38n**. Crystallization was performed in hexane/EtOAc. Yield 0.15 g, 87%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 12.26 (s, 1H), 10.33 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.60–7.45 (m, 6H), 7.44–7.36 (m, 1H), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 3.53 (s, 2H), 3.44 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.83, 165.21, 154.29, 137.71, 137.47, 134.87, 132.52, 131.76, 130.24, 129.67, 128.83, 128.47, 128.31, 127.53, 124.19, 119.49, 61.29. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 362.13868 for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>, found 362.13873 ([M + H]<sup>+</sup>).

#### 4.2.29. 2-(4-(4-Methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetic acid (**32**)

Preparation according to general procedure C using **38o**. Crystallization was performed in hexane/EtOAc. Yield 0.13 g, 75%. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 12.26 (s, 1H), 10.16 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.81 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 7.73–7.64 (m, 4H), 7.50–7.42 (m, 2H), 7.39–7.19 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.54 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 172.82, 164.29, 156.08, 139.12, 137.66, 132.42, 130.16, 129.89, 129.63, 129.01, 127.59, 127.13, 126.29, 125.57, 119.58, 112.67, 56.12. HRMS (MALDI): *m/z* calculated 362.13868 for C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>, found 362.13868 ([M + H]<sup>+</sup>).

#### 4.2.30. Ethyl 2-(2-aminophenyl)acetate (**33c**)

Oxindole (**40a**, 2.53 g, 19.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in EtOH (abs., 19 mL) and 3.8 mL 98% sulfuric acid were added at room temperature. The mixture was stirred at 80 °C for 16 h. Afterwards the solution was brought to pH 8 with an aqueous solution of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. EtOAc (20 mL) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted twice with EtOAc (2 × 20 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (60:40) as mobile phase. Yield 1.37 g, 40%. R<sub>f</sub>(hexane/EtOAc = 60:40) = 0.70. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.12–7.03 (m, 2H), 6.78–6.65 (m, 2H), 4.13 (dd, *J* = 14.3, 7.1 Hz, 4H), 3.55 (s, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 172.00, 145.63, 131.23, 128.60, 119.74, 119.06, 116.67, 61.19, 38.68, 14.25.

#### 4.2.31. Methyl 2-(4-aminophenyl)propionate (**33g**)

**36a** (1.0 g, 4.8 mmol, 1.0 eq) was dissolved in methanol (abs., 48 mL) and palladium on carbon (10%, 0.51 g, 0.05 mmol, 0.01 eq) was added. The mixture was then set under hydrogen atmosphere and stirred for 16 h at room temperature. Afterwards the solution was filtered through Celite and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (75:25) as mobile phase. Yield 0.44 g, 50%. R<sub>f</sub>(hexane/EtOAc = 75:25) = 0.13. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.50 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.96 (s, 2H), 3.55 (s, 3H), 1.30 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 174.94, 147.62, 127.72, 127.49, 113.90, 51.52, 43.54, 18.62.

#### 4.2.32. 2-(4-Amino-2-methylphenyl)acetic acid (**33h**)

**40c** (0.76 g, 2.6 mmol, 1.0 eq) was dissolved in aqueous KOH solution (50% w/w, 2.0 mL), ethanol (3.6 mL) was added and the mixture was stirred for 6 h at 80 °C. The mixture was then concentrated in vacuum, 50 °C warm water was added, and the mixture was filtered. The filtrate was brought to an acidic pH by addition of 36% aqueous hydrochloric acid and the precipitated product was filtered off. Yield 0.04 g, 9%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 10.18 (s, 4H), 7.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.21–7.05 (m, 4H), 3.62 (s, 5H), 2.25 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 172.21, 138.61, 134.01, 131.52, 130.41, 124.33, 120.51, 19.11.

#### 4.2.33. Methyl 2-(4-amino-3-methylphenyl)acetate (**33i**)

**36b** (0.42 g, 2.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (abs., 20 mL),

palladium on carbon (10%, 0.21 g, 0.02 mmol, 0.01 eq) was added, and the mixture was set under hydrogen atmosphere. The mixture was stirred for 16 h at room temperature, was then filtered through Celite and the solvent was removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography. Yield 0.20 g, 55%. R<sub>f</sub>(hexane/EtOAc = 75:25) = 0.12. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 6.77 (d, *J* = 12.2 Hz, 2H), 6.53 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.72 (s, 2H), 3.57 (s, 3H), 3.41 (s, 2H), 2.02 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 172.36, 145.40, 130.78, 127.26, 121.40, 121.05, 113.94, 51.51, 39.59, 17.41.

#### 4.2.34. Diethyl 4-amino-2-methoxyphenylmalonate (**33j**)

**36c** (0.21 g, 0.7 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (abs., 7 mL), palladium on carbon (10%, 0.07 g, 0.007 mmol, 0.01 eq) was added, and the mixture was set under hydrogen atmosphere. The mixture was stirred for 16 h at room temperature. The solution was then filtered through Celite and the solvent was removed in vacuum. No further purification was performed. Yield 0.18 g, 93%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.22 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 6.13 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 2H), 5.17 (s, 4H), 4.76 (s, 2H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 11H), 3.66 (s, 6H), 1.16 (t, *J* = 7.1 Hz, 16H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 168.55, 157.39, 150.02, 129.28, 108.31, 105.85, 97.03, 60.92, 55.21, 50.24, 13.92.

#### 4.2.35. 3-*tert*-Butyl-2-methoxybenzoic acid (**35h**)

**40h** (0.43 g, 2.26 mmol, 1.0 eq) and KMnO<sub>4</sub> (0.89 g, 5.64 mmol, 2.5 eq) were dissolved in a mixture of acetone (20 mL) and H<sub>2</sub>O (20 mL) and the mixture was stirred for 18 h at room temperature. Afterwards the reaction mixture was filtered through Celite and acetone was removed in vacuum. The aqueous layer was brought to alkaline pH by addition of aqueous NaOH solution (3 M, 10 mL) and washed with EtOAc (15 mL). The aqueous layer was then acidified by addition of 36% aqueous hydrochloric acid and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic layers were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the solvent was removed in vacuum. No further purification was performed. Yield 0.20 g, 42%. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 12.38 (s, 1H), 7.46 (ddd, *J* = 16.0, 7.7, 1.7 Hz, 2H), 7.05 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.34 (s, 9H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 172.03, 168.48, 158.95, 142.38, 129.78, 128.98, 125.83, 122.37, 61.53, 34.80, 30.39, 21.06.

#### 4.2.36. Methyl 2-(4-nitrophenyl)propionate (**36a**)

2-(4-Nitrophenyl)propionic acid (**37a**, 1.0 g, 5.1 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (abs., 21 mL) and cooled to 0 °C. Thionyl chloride (1.1 mL, 15.4 mmol, 3.0 eq) was added and the mixture was stirred at 70 °C for 2 h. After cooling to room temperature, H<sub>2</sub>O (20 mL) and EtOAc (20 mL) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (90:10) as mobile phase. Yield 1.01 g, 94%. R<sub>f</sub>(hexane/EtOAc = 90:10) = 0.31. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 8.20 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 1.44 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ = 173.35, 148.25, 146.58, 128.95, 123.69, 52.09, 44.14, 18.21.

#### 4.2.37. Methyl 2-(3-methyl-4-nitrophenyl)acetate (**36b**)

2-(3-Methyl-4-nitrophenyl)acetic acid (**37b**, 0.41 g, 2.56 mmol, 1.0 eq) was dissolved in MeOH (abs., 10 mL) and cooled to 0 °C. Thionyl chloride (0.6 mL, 7.7 mmol, 3.0 eq) was added and the mixture was stirred at 80 °C for 2 h. After cooling to room temperature, H<sub>2</sub>O (10 mL) and EtOAc (10 mL) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (90:10) as mobile phase. Yield 0.43 g, 79%. R<sub>f</sub>(hexane/EtOAc = 90:10) = 0.26. <sup>1</sup>H NMR

(250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.96 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 7.43–7.33 (m, 2H), 3.82 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 2.52 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 170.84, 147.67, 140.33, 133.78, 132.83, 128.40, 124.55, 51.92, 39.46, 19.61.

#### 4.2.38. Diethyl (2-methoxy-4-nitrophenyl)malonate (36c)

2-Bromo-5-nitroanisole (37c, 0.40 g, 1.72 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DMF (abs., 10 mL) and cooled to 0 °C before NaH (0.91 g, 5.7 mmol, 3.3 eq) was added. The mixture was warmed to room temperature and stirred for 90 min. Then, the reaction was cooled to 0 °C again and diethyl malonate (40i, 0.87 mL, 5.7 mmol, 3.3 eq) was added. The mixture was stirred overnight at 80 °C. The mixture was then poured on ice, EtOAc (15 mL) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (90:10) as mobile phase. Yield 0.21 g, 39%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 90:10) = 0.13.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.94–7.78 (m, 2H), 7.51 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.17 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 3.92 (s, 3H), 1.18 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 7H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 166.97, 157.33, 148.39, 130.36, 129.12, 115.59, 106.01, 61.69, 56.61, 51.45, 13.86.

#### 4.2.39. Ethyl 2-(2-(4-tert-butylbenzamido)phenyl)acetate (38a)

Preparation according to general procedure A using 33c and 4-tert-butylbenzoyl chloride (34a). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc/acetic acid (74:24:2) as mobile phase. Yield 0.37 g, 99%.  $R_f$ (hexane/EtOAc/acetic acid = 74:24:2) = 0.67.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.88 (s, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.59–7.49 (m, 2H), 7.43 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.33 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.23 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.98 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.74 (s, 2H), 1.34 (s, 9H), 1.04 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.22, 165.39, 154.36, 137.97, 132.24, 129.48, 129.42, 127.48, 125.12, 120.25, 60.19, 34.65, 30.92, 14.07.

#### 4.2.40. Ethyl 2-(4-(4-tert-butylbenzamido)phenyl)acetate (38b)

Preparation according to general procedure A using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (33f) and 4-tert-butylbenzoyl chloride (34a). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.49 g, 96%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.36.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.15 (s, 2H), 7.88 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 4H), 7.71 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 4H), 7.54 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 4H), 7.23 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 4H), 4.08 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 3.62 (s, 4H), 1.32 (s, 17H), 1.18 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.22, 165.39, 154.36, 137.97, 132.24, 129.48, 129.42, 127.48, 125.12, 120.25, 60.19, 34.65, 30.92, 14.07.

#### 4.2.41. Ethyl 2-(4-([1,1'-biphenyl]-2-carboxamido)phenyl)acetate (38d)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (33f) and [1,1'-Biphenyl]-2-carboxylic acid acid (35a). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.42 g, 95%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.18.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.21 (s, 1H), 7.61–7.25 (m, 13H), 7.15 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.12–3.99 (m, 2H), 3.58 (s, 2H), 1.17 (td,  $J$  = 7.1, 3.0 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.22, 167.75, 140.03, 139.20, 137.78, 137.09, 129.97, 129.74, 129.48, 128.27, 127.78, 127.27, 127.20, 119.61, 60.21, 39.52, 14.07.

#### 4.2.42. Methyl 2-(4-(4-tert-butylbenzamido)phenyl)propionate (38e)

Preparation according to general procedure A using 33g and 4-tert-butylbenzoyl chloride (34a). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (90:10) as mobile phase. Yield 0.46 g, 56%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 90:10) = 0.24.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.15 (s, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.71 (t,  $J$  = 5.4 Hz, 2H), 7.54 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H),

3.77 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 3.59 (s, 3H), 1.39 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 1.32 (s, 8H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 174.85, 165.88, 154.88, 138.61, 136.17, 132.67, 129.67, 127.98, 125.62, 120.93, 52.22, 44.33, 35.15, 31.41, 18.95.

#### 4.2.43. Methyl 2-(4-(4-tert-butylbenzamido)-3-methylphenyl)acetate (38f)

Preparation according to general procedure A using 33i and 4-tert-butylbenzoyl chloride (34a). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (75:25) as mobile phase. Yield 0.16 g, 65%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 75:25) = 0.31.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.75 (s, 1H), 7.91 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.54 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 2H), 7.28 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.18–7.06 (m, 2H), 3.65 (s, 2H), 3.62 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.32 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 172.53, 172.18, 167.75, 165.70, 156.29, 154.86, 135.73, 134.09, 132.35, 131.70, 129.67, 127.96, 127.44, 127.02, 125.85, 125.65, 52.18, 35.14, 31.42, 21.53, 18.31.

#### 4.2.44. Diethyl 4-(4-tert-butylbenzamido)-2-methoxyphenylmalonate (38g)

Preparation according to general procedure A using 33j and 4-tert-butylbenzoyl chloride (34a). No further purification was performed. Yield 0.20 g, 95%.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.29 (s, 1H), 7.87 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 6H), 7.50 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 6H), 4.93 (s, 1H), 4.18–4.12 (m, 4H), 3.77 (s, 3H), 1.31 (s, 9H), 1.19–1.17 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 170.34, 168.00, 167.27, 165.55, 156.70, 155.81, 154.55, 140.53, 132.11, 129.23, 128.11, 127.61, 125.37, 125.17, 116.53, 112.12, 103.51, 61.24, 59.78, 55.67, 50.79, 34.78, 30.95, 30.88, 20.77, 13.93.

#### 4.2.45. Ethyl 2-(4-(4-tert-butyl-2-methoxybenzamido)phenyl)acetate (38h)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (33f) and 4-tert-butyl-2-methoxybenzoic acid (35b). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.28 g, 67%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.31.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.03 (s, 1H), 7.63 (dd,  $J$  = 16.7, 8.2 Hz, 3H), 7.21 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.14–7.06 (m, 2H), 4.08 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 1.32 (s, 9H), 1.18 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.26, 164.25, 156.41, 155.53, 137.83, 129.56, 129.40, 121.96, 119.62, 117.46, 109.07, 60.23, 55.87, 34.95, 30.94, 14.10.

#### 4.2.46. Ethyl 2-(4-(4-tert-butyl-3-methoxybenzamido)phenyl)acetate (38i)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (33f) and 4-tert-butyl-3-methoxybenzoic acid (35c). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.30 g, 71%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.33.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.13 (s, 1H), 7.70 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.49 (d,  $J$  = 5.7 Hz, 2H), 7.35 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.08 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 1.36 (s, 9H), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.25, 165.25, 157.98, 140.96, 137.87, 134.05, 129.61, 129.46, 126.15, 120.43, 119.64, 110.99, 60.23, 55.43, 34.71, 29.41, 14.09.

#### 4.2.47. Ethyl 2-(4-(4-tert-butyl-2-hydroxybenzamido)phenyl)acetate (38j)

38i (0.15 g, 0.41 mmol, 1.0 eq) was dissolved in DCM (abs., 33 mL) and cooled to 0 °C.  $\text{BBr}_3$  in DCM (1 M, 4.1 mL, 4.06 mmol, 10.0 eq) was added. The mixture was warmed to room temperature and stirred for two hours. 30 mL ice/water was then added and phases were separated. The aqueous layer was brought to pH 4 with  $\text{NaHCO}_3$  and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. No further purification was performed. Yield 0.09 g, 62%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 11.83 (s, 1H), 10.30 (s, 1H), 7.92 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.63 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.04–6.92 (m, 2H), 4.13–4.05 (m, 2H), 3.64 (s, 2H), 1.28 (s, 9H), 1.18 (dd,  $J$  = 7.1, 4.2 Hz,

3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.20, 166.72, 158.80, 157.22, 136.86, 130.20, 129.60, 128.58, 121.01, 116.35, 114.23, 113.91, 60.25, 34.65, 30.71, 14.09.

#### 4.2.48. Ethyl 2-(4-(3-*tert*-butylbenzamido)phenyl)acetate (**38k**)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and 3-*tert*-butyl-benzoic acid (**35g**). No further purification was performed. Yield 0.18 g, 96%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.25 (s, 1H), 7.99 (t,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 7.83 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.76 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.72–7.64 (m, 1H), 7.51 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 7.30 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.14 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.69 (s, 2H), 1.40 (s, 8H), 1.25 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.24, 165.81, 150.91, 137.87, 134.71, 129.64, 129.43, 128.50, 128.10, 124.81, 124.31, 120.54, 60.22, 34.60, 31.06, 14.08.

#### 4.2.49. Ethyl 2-(4-(3-*tert*-butyl-2-methoxybenzamido)phenyl)acetate (**38l**)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and **35h**. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.15 g, 43%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.52.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.30 (s, 1H), 7.68 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.40 (dd,  $J$  = 7.8, 1.5 Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J$  = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.23 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.09 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 4.13–4.04 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.21, 166.33, 156.75, 141.97, 137.97, 130.73, 129.59, 129.56, 128.24, 127.56, 122.52, 119.64, 60.86, 60.21, 34.81, 30.47, 14.08.

#### 4.2.50. Ethyl 2-(4-(5-*tert*-butyl-2-methoxybenzamido)phenyl)acetate (**38m**)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and 5-*tert*-butyl-2-methoxybenzoic acid (**35i**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.16 g, 87%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.27.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.06 (s, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 7.3, 5.6 Hz, 3H), 7.52 (dd,  $J$  = 8.7, 2.6 Hz, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.10 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 4.08 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 1.29 (s, 9H), 1.18 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.26, 154.39, 142.75, 137.80, 129.56, 129.46, 126.25, 124.01, 119.67, 111.80, 60.23, 55.99, 33.87, 31.21, 14.09.

#### 4.2.51. Ethyl 2-(4-(2-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetate (**38n**)

**39b** (0.27 g, 0.70 mmol, 1.0 eq), phenylboronic acid (**40d**, 0.09 g, 0.70 mmol, 1.0 eq) and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0.57 g, 1.75 mmol, 2.5 eq) were dissolved in a mixture of toluene (abs., 7 mL) and EtOH (abs., 0.7 mL). The mixture was stirred for 30 min at room temperature before tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.08 g, 0.07 mmol, 0.1 eq) was added. The mixture was then stirred at 80 °C for 5 h. After cooling to room temperature,  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3  $\times$  10 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.18 g, 67%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.47.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.35 (s, 1H), 7.69 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.60–7.39 (m, 7H), 7.31 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.24 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.14–4.04 (m, 2H), 3.62 (s, 2H), 3.44 (s, 3H), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.38, 165.36, 154.39, 137.91, 137.54, 134.96, 132.67, 131.69, 129.71, 128.90, 128.56, 128.40, 127.63, 124.30, 119.74, 61.39, 60.37, 14.17.

#### 4.2.52. Ethyl 2-(4-(4-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetate (**38o**)

**39c** (0.27 g, 0.70 mmol, 1.0 eq), phenylboronic acid (**40d**, 0.09 g, 0.70 mmol, 1.0 eq) and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0.57 g, 1.75 mmol, 2.5 eq) were

dissolved a mixture of toluene (abs., 7 mL) and EtOH (abs., 0.7 mL). The mixture was stirred for 30 min at room temperature before tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.08 g, 0.07 mmol, 0.1 eq) was added. The mixture was then stirred at 80 °C for 5 h. After cooling to room temperature,  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) and EtOAc (10 mL) were added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3  $\times$  10 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography. Yield 0.17 g, 63%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.19.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.17 (s, 1H), 7.89 (d,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J$  = 8.6, 2.4 Hz, 1H), 7.68 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 4H), 7.46 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.34 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.25 (t,  $J$  = 8.9 Hz, 3H), 4.14–4.02 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.63 (s, 2H), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.28, 156.11, 139.13, 137.81, 132.47, 129.96, 129.60, 129.03, 127.63, 127.16, 126.30, 125.50, 119.73, 112.71, 60.26, 56.15, 14.11.

#### 4.2.53. Ethyl 2-(4-(3',5'-dichloro-[1,1'-biphenyl]-3-carboxamido)phenyl)acetate (**38p**)

**39a** (0.27 g, 0.74 mmol, 1.0 eq), 3,5-dichlorophenylboronic acid (**40e**, 0.14 g, 0.74 mmol, 1.0 eq) and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (0.6 g, 1.86 mmol, 2.5 eq) were dissolved in toluene (abs., 8 mL) and EtOH (abs., 0.8 mL) was added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature. Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.09 g, 0.07 mmol, 0.1 eq) was added and the mixture was stirred at 80 °C for 5 h. After cooling to room temperature,  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) was added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3  $\times$  10 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (80:20) as mobile phase. Yield 0.08 g, 26%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 80:20) = 0.02.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.32 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.98 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 7.87 (d,  $J$  = 1.8 Hz, 2H), 7.73 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.68–7.60 (m, 2H), 7.26 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 4.09 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.64 (s, 2H), 1.22–1.16 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.37, 165.16, 143.12, 137.75, 137.38, 135.74, 134.88, 130.22, 130.00, 129.62, 129.48, 128.26, 127.35, 126.07, 125.76, 120.72, 60.37, 14.17.

#### 4.2.54. Ethyl 2-(4-benzylaminophenyl)acetate (**38q**)

Ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**, 0.30 g, 1.67 mmol, 1.0 eq) and benzaldehyde (**40f**, 0.14 mL, 1.84 mmol, 1.1 eq) were dissolved in dichloroethane (abs., 12 mL). Acetic acid (0.19 mL, 3.35 mmol, 2.0 eq) was added and the mixture was stirred for 2 h at room temperature before  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$  (0.50 g, 2.34 mmol, 1.4 eq) was added. The mixture was then stirred overnight at room temperature. NaOH-solution (1 M, 12 mL) was added and the mixture was stirred for another 30 min. Phases were then separated and the aqueous layer was extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (3  $\times$  20 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (90:10) as mobile phase. Yield 0.25 g, 55%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 90:10) = 0.24.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.38–7.26 (m, 4H), 7.21 (dd,  $J$  = 10.6, 4.3 Hz, 1H), 6.91 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.51 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 6.17 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 1H), 4.24 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 4.03 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.41 (s, 2H), 1.15 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 147.49, 140.30, 129.63, 128.24, 127.13, 126.56, 121.23, 114.46, 112.20, 59.97, 57.54, 46.49, 14.09.

#### 4.2.55. Ethyl 2-(4-(4-*tert*-butyl-*N*-benzylbenzamido)phenyl)acetate (**38r**)

Preparation according to general procedure A using **38q** and 4-*tert*-butylbenzoyl chloride (**34a**). Further purification was performed by column chromatography with hexane/EtOAc (75:25) as mobile phase. Yield 0.15 g, 48%.  $R_f$ (hexane/EtOAc = 75:25) = 0.39.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 7.31–7.20 (m, 9H), 7.08 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.04–6.96 (m, 2H), 5.06 (s, 2H), 4.42 (d,  $J$  = 4.1 Hz, 2H), 4.03–3.96 (m, 2H), 3.53 (s, 2H), 1.19 (d,  $J$  = 1.7 Hz, 9H), 1.09 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 170.98, 169.77, 152.52, 141.93, 137.66, 133.25, 132.69, 130.03, 128.52, 127.76, 127.43, 127.22, 124.71, 62.23, 60.36, 53.16, 34.56, 30.97, 30.81, 25.55, 18.62, 14.10.

#### 4.2.56. Ethyl 2-(4-(3-bromobenzamido)phenyl)acetate (**39a**)

Preparation according to general procedure A using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and 3-bromobenzoic acid (**35d**). No further purification was performed. Yield 0.27 g, 99%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.32 (s, 1H), 8.14 (t,  $J$  = 1.7 Hz, 1H), 8.00–7.90 (m, 1H), 7.82–7.75 (m, 1H), 7.70 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.25 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 4.08 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.63 (s, 2H), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.20, 163.86, 137.57, 137.05, 134.26, 130.65, 130.20, 129.93, 129.50, 126.83, 121.66, 120.43, 60.22, 14.08.

#### 4.2.57. Methyl 2-(4-(3-bromo-2-methoxybenzamido)phenyl)acetate (**39b**)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and 3-bromo-2-methoxybenzoic acid (**35f**). No further purification was performed. Yield 0.18 g, 98%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.37 (s, 1H), 7.77 (dd,  $J$  = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.66 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.53 (dd,  $J$  = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 7.27–7.15 (m, 3H), 4.08 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.30, 164.27, 153.66, 137.67, 134.92, 133.00, 129.94, 129.70, 128.68, 125.76, 119.79, 116.97, 61.91, 60.33, 14.14.

#### 4.2.58. Ethyl 2-(4-(5-bromo-2-methoxybenzamido)phenyl)acetate (**39c**)

Preparation according to general procedure B using ethyl 2-(4-aminophenyl)acetate (**33f**) and 5-bromo-2-methoxybenzoic acid (**35e**). No further purification was performed. Yield 0.83 g, 98%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.16 (s, 1H), 7.73–7.61 (m, 4H), 7.19 (dd,  $J$  = 18.4, 8.6 Hz, 3H), 4.14–4.01 (m, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 1.18 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 171.27, 163.02, 155.79, 137.56, 134.25, 131.64, 129.81, 129.63, 127.27, 119.79, 114.56, 111.82, 60.28, 56.31, 14.12.

#### 4.2.59. *N*-(3-Methyl-4-(2-(4-morpholinyl)-2-thioxoethyl)phenyl)acetamide (**40c**)

4-Acetamido-2-methylacetophenone (**40b**, 0.96 g, 5.0 mmol, 1.0 eq) was dissolved in morpholine (0.9 mL) and sulfur (0.32 g, 10.0 mmol, 2.0 eq) were added. Afterwards the mixture was stirred at 135 °C for 6 h. The reaction was stopped by pouring the warm mixture in warm ethanol (2 mL). After cooling to 0 °C for 16 h, a precipitate was formed, which was filtered off and recrystallized in cold ethanol. Yield 0.76 g, 52%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 9.82 (s, 1H), 7.37 (dd,  $J$  = 13.4, 5.1 Hz, 2H), 6.96 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 4.33–4.26 (m, 3H), 4.13 (s, 2H), 3.75–3.68 (m, 2H), 3.60 (dd,  $J$  = 8.4, 4.1 Hz, 3H), 3.55–3.49 (m, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.03 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 199.43, 168.32, 137.73, 136.27, 129.70, 127.34, 120.77, 116.82, 65.85, 65.80, 56.15, 50.53, 49.73, 46.30, 24.01, 19.52, 18.60.

#### 4.2.60. 3-*tert*-Butyl-2-methoxybenzaldehyd (**40h**)

3-*tert*-Butylsilylaldehyde (**40g**, 0.50 mL, 2.92 mmol, 1.0 eq) and  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.2 g, 8.75 mmol, 3.0 eq) were dissolved in DMF (5 mL) and stirred for 45 min before methyl iodide (0.27 g, 4.38 mmol, 1.5 eq) was added. The mixture was then stirred at room temperature for 6 h. 10% aqueous hydrochloric acid (5 mL) and DCM (5 mL) were subsequently added, phases were separated, and the aqueous layer was extracted with DCM (3  $\times$  5 mL). The combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the solvents were removed in vacuum. No further purification was performed. Yield 0.43 g, 77%.  $^1\text{H}$  NMR (250 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 10.27 (d,  $J$  = 0.5 Hz, 1H), 7.63 (dt,  $J$  = 7.3, 1.8 Hz, 2H), 7.26–7.17 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 1.38 (s, 9H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  = 190.41, 162.70, 162.28, 143.08, 133.21, 129.44, 127.89, 123.79, 65.94, 35.75, 34.78, 30.73, 30.52.

### 4.3. Biological evaluation

#### 4.3.1. Data analysis

All experiments were conducted with a minimum of two technical and three independent biological replicates. Reported values represent the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance between two samples was analyzed by unpaired, two-sided student's *t*-test assuming different variances of the samples.  $\text{IC}_{50}$  values of all compounds were calculated from dose-response data by SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) using the mean  $\pm$  SD of individual concentrations and a four parameter logistic regression.

#### 4.3.2. Full length FXR transactivation assay

##### 4.3.2.1. Plasmids.

pcDNA3-hFXR contains the sequence of human FXR and was already published elsewhere.<sup>30</sup> pGL3basic (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) was used as a reporter plasmid, with a shortened construct of the promoter of BSEP cloned into the *SacI/NheI* cleavage site in front of the luciferase gene.<sup>31</sup> pRL-SV40 (Promega) was transfected as a control for normalization of transfection efficiency and cell growth. pSG5-hRXR was already published elsewhere as well.<sup>32</sup>

##### 4.3.2.2. Assay procedure.

HeLa cells were grown in DMEM high glucose supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$ . 24 h before transfection, HeLa cells were seeded in 96-well plates with a density of 8000 cells per well. 3.5 h before transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 0.5% charcoal-stripped FCS. Transient transfection of HeLa cells with BSEP-pGL3, pRL-SV40 and the expression plasmids pcDNA3-hFXR and pSG5-hRXR was carried out using calcium phosphate transfection method. 16 h after transfection, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and 0.5% charcoal-stripped FCS. 24 h after transfection, medium was changed to DMEM without phenol red, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), L-glutamine (2 mM) and 0.5% charcoal-stripped FCS, now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound 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) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with a Tecan Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Germany). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data multiplied by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of the tested compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of the tested compound at a respective concentration by the fold activation of FXR full agonist GW4064 (**2a**) at 3  $\mu\text{M}$ .  $\text{EC}_{50}$  and standard error of the mean values were calculated with the mean relative activation values of at least three independent experiments by SigmaPlot 10.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) using a four parameter logistic regression. The assay was validated with FXR agonists **1a** ( $\text{EC}_{50}$  = 18  $\pm$  1  $\mu\text{M}$ , 88  $\pm$  3% rel. max. act.), **1b** ( $\text{EC}_{50}$  = 0.16  $\pm$  0.02  $\mu\text{M}$ , 87  $\pm$  3% rel. max. act.) and **2a** ( $\text{EC}_{50}$  = 0.51  $\pm$  0.16  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  defined as 100%).<sup>10</sup>

#### 4.3.3. Hybrid reporter gene assays for nuclear receptors PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , CAR and RAR $\alpha$

##### 4.3.3.1. Plasmids.

The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-hPPAR $\gamma$ -LBD<sup>33</sup>, pFA-CMV-hLXR $\alpha$ -LBD<sup>24</sup>, pFA-CMV-hRAR $\alpha$ -LBD<sup>34</sup>,



pFA-CMV-hCAR-LBD<sup>34</sup> containing the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the respective nuclear receptor were constructed by integrating cDNA fragments obtained from PCR amplification of human monocytes into the *SmaI/XbaI* cleavage site of the pFA-CMV vector (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Frame and sequence of the fusion receptors were verified by sequencing. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth.

**4.3.3.2. Assay procedure.** HEK293T cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates (2.5·10<sup>4</sup> cells/well). Before transfection, medium was changed to Opti-MEM without supplements. Transient transfection was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol with pFR-Luc (Stratagene), pRL-SV40 (Promega) and pFA-CMV-hRXRα-LBD. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in triplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (12–14 h) incubation with the test compounds, cells were assayed for luciferase activity using Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's protocol. Luminescence was measured with an Infinite M200 luminometer (Tecan Deutschland GmbH). Normalization of transfection efficiency and cell growth was done by division of firefly luciferase data by renilla luciferase data and multiplying the value by 1000 resulting in relative light units (RLU). Fold activation was obtained by dividing the mean RLU of a test compound at a respective concentration by the mean RLU of untreated control. Relative activation was obtained by dividing the fold activation of a test compound at a respective concentration by the fold activation of a respective reference agonist at 1 µM (PPARγ: pioglitazone; LXRα: T0901317; RARα: tretinoin; CAR: CITCO). All hybrid assays were validated with the above mentioned reference agonists which yielded values in agreement with literature.

#### 4.3.4. FXR target gene quantification (quantitative real-time PCR)

FXR target gene quantification was performed as described previously.<sup>10</sup> In brief, HepG2 cells were incubated with test compound **25** (10 µM) or **1a** (50 µM) or **2a** (1 µM) or 0.1% DMSO alone as untreated control for 24 h, harvested, washed with cold phosphate buffered saline (PBS) and then directly used for RNA extraction. Two micrograms of total RNA were extracted from HepG2 cells by the Total RNA Mini Kit (R6834-02, Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA). RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fischer Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol. FXR target gene expression was evaluated by quantitative real time PCR analysis with a StepOnePlus™ System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using PowerSYBRGreen (Life Technologies; 12.5 µL per well). The primers have been described previously.<sup>10</sup> Each sample was set up in duplicates and repeated in at least three independent experiments. The expression was quantified by the comparative ΔΔCt method and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as reference gene. Results (expressed as mean fold activation ± SEM; n = 3).

#### 4.3.5. WST-1 assay

WST-1 assay (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz) was performed according to manufacturer's protocol and as described previously.<sup>9</sup> In brief, HepG2 cells were seeded in DMEM high glucose, supplemented with SP (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% FCS in 96-well plates (3·10<sup>4</sup> cells/well). After 24 h, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented

with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 1% charcoal stripped FCS and cells were incubated with **7** and **25** (final concentration 100 µM), Revlotron as positive control, and DMEM/1% DMSO as negative control. After 48 h, WST reagent (Roche Diagnostics International AG) was added to each well according to manufacturer's instructions. After 45 min incubation, absorption (450 nm/reference: 620 nm) was determined with a Tecan Infinite M200 (Tecan Deutschland GmbH). Each experiment was repeated at least three times in duplicates. Results (expressed as mean percent of untreated control ± SEM; n = 3; DMSO = 100%) **8**: 100 µM: 118 ± 1%; **26**: 100 µM: 112 ± 1%.

#### 4.3.6. Metabolism assay

The solubilized test compound **25** (5 µL, final concentration 10 µM in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4)) was preincubated at 37 °C in 432 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) together with a 50 µL NADPH regenerating system (30 mM glucose-6-phosphate, 4 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 10 mM NADP, 30 mM MgCl<sub>2</sub>). After 5 min, the reaction was started by the addition of 13 µL of microsome mix from the liver of Sprague–Dawley rats (Invitrogen; 20 mg protein/mL in 0.1 M phosphate buffer) in a shaking water bath at 37 °C. The reaction was stopped by addition of 250 µL of ice-cold methanol at 0, 15, 30 and 60 min. The samples were diluted with 250 µL of DMSO and centrifuged at 10000g for 5 min at 4 °C. The supernatants were analyzed and test compound was quantified by HPLC: mobile phase: MeOH 83%/H<sub>2</sub>O 17%/formic acid 0.1%; flow-rate: 1 mL/min; stationary phase: MultoHigh Phenyl phase, 5 µm, 250 × 4, precolumn, phenyl, 5 µm, 20 × 4; detection wavelength: 330 and 254 nm; injection volume: 50 µL. Control samples were performed to check the stability of **25** in the reaction mixture: first control was without NADPH, which is needed for the enzymatic activity of the microsomes, second control was with inactivated microsomes (incubated for 20 min at 90 °C), third control was without test compound **25** (to determine the baseline). The amounts of the test compound **25** were quantified by an external calibration curve, where data are expressed as means ± SEM of single determinations obtained in three independent experiments. The metabolism experiment showed the following results (expressed as mean percent of remaining compound ± SEM; n = 3): **25**: 0 min: 100 ± 1%, 15 min: 98 ± 1%, 30 min: 96 ± 1%, 60 min: 97 ± 1%.

## References

- Forman BM, Goode E, Chen J, et al. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 1995;81:687–693. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90530-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90530-8).
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, et al. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999;284(5418):1365–1368. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1365>.
- Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol*. 1995;9:72–85. <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7760852>.
- Kuipers F, Bloks VW, Groen AK. Beyond intestinal soap—bile acids in metabolic control. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10:488–498. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.60>.
- 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. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.47>.
- Chiang PC, Thompson DC, Ghosh S, Heitmeier MR. 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. <https://doi.org/10.1002/jps.22664>.
- Tully DC, Rucker PV, Chianelli D, et al. Discovery of tropifexor (LJN452), a highly potent non-bile acid FXR agonist for the treatment of cholestatic liver diseases and nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *J Med Chem*. 2017;60:9960–9973. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00907>.
- Jin L, Feng X, Rong H, et al. The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nat Commun*. 2013;4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2924>.
- Merk D, Gabler M, Gomez RC, et al. Anthranilic acid derivatives as novel ligands for farnesoid X receptor (FXR). *Bioorg Med Chem*. 2014;22:2447–2460. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.02.053>.
- Merk D, Lamers C, Ahmad K, et al. Extending the structure-activity relationship of anthranilic acid derivatives as farnesoid x receptor modulators: development of a

- highly potent partial farnesoid x receptor agonist. *J Med Chem.* 2014;57(19) <https://doi.org/10.1021/jm500937v>.
- Dai J, Wang H, Shi Y, Dong Y, Zhang Y, Wang J. Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR. *J Hematol Oncol.* 2011;4:41. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-41>.
  - De Gottardi A, Dumonceau JM, Bruttin F, et al. Expression of the bile acid receptor FXR in Barrett's esophagus and enhancement of apoptosis by guggulsterone *in vitro*. *Mol Cancer.* 2006;5. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-48>.
  - Lamers C, Schubert-Zsilavecz M, Merk D. Medicinal chemistry and pharmacological effects of Farnesoid X Receptor (FXR) antagonists. *Curr Top Med Chem.* 2014;14:2188–2205. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141112103516>.
  - Urizar NL, Liverman AB, Dodds DT, et al. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science (80-)*. 2002;296(5573):1703–1706. <https://doi.org/10.1126/science.1072891>.
  - Diao Y, Jiang J, Zhang S, Li S, Shan L, Huang J. Discovery of Natural Products as Novel and Potent FXR Antagonists by Virtual Screening. 2018;6(April):1–13. doi:10.3389/fchem.2018.00140.
  - Jiang C, Xie C, Lv Y, et al. Intestine-selective farnesoid X receptor inhibition improves obesity-related metabolic dysfunction. *Nat Commun.* 2015;6:10166. <https://doi.org/10.1038/ncomms10166>.
  - Li F, Jiang C, Krausz KW, et al. Microbiome remodelling leads to inhibition of intestinal farnesoid X receptor signalling and decreased obesity. *Nat Commun.* 2013;4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3384>.
  - Huang H, Yu Y, Gao Z, et al. Discovery and optimization of 1,3,4-trisubstituted-pyrazolone derivatives as novel, potent, and nonsteroidal farnesoid X receptor (FXR) selective antagonists. *J Med Chem.* 2012;55:7037–7053. <https://doi.org/10.1021/jm3002718>.
  - Yu DD, Lin W, Forman BM, Chen T. Identification of trisubstituted-pyrazol carboxamide analogs as novel and potent antagonists of farnesoid X receptor. *Bioorg Med Chem.* 2014;22:2919–2938. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.04.014>.
  - Teno N, Yamashita Y, Iguchi Y, et al. Nonacidic chemotype possessing N-acylated piperidine moiety as potent farnesoid X receptor (FXR) antagonists. *ACS Med Chem Lett.* 2018;9:78–83. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00363>.
  - Xu X, Xu X, Liu P, et al. Structural basis for small molecule NDB (N-Benzyl-N-(3-(tertbutyl)-4-hydroxyphenyl)-2,6-dichloro-4-(dimethylamino) Benzamide) as a selective antagonist of farnesoid X receptor  $\alpha$  (FXR $\alpha$ ) in stabilizing the homodimerization of the receptor. *J Biol Chem.* 2015;290:19888–19899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.630475>.
  - Huang H, Si P, Wang L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel nonsteroidal farnesoid x receptor (FXR) antagonists: molecular basis of FXR antagonism. *ChemMedChem.* 2015;10:1184–1199. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201500136>.
  - Thorne N, Shen M, Lea WA, et al. Firefly luciferase in chemical biology: a compendium of inhibitors, mechanistic evaluation of chemotypes, and suggested use as a reporter. *Chem Biol.* 2012;19:1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.015>.
  - Lamers C, Merk D, Gabler M, Flesch D, Kaiser A, Schubert-Zsilavecz M. SAR studies on FXR modulators led to the discovery of the first combined FXR antagonistic/TGR5 agonistic compound. *Future Med Chem.* 2016;8:133–148. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.178>.
  - Gellrich L, Merk D. Therapeutic potential of peroxisome proliferator-activated receptor modulation in non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Nucl Recept Res.* 2017;4:101310. <https://doi.org/10.11131/2017/101310>.
  - Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2014;385:956–965. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61933-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61933-4).
  - Fiorucci S, Distrutti E, Ricci P, Giuliano V, Donini A, Baldelli F. Targeting FXR in cholestasis: hype or hope. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18:1449–1459. <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.956087>.
  - Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: From UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol.* 2015;62:S25–S37. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.023>.
  - Guan B, Li H, Yang Z, Hoque A, Xu X. Inhibition of farnesoid X receptor controls esophageal cancer cell growth *in vitro* and in nude mouse xenografts. *Cancer.* 2013;119:1321–1329. <https://doi.org/10.1002/cncr.27910>.
  - Steri R, Achenbach J, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Proschak E. Investigation of imatinib and other approved drugs as starting points for antidiabetic drug discovery with FXR modulating activity. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:1674–1681. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.02.027>.
  - Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem.* 2001;276:28857–28865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011610200>.
  - 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 Mol Cell Biol Lipids.* 2007;1771:864–872. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.04.007>.
  - Rau O, Wurglics M, Paulke A, et al. Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Planta Med.* 2006;72:881–887. <https://doi.org/10.1055/s-2006-946680>.
  - Flesch D, Cheung S-Y, Schmidt J, et al. Non-acidic farnesoid X receptor modulators. *J Med Chem.* 2017;60:7199–7205. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00903>.