

Zusammenfassung der Arbeit:

Entwicklung und Charakterisierung neuer Farnesoid X Rezeptor-Modulatoren

von Jurema Schmidt

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 antiinflammatorische Eigenschaften.¹⁻³ Gerade bei hepatischen, gastrointestinalen und systemischen Erkrankungen erscheint FXR daher als interessante Zielstruktur zur Behandlung metabolischer Erkrankungen.⁴ Basierend auf den natürlichen Liganden von FXR, den Gallensäuren, wurde Obeticholsäure (OCA) als semisynthetisches Derivat der endogenen Chenodesoxycholsäure zu einem potenten FXR-Agonisten entwickelt. OCA wurde in mehreren 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.^{3,5,6} Mittlerweile ist OCA als Zweitlinientherapie der PBC auf dem Arzneimittelmarkt zugelassen.⁷ Neben OCA 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.^{5,8-10}

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.*¹¹ ein FXR-Antagonismus durch NSAIDs postuliert wurde. Beim Versuch der Reproduktion der Ergebnisse von Lu *et al.*¹¹ mit den drei NSAIDs Ibuprofen, Indometacin und Diclofenac wurde festgestellt, dass die Effekte auf den ersten Blick antagonistisch erscheinen, aber bei genaueren biochemischen Untersuchungen zweifelsfrei als Zytotoxizität identifiziert wurden.

FXR-Antagonisten wie Guggulsteron oder Gly-MCA sind auf ihre therapeutische Wirksamkeit untersucht worden, aber die genaue Wirkweise ist noch nicht aufgeklärt.^{12,13} Aufgrund ihrer steroidalen Grundstruktur ist ihre Selektivität gegenüber anderen nukleären Rezeptoren fraglich. Die überschaubare Anzahl an publizierten nicht-steroidalen FXR-Antagonisten besitzt zwar moderate IC₅₀-Werte, ihre strukturelle Diversität und Selektivität ist aber limitiert.¹⁴ Zur Entwicklung neuer potenter FXR-Antagonisten, die aus kleinen Molekülen (engl: *small molecules*) aufgebaut sind, wurde eine *N*-Phenylbenzamid-Leitstruktur ausgewählt. Diese Leitstruktur wurde im Rahmen der SAR-Untersuchungen zur Entwicklung von Anthranilsäurederivaten als FXR-Partialagonisten^{15,16} innerhalb des Arbeitskreises entdeckt. Ausgehend von dieser Leitstruktur wurde eine mehrstufige, systematische SAR-Untersuchung durchgeführt, wodurch ein sehr potenter FXR-Antagonist entwickelt werden konnte, der anschließend umfangreich biochemisch auf FXR-Modulation, Selektivität, Löslichkeit, Toxizität und metabolische Stabilität charakterisiert wurde.

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 lösliche Epoxidhydrolase (engl: *soluble epoxidhydrolase*, sEH) besitzt nachweislich anti-inflammatorische und antisteatotische Effekte in der Leber.^{17,18} Aus diesem Grund wurde eine Leitstruktur entwickelt, die eine duale Modulation aus FXR-Aktivierung und sEH-Inhibition erzeugt. Dafür wurden die Pharmakophore eines im Arbeitskreis entwickelten FXR-Partialagonisten^{15,16} sowie eines potenten sEH-Inhibitors¹⁹ miteinander verknüpft. Zur Weiterentwicklung einer ausgewogenen hohen Potenz beider Modulationsfaktoren 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. Dabei wurde ein ausgewogener und hochpotenter dualer Modulator erhalten, der umfassend *in vitro* und *in vivo* charakterisiert wurde. Die gezielte duale Aktivität, die mit dieser Substanz erreicht wurde, führt in einem Krankheitsbild zu synergistischer Ergänzung zweier Therapieoptionen. Jedoch kann eine unerwünschte Promiskuität über verwandten nukleären Faktoren zu Nebenwirkungen führen. Die Ursache dafür kann eine saure Funktion darstellen. Ein sehr potenter nicht-azider FXR-Agonist mit einem subnanomolaren EC₅₀-Wert konnte im Arbeitskreis entwickelt werden. Diese Verbindung ist FXR-selektiv, hat keinen toxischen Effekt auf HepG2-Zellen und eine moderate metabolische Halbwertszeit. Die qRT-PCR-Untersuchung direkter und indirekter FXR-Zielgene zeigte eine verstärkte Expression nach der Inkubation mit der nicht-aziden Substanz. 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 zu sehr potenten optimierten Substanzen entwickelt wurden. FXR-Antagonismus und die dazu passenden *tool compounds* 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 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bewiesen werden, wodurch diese Verbindung ein vielversprechender Kandidat für weitere klinische Entwicklung ist.

(1) 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. (2) Parks, D. J.; Blanchard, S. G.; Bledsoe, R. K.; Chandra, G.; Consler, T. G.; Klierer, S. A.; Stimmel, J. B.; Willson, T. M.; Zavacki, A. M.; Moore, D. D.; et al. Bile Acids: Natural Ligands for an Orphan Nuclear Receptor. *Science* **1999**, *284* (5418), 1365–1368. (3) Adorini L, Pruzanski M, S. D. Farnesoid X Receptor Targeting to Treat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Drug Discov. Today* **2012**, *17–18*, 988–997. (4) 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. (5) 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.; 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. (6) Hirschfeld, G. M.; Mason, A.; Luketic, V.; Lindor, K.; Gordon, S. C.; Mayo, M.; Kowdley, K. V.; Vincent, C.; Bodenheimer, 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. (7) Smith, S. M.; Pegram, A. H. Obeticholic Acid. *J. Pharm. Technol.* **2017**, *33* (2), 66–71. (8) 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. (9) Akwabi-Ameyaw, A.; Bass, J. Y.; Caldwell, R. D.; Caravella, J. A.; Chen, L.; Creech, K.; 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. (10) 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. (11) 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*. (12) Diaio, 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. (13) 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*. (14) 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. (15) Merk, D.; Lamers, C.; Ahmad, K.; Carrasco Gomez, R.; 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), 16. (16) 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. (17) 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 Epoxigenase Pathway Regulates the Hepatic Inflammatory Response in Fatty Liver Disease. *PLoS One* **2014**, *9* (10), 18. (18) 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), 19. (19) Kompa, A. R.; Wang, B. H.; Xu, G.; Zhang, Y.; Ho, P. Y.; Eisenhagen, 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-Mycardial Infarction. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *167* (1), 210–219.