GOETHE
UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

Entwicklung antientzündlicher Liganden nukleärer Rezeptoren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Pascal Heitel
aus Mutlangen

Frankfurt am Main (2019)
(D30)

Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht kommerziell - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz.

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

Dekan:	Prof. Dr. Clemens Glaubitz
Gutachter:	Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz Prof. Dr. Dieter Steinhilber Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe (Julius Maximilians-Universität Würzburg)
Datum der Disputation:	16.9.2019

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.“

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 9
1.1 Nukleäre Rezeptoren . . . 9
1.1.1 Struktur und Funktion . . . 9
1.1.2 Klassifikation . . . 11
1.1.3 Die Rolle von nukleären Rezeptoren in Entzündungsprozessen . . . 12
1.2 Leber X Rezeptoren . . . 14
1.2.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial . . . 14
1.2.2 Liganden des LXR . . . 17
1.3 Farnesoid X Rezeptor . . . 19
1.3.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial . . . 19
1.3.2 Liganden des FXR . . . 23
1.4 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren . . . 24
1.4.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial . . . 25
1.4.2 Liganden des PPAR . . . 28
1.5 Retinoid X Rezeptoren . . . 30
1.5.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial . . . 31
1.5.2 Liganden des RXR . . . 34

2 Motivation und Zielsetzung 37

3 Ergebnisse und Diskussion 41
3.1 Identifikation von Alitretinoin und Bexaroten als LXR-Liganden . . . 41
3.2 Charakterisierung von Lesinurad als selektiver PPARγ-Modulator . . . 45
3.3 Entwicklung einer neuen Strukturklasse von RXR-Agonisten . . . 51
3.4 Duale Liganden von PPARδ und FXR zur Behandlung von NASH . . . 60

4 Zusammenfassung 73

5 English Summary 79

6 Literatur 81

7 Abkürzungsverzeichnis 103

8 Abbildungsverzeichnis 107

9 Schemenverzeichnis 109

10 Tabellenverzeichnis 111

11 Publikationsliste 113

12 Kooperationspartner 117

13 Curriculum Vitae **119**

14 Eidesstattliche Erklärung **121**

15 Danksagung **123**

16 Nachdrucke der Publikationen **125**

16.1 DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as LXR Modulators 125

16.2 Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a sPPARγM in Vitro 135

16.3 Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel RXR Agonist Chemotype 147

16.4 Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses 185

1 Einleitung

Nukleäre Rezeptoren stellen wichtige pharmakologische Zielstrukturen dar, die bis Mitte der 1980er Jahre unbekannt waren, aber bereits von einer Vielzahl an Arzneistoffen adressiert wurden.[1,2] Dazu gehören das in den 1930er Jahren entwickelte Ethinylestradiol sowie das in den 40er Jahren isolierte Cortison.[1] Seit dieser Geburtsstunde der Nutzung von Liganden nukleärer Rezeptoren zu pharmazeutischen Zwecken haben die Identifikation und Charakterisierung der nukleären Rezeptoren zu zahlreichen Arzneistoffklassen geführt. Neben oralen Kontrazeptiva zählen auch Glucocorticoide, Fibrate, Glitazone und Glitazare zum Repertoire der Arzneistoffe, die an nukleären Rezeptoren wirken.[1]

Dass nukleäre Rezeptoren auch heute noch interessante therapeutische Zielstrukturen sind, zeigt sich an zwei Sachverhalten: Erstens sind die endogenen Liganden der im humanen Genom identifizierten 48 nukleären Rezeptoren nur teilweise bekannt und zweitens ist mit Obeticholsäure (OCA, **1**) erst kürzlich ein weiterer Modulator eines nukleären Rezeptors zugelassen worden.[3]

OCA (**1**) ist ein Agonist des Farnesoid X Rezeptors (FXR, NR1H4) mit der Indikation primär biliäre Cholangitis (PBC) und befindet sich derzeit in klinischen Studien der Phase III bei nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH).[4] Diese beiden Krankheitsbilder zeigen die Notwendigkeit neuer Wirkstoffe zur Behandlung des metabolischen Syndroms auf. In Zeiten eines vor allem in der westlichen Welt zunehmenden Lebensstils, der von mangelnder Bewegung und falscher Ernährung gekennzeichnet ist, wächst der Bedarf an neuen Therapieoptionen. Viele mit dem metabolischen Syndrom assoziierte Krankheiten weisen pathologische Entzündungsprozesse auf wie beispielsweise NASH, PBC oder auch Gicht.[5]

Außer dem Erkrankungskomplex des metabolischen Syndroms spielen Entzündungsprozesse auch bei einer weiteren Art von Erkrankungen eine Schlüsselrolle, deren Inzidenz in den letzten Jahren drastisch zugenommen hat: den neurodegenerativen Erkrankungen. Infolge des demografischen Wandels werden neue Ansätze zur Therapie neurodegenerativer Erkrankungen immer wichtiger. Unter anderem stellt der nukleäre Retinoid X Rezeptor (RXR, NR2B1-3) ein vielversprechendes Zielprotein dar, welches zur Auflösung von β-Amyloidfibrillen bei Alzheimer und der Remyelinisierung bei Multipler Sklerose (MS) beisteuern könnte.[6,7]

In dieser Arbeit wird die Entwicklung neuer Liganden nukleärer Rezeptoren beschrieben, die einen wichtigen Beitrag zur Therapie von Entzündungen leisten könnten.

1.1 Nukleäre Rezeptoren

1.1.1 Struktur und Funktion

Die Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehört zur Gattung ligandengesteuerter Transkriptionsfaktoren und moduliert die Genexpression in Abhängigkeit von Stimuli durch Liganden. Zu den natürlichen Liganden der 48 humanen nukleären Rezeptoren zählen unter anderem Steroidhormone, Fettsäuren, Gallensäuren und Xenobiotika.[1] Die meisten nukleären Rezeptoren zeigen den gleichen Grundaufbau (Abbildung 1.1).[8] Die *N*-terminale Region beinhaltet eine autonome Aktivierungsfunktion (AF-1), welche mit Coaktivatoren und/oder anderen Transkriptionsfaktoren interagieren

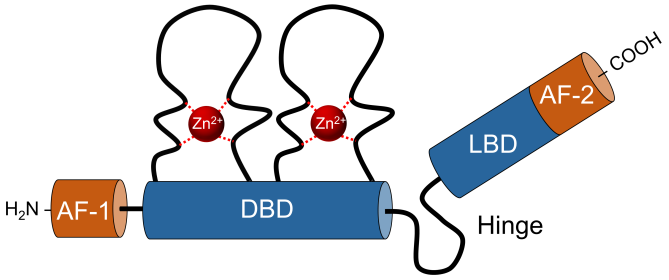


Abbildung 1.1: *Aufbau von nukleären Rezeptoren. Die ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren bestehen aus den N- bzw. C-terminalen Transaktivierungsdomänen (Aktivierungsfunktion, AF-1 und AF-2), einer DNA-Bindedomäne (DBD) und einer Ligandbindedomäne (LBD), welche mit der zweiten Aktivierungsfunktion (AF-2) ausgestattet ist. Adaptiert von [9].*

kann.[9] Die transkriptionelle Aktivität kann durch posttranslationale Modifikationen der AF-1 wie eine Phosphorylierung oder Markierung mit dem kleinen Ubiquitin-verwandten Modifikator (SUMO, *engl.* small ubiquitin-related modifier) ligandenunabhängig beeinflusst werden.[9,10] An sie schließt sich die DNA-Bindedomäne (DBD) an, welche sich durch zwei Zinkfinger-Motive auszeichnet, die in der Proteinfamilie mit Ausnahme von der *dosage-specific sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome-1* (DAX1, NR0B1) und dem *short heterodimeric partner* (SHP, NR0B2) hochkonserviert sind.[8] Über die Zinkfinger-Motive werden für den jeweiligen Rezeptor spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten Response-Elemente (RE) gebunden. Für einzelne oder eine Klasse von Rezeptoren selektive RE werden dabei durch direkte, invertierte oder evertierte Wiederholungen der kanonischen Sequenz RGGTCA (R steht für eine beliebige Purinbase) erzeugt.[8]
Über die Hinge-Region ist die Ligandbindedomäne (LBD) verknüpft, welche ihrem Namen entsprechend Liganden erkennt und in der sich eine weitere Aktivierungsfunktion (AF-2) befindet, die maßgeblich an der Wechselwirkung mit Coregulatoren beteiligt ist.[8] Auch die Aminosäuresequenz der LBD ist hochkonserviert unter den nukleären Rezeptoren.[14] Sie besteht meistens aus insgesamt zwölf α-Helices, welche ein aus drei Schichten bestehendes antiparalleles *Sandwich* bilden.[11,15] Helices 1-11 formen eine kompakte Struktur inklusive Ligandbindetasche, an deren Eingang Helix 12

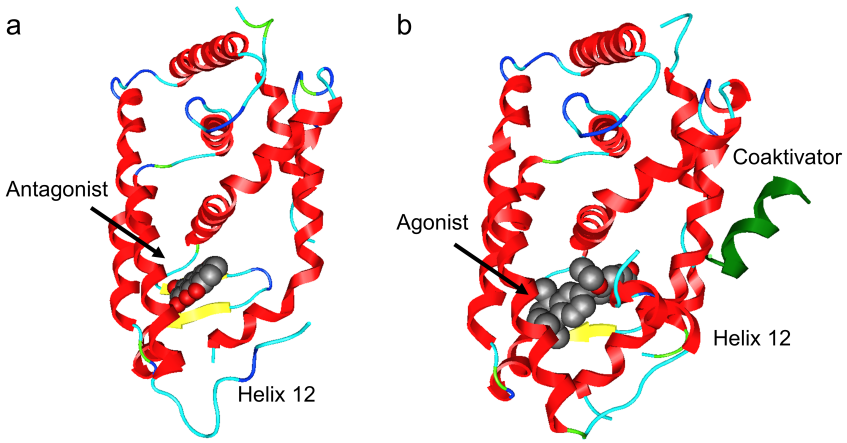


Abbildung 1.2: *Strukturelle Basis des Funktionsprinzips nukleärer Rezeptoren anhand des Beispiels Retinoid X Rezeptor.[11] In der ligandfreien und in der antagonistischen Konformation (a) ragt Helix 12 aus der kompakten Struktur der Ligandbindedomäne heraus und ist ungeordnet (PDB-ID 3R2A[12]). Durch einen Agonisten (b) induziert, kann sie die Bindetasche nach dem Prinzip einer Mausefalle verschließen. Dies destabilisiert die Bindung zu Corepressoren und ermöglicht die Rekrutierung von Coaktivatoren (PDB-ID 1MZN[13]).*

im ungebundenen Zustand hervorsteht (Abbildung 1.2a). Corepressoren binden an eine hydrophobe Rinne, welche Helices 3 und 4 umfasst und verhindern die Transkription. Bindet nun ein (orthosterischer) Agonist in die LBD, treten komplexe Prozesse auf, die dazu führen, dass sich Helix 12 nach dem Prinzip einer Mausefalle vor den Eingang der Ligandbindetasche legt und diese verschließt (Abbildung 1.2b).[15] Die konformationelle Änderung führt zur Destabilisierung der Bindung mit den Corepressoren, welche schließlich entlassen werden. Gleichzeitig ermöglicht dies die Rekrutierung von Coaktivatoren. Diese interagieren über LxxLL-Motive (L steht für Leucin und x für eine beliebige Aminosäure) mit einer hydrophoben Spalte, die neben Helix 3 und 4 auch Helix 12 umfasst.[15] Zusätzlich stabilisieren die Coaktivatoren Helix 12 in der neuen Position und führen letztendlich zur Aktivierung der Genexpression.
Antagonisten (wie in Abbildung 1.2a dargestellt) hingegen legen sich so in die Bindetasche, dass die LBD im inaktiven Zustand fixiert und Helix 12 nicht stabilisiert wird.[15] Dadurch verhindern sie die Rekrutierung von Coaktivatoren, sodass keine Genexpression stattfinden kann. Die Anordnung der Helix 12 ist nicht auf diese zwei Konformationen beschränkt, sondern es gibt weitere Positionen zwischen den Grenzfällen, welche zu unterschiedlichen Graden an (Ant-)Agonismus führen.[8] Entsprechende Liganden werden als Partialagonisten bezeichnet, deren Effekte im Vergleich zu Vollagonisten eine reduzierte Amplitude aufweisen.

1.1.2 Klassifikation

Nukleäre Rezeptoren können in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Die beiden gängigsten Methoden werden im Folgenden dargestellt.

Klassifizierung nach dem molekularen Mechanismus

Nukleäre Rezeptoren können nach dem molekularen Mechanismus der DNA-Bindung eingeteilt werden.[16,17] Die Mehrheit der nukleären Rezeptoren entfaltet ihre Wirkung nicht als Monomer, sondern bindet als Dimer an die DNA. Entsprechende Dimerisierungsoberflächen hierfür befinden sich sowohl in der LBD als auch der DBD.[2,9] Die **Klasse I** nukleärer Rezeptoren, zu denen die Steroidhormonrezeptoren gehören, ist in ligandfreier Umgebung im Zytosol lokalisiert und an Corepressoren

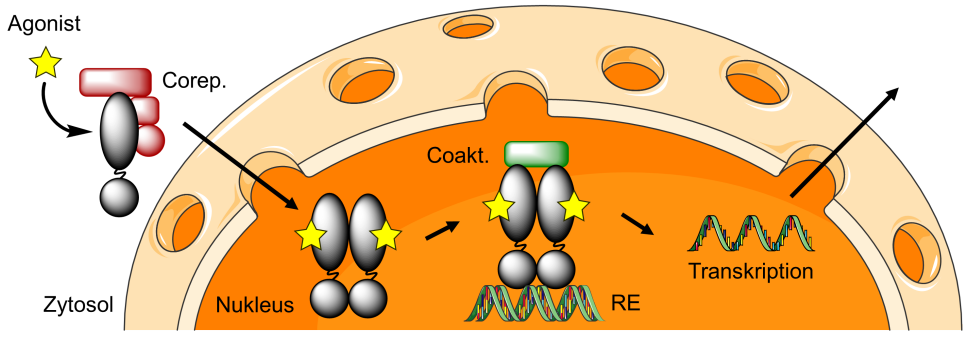


Abbildung 1.3: *Molekularer Mechanismus eines nukleären Rezeptors anhand des Beispiels der Klasse I. Die Bindung eines Agonisten veranlasst die Freisetzung der Corepressoren (Corep.) sowie die Dimerisierung (Homodimere). Nach Rekrutierung eines Coaktivators (Coakt.) bindet das Dimer an die entsprechenden Response-Elemente (RE) der DNA und fördert die Transkription der Zielgene.*

gebunden (Abbildung 1.3).[9] Nach erfolgter Bindung eines Agonisten werden die Corepressoren freigesetzt und die nukleären Rezeptoren translozieren als Homodimere in den Zellkern.[9] Dort angelangt, rekrutieren die Homodimere Coaktivatoren, binden an invertierte Wiederholungen der RE der DNA und aktivieren somit die Transkription der Zielgene.[9]
Je nach nukleärem Rezeptor können Dimere auch bereits in Abwesenheit von Liganden an die DNA binden (**Klasse II**).[17] Die Mitglieder dieser Klasse, die aus ligandenaktivierten Rezeptoren wie beispielsweise dem Leber X Rezeptor (LXR, NR1H2-3), dem Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR, NR1C1-3) und dem FXR bestehen, bilden Heterodimere mit dem universellen Partner RXR.[17] Diese RXR-Heterodimere weisen dabei eine weitere Besonderheit auf: Während *permissive* Heterodimere (Bsp. LXR, PPAR, FXR) bereits durch einen von beiden Liganden der Dimerpartner aktiviert werden, müssen für *nichtpermissive* (z.B. Thyroidhormonrezeptoren, TR, NR1A1-2) beide Partnerliganden vorhanden sein, um die Genexpression zu starten.[9] Die Anwesenheit beider Liganden führt bei permissiven Heterodimeren zu einer synergistischen Aktivierung.[9]
Weniger Bedeutung erfahren nukleäre Rezeptoren der Klassen III und IV, da ihre Liganden weitestgehend unbekannt sind (Waisenrezeptoren, *engl.* orphan receptors).[16] **Klasse III**-Rezeptoren binden wie Klasse I als Homodimere an die DNA, Erkennungssequenzen sind jedoch direkte Wiederholungen.[16] Rezeptoren der **Klasse IV** binden als Monomere an die RE der DNA.[16]

Klassifizierung nach der Phylogenese

Eine weitere Einteilung nukleärer Rezeptoren basiert auf deren Phylogenese und wurde vom Nuclear Receptors Nomenclature Committee erstellt.[18] Neben der Klassifikation wurde auch eine einheitliche Nomenklatur der nukleären Rezeptoren festgelegt, die in sieben Gruppen (0-6) unterteilt werden.[18] Jeder Name beginnt mit einem „NR“ für *nuclear receptor* (nukleärer Rezeptor). Die phylogenetisch engsten verwandten Mitglieder dieser Unterfamilien werden durch einen gemeinsamen Großbuchstaben und einer individuellen, fortlaufenden Nummer gekennzeichnet. Beispielsweise erhält FXR den Namen NR1H4.[18] Tabelle A.1, die sich im Anhang befindet, listet alle 48 humanen nukleären Rezeptoren mit ihrem phylogenetischen Namen auf.

1.1.3 Die Rolle von nukleären Rezeptoren in Entzündungsprozessen

Die Entzündung ist eine körpereigene Reaktion auf Noxen verschiedenster Art, welche chemischer oder physikalischer Natur sein können, aber auch Infektionen mit Mikroorganismen oder Parasiten.[19] Dabei reagiert das geschädigte Gewebe mit zahlreichen Vorgängen, die vaskuläre und zelluläre Reaktionen mit Immunantworten verknüpfen.[19] Als wichtige Transkriptionsfaktoren sind auch nukleäre Rezeptoren an den komplexen zellulären Signalwegen beteiligt.[20,21] Obwohl Entzündungsprozesse in erster Linie eine nützliche Reaktion sind und der Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands dienen, können sie bei andauernder Wirkung auch in einen schädlichen Prozess umschlagen.[19] Nukleäre Rezeptoren stellen insbesondere bei solch chronischen Entzündungen interessante Zielverbindungen dar.[20,21]
Historisch betrachtet hat sich der Glucocorticoidrezeptor (GR) als erster nukleärer Rezeptor mit antientzündlichen Eigenschaften herausgestellt.[1] Seine Liganden, die Glucocorticoide, werden bereits seit Mitte des 20. Jahrhunderts zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen eingesetzt und sind

auch heute z.B. noch bei rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), Psoriasis, Ekzemen, Asthma oder der Unterdrückung von Transplantatabstoßungen gebräuchlich.[20,21] Glucocorticoide inhibieren die transkriptionelle Aktivität zahlreicher entzündungsfördernder Mediatoren, welche in die Signalwege weiterer Transkriptionsfaktoren einschließlich des nukleären Faktors κB (NF-κB, *engl.* nuclear factor κB) und des Aktivatorproteins 1 (AP1, *engl.* activator protein 1) eingreifen, die maßgeblich an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Trotz intensiver Bemühungen ist bis heute nicht geklärt, wie der molekulare Mechanismus hierfür erfolgt.[20]
Die PPARs und LXRs sind zwei Familien von nukleären Rezeptoren, die eine tragende Rolle beim Lipidmetabolismus und Entzündungen spielen.[20–22] Agonisten von sowohl LXR als auch PPAR sind wichtige Wirkstoffkandidaten für Entzündungsprozesse, die eng in Zusammenhang mit metabolischen Dysfunktionen stehen, wie z.B. Atherosklerose. Sie werden in den Kapiteln 1.2.1 und 1.4.1 genauer erläutert. Neben diesen Rezeptoren mit etabliertem antientzündlichem Profil gibt es noch eine Reihe weiterer nukleärer Rezeptoren, deren antiphlogistisches Potenzial erst kürzlich entdeckt wurde.[21,23,24] FXR ist ein Gallensäuresensor und in allen Geweben exprimiert, in denen endogene Gallensäuren hohe Konzentrationen erreichen (Leber, Darm, Nieren).[23] Auch er kann in diesen Geweben entzündungshemmende Wirkungen entfalten und dient als Zielstruktur für NASH oder PBC.[4] Kapitel 1.3.1 beschäftigt sich im Detail mit der Rolle von FXR in Entzündungsprozessen.
Die NR4A-Subfamilie bestehend aus dem Nervenwachstumsfaktor IB (NGFIB, NR4A1, *engl.* nerve growth factor IB), dem Nur-verwandten Faktor 1 (NURR1, NR4A2, *engl.* Nur-related factor 1) und dem Neuronen-abgeleiteten Waisenrezeptor 1 (NOR1, NR4A3, *engl.* neuron-derived orphan receptor 1) wurde vor kurzem als therapeutische Zielproteine zur Behandlung von Entzündungen entdeckt.[24] Die drei strukturell sehr ähnlichen Transkriptionsfaktoren werden nach einer Schädigung sehr schnell durch Entzündungsmediatoren induziert, was dafür spricht, dass sie bereits in frühen Stadien des Prozesses benötigt werden.[24] Nichtsdestotrotz sind NR4As dazu in der Lage, Entzündungen zu hemmen und deren Regulation könnte eine protektive Reaktion des Immunsystems sein, die darauf abzielt, die Entzündung im späteren Verlauf aufzulösen.[24] Somit sind sie Bestandteil des negativen Feedbacks zur Kontrolle der Entzündungsreaktion. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind derzeit nicht bekannt.[24] Eine wichtige Stütze zu deren Aufklärung wären selektive Liganden der NR4A-Subfamilie, die zu den Waisenrezeptoren zählen. Allerdings sind nur wenige, zudem unselektive Liganden bekannt, die eine Evaluation der Wirksamkeit und Sicherheit von NR4A-Modulatoren in klinischen Studien bislang verhindern.[24]
Als Heterodimerpartner der Klasse II sticht RXR unter den weiteren Mitgliedern nukleärer Rezep-

Tabelle 1.1: *Liste weiterer nukleärer Rezeptoren und deren Beteiligung an entzündlichen Prozessen und Krankheiten nach [21]*

Nukleärer Rezeptor	Abkürzung	Assoziierter (Entzündungs-)Vorgang
ERα, ERβ	NR3A1-2	Gefäßverletzungen, entzündliche Darmerkrankungen
LRH1	NR5A2	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), Fettresorption über den Gastrointestinaltrakt
RARα, RARβ, RARγ	NR1B1-3	Asthma, Psoriasis, Akne, Photoaging, Krebs
VDR	NR1I1	Systemischer Lupus erythematodes, Diabetes mellitus Typ 1, rheumatoide Arthritis, CED, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

toren hervor. Antiphlogistische Effekte von permissiven Heterodimeren lassen sich auch durch selektive RXR-Agonisten erzeugen.[25] Darüber hinaus bildet RXR funktionale Homodimere, die noch nicht vollständig untersucht und deren Eigenschaften folglich nicht gänzlich bekannt sind.[26] RXRs sind Regulatoren von Zellproliferation und -differenzierung, sowie metabolischer Homöostase und Entzündungsprozessen.[27] Ihre Modulatoren werden derzeit vor allem in entzündlichen Prozessen um neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer oder MS untersucht, wo sie vielversprechende Eigenschaften aufweisen.[6,7] Nähere Informationen zu RXR als Zielstruktur in Entzündungsvorgängen liefert Kapitel 1.5.1.
Neben den genannten sind zahlreiche weitere nukleäre Rezeptoren an Entzündungsvorgängen beteiligt und die wichtigsten in Tabelle 1.1 aufgeführt.

1.2 Leber X Rezeptoren (LXR)

LXRs (NR1H2-3) wurden 1994 entdeckt und nach dem Gewebe benannt, in dem sie zuerst gefunden wurden.[28,29] Es sind zwei Subtypen, LXRα und LXRβ, bekannt, die eine hohe Sequenzidentität (ca. 78%) aufweisen, insbesondere in der LBD.[30,31] Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihres Expressionsmusters und, dadurch bedingt, leicht in ihrer physiologischen Rolle.[32–34] Während LXRα überwiegend in Leber und Geweben exprimiert wird, die für den Lipidstoffwechsel verantwortlich sind (Darm, Fettgewebe, Niere, Makrophagen), kommt LXRβ ubiquitär vor.[31] Wie alle Mitglieder der NR1-Untergruppe, bilden auch LXRs Heterodimere mit RXR, die sich durch einen permissiven Charakter auszeichnen.[31] Zunächst waren keine endogenen Liganden bekannt, später wurden die LXRs durch den Fund von oxidierten Cholesterolderivaten, den sogenannten Oxysterolen, „adoptiert“.[35]

1.2.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial

LXR nimmt eine bedeutende Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen ein.[30,31] Neben der Regulation des Cholesterolhaushalts als Hauptfunktion beeinflusst er auch den Lipid- und Glucosestoffwechsel. Darüber hinaus rückt LXR auch bei Entzündungen, die in Zusammenhang mit Lipiden stehen, zunehmend in den Fokus.[30]

Cholesterolstoffwechsel

Als intrazellulärer Cholesterolsensor ist LXR ein wichtiger Regulator von Aufnahme, Transport und Exkretion des Cholesterols.[30] Der nukleäre Rezeptor steuert den reversen Cholesteroltransport durch das Lipoprotein hoher Dichte (HDL, *engl.* high-density lipoprotein) aus peripherem Gewebe zurück in die Leber, wo Cholesterol in Gallensäuren umgewandelt wird, um schließlich ausgeschieden zu werden.[36,37] Die Zielgene von LXR, die hierfür verantwortlich sind, stammen aus der *ATP binding cassette* (ABC)-Transporterfamilie. Der Ausstrom von Cholesterol aus peripheren Zellen wie Makrophagen wird durch die Plasmamembranproteine ABCA1 und ABCG1 vermittelt, welche Cholesterol auf die Akzeptorproteine Apolipoprotein (APO) A1 bzw. HDL übertragen (Abbildung 1.4).[36,38] Dieser Effekt wird einerseits über das LXR-Zielgen APOE unterstützt.[39] Anderseits wird ein Transport von Cholesterol über das Lipoprotein niederer Dichte (LDL, *engl.* low-density lipoprotein) verhindert,

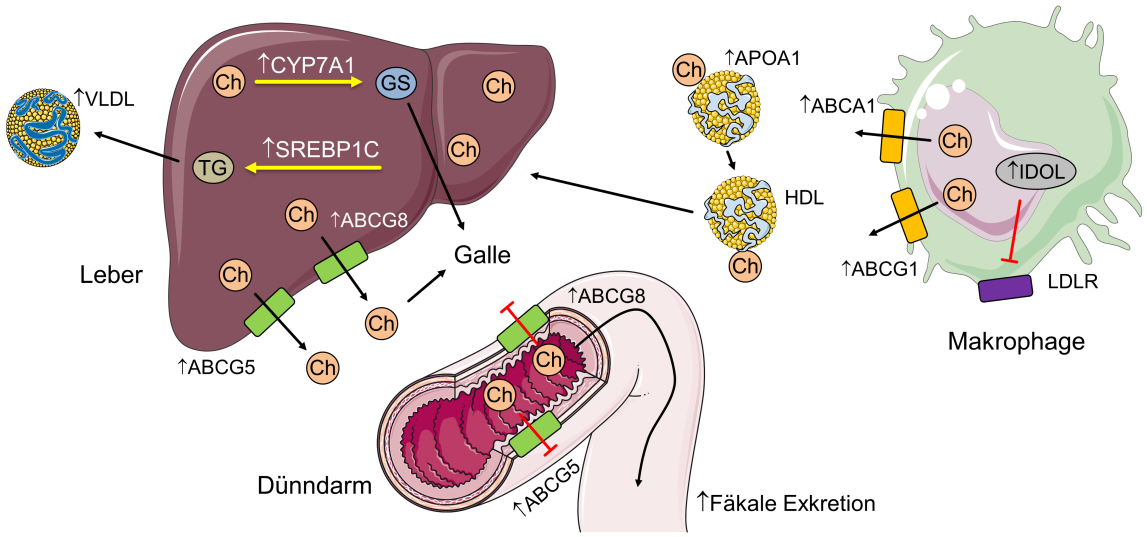


Abbildung 1.4: *LXR als Regulator des reversen Cholesteroltransports. Cholesterol (Ch) wird aus peripheren Geweben wie Makrophagen über LXR-Zielgene zurück in die Leber befördert. Gleichzeitig inhibiert LXR die Aufnahme von neuem Cholesterol. In der Leber wird Cholesterol durch LXR eliminiert und zu hydrophileren Gallensäuren (GS) oxidiert. In den Enterozyten des Dünndarms hingegen reguliert LXR die Aufnahme von Cholesterol negativ, sodass es vermehrt über die Fäzes ausgeschieden wird. LXR fördert außerdem die Triglycerid (TG)-Synthese in der Leber und die Freisetzung von VLDL. Adaptiert von [30, 31].*

indem der *inducible degrader of the LDL receptor* (IDOL) durch LXR induziert wird. Dieses Enzym stellt eine E3 Ubiquitinligase dar, die die Ubiquitinylierung des LDL-Rezeptors (LDLR) veranlasst, sodass dieser abgebaut wird und somit die Cholesterolaufnahme sinkt.[40] Das beladene HDL transportiert Cholesterol zurück zur Leber.[30,31] Dort aufgenommen, kann Cholesterol entweder durch ABCG5 und ABCG8 (beide durch LXR reguliert) aus der Leber ausgeschieden oder durch das Enzym CYP7A1 in Gallensäuren überführt werden.[41] Allerdings konnte die Induktion von diesem Enzym der Cytochrom P450-Familie durch LXR nur in Mäusen nachgewiesen werden.[42]
Auch in der apikalen Membran von intestinalen Enterozyten werden ABCG5 und ABCG8 exprimiert, welche absorbiertes Cholesterol zurück ins Lumen des Dünndarms transportieren.[36] In Mäusen führte folglich die Aktivierung von LXR zu einer Überexpression dieser Membranproteine und einer Limitierung der Cholesterolabsorption.[41]

Fettsäure- und Glucosemetabolismus

Zusätzlich zu ihrer Rolle im Cholesterolstoffwechsel sind LXRs ein Hauptregulator der Lipogenese und haben Einfluss auf die systemische Glucosehomöostase.[30] Die lipogene Aktivität von LXR rührt von der Induktion des *sterol-regulatory element binding protein 1C* (SREBP1C) und einigen Downstream-Genen von diesem Pfad wie der Fettsäuresynthase (FAS, *engl.* fatty acid synthase).[43,44] Die Behandlung von Mäusen mit synthetischen LXR-Agonisten stimulierte die Triglyceridsynthese in der Leber, die Sekretion des Lipoproteins sehr niedriger Dichte (VLDL, *engl.* very-low-density lipoprotein) und erhöhte Plasmatriglyceridspiegel (Abbildung 1.4).[43,44] LXR scheint im Glucosestoffwechsel involviert zu sein, eine eindeutige Rolle hat sich aber bislang nicht herauskristallisiert. Ein Tierversuch zeigte, dass LXR-Agonisten die Glucosetoleranz und Insulinsensitivität verbessern.[45] Paradoxerweise wiesen in einer weiteren Studie auch LXR-defizitäre *ob/ob* Mäuse eine gesteigerte Insulinsensitivität und

verminderte hepatische Steatose auf, was ein gewebespezifischer Effekt war.[46] In der Leber könnte LXR der Erkennung der Nahrungsaufnahme dienen, da es die Funktion von Insulin nachahmt, indem es die Gluconeogenese inhibiert und die Fettsäuresynthese steigert.[32]

Entzündungsprozesse

Bedingt durch seine Hauptfunktion als zentraler Regulator des Cholesterolhaushalts, ist LXR auch an entzündlichen Prozessen beteiligt, die das Steroid und seine Metaboliten vermitteln. Die Atherosklerose ist gekennzeichnet durch pathologisch veränderte Cholesterolspiegel, in deren Initiierungsphase cholesterolbeladene Makrophagen in der arteriellen Wand akkumulieren und Schaumzellen bilden.[30] Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese ist die Ineffizienz bzw. das Unvermögen der Makrophagen, sich des überschüssigen Cholesterols über den reversen Cholesteroltransport zu entledigen.[30] Hier weist LXR eine protektive Funktion auf, wie Versuche an $LDLR^{-/-}$- und $APOE^{-/-}$-Mäusen bestätigten.[47] Die Behandlung mit dem LXR-Agonisten GW3965 (**2**) reduzierte die Menge an geschädigtem Gewebe in einem Tiermodell der Atherosklerose deutlich.[47] Obwohl die antiatherosklerotische Wirkung weitgehend auf LXRα zurückzuführen war, vermochte LXRβ in LXRα Knockout-Mäusen diesen Verlust partiell zu kompensieren.[34]
Neben Atherosklerose könnte eine LXR-Modulation auch bei Alzheimer zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen. Derzeit wird vermutet, dass Alzheimer durch die Überproduktion und Ablagerung von β-Amyloidfibrillen verursacht wird. APOE, ein direktes Zielgen von LXR, konnte mit der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht werden.[48] Synthetische LXR-Liganden lieferten in Tiermodellen von Alzheimer eine verstärkte Expression von ABCA1 und APOE im Gehirn und erhöhten die Lipidierung von APOE, dem primären Apolipoprotein im Gehirn.[49,50] Hohe Spiegel an mit viel Fetten beladenem APOE wiederum können zum Abbau von β-Amyloidpeptiden beitragen, was eine Progression der Krankheit im Tiermodell aufhalten konnte.[50]
Cholesterol ist ein wesentlicher Bestandteil des Myelins, das bei MS abgebaut und von Makrophagen aufgenommen wird. Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Metaboliten des Cholesterols LXR aktivieren, wodurch nicht nur die Remyelinisierung angeregt, sondern auch die Expression proentzündlicher Enzyme wie Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), Cyclooxigenase (COX) 2 und die Sekretion von Zytokinen wie die Interleukine (IL) 1β und 6 inhibiert werden.[51–53] Im Unterschied zur Funktion in Leber und Makrophagen steht die Forschung um die Rolle von LXR im Gehirn noch in anfänglichen Stadien und es bedarf weiterer Untersuchungen, um LXR als Zielstruktur für Alzheimer oder MS zu validieren.
GW3965 (**2**) begrenzte in Makrophagen die Überexpression proinflammatorischer Gene wie NOS, COX2, Tumornekrosefaktor α (TNFα) sowie die Matrix-Metalloprotease (MMP) 9, was bei MMP9 zumindest teilweise durch die negative Regulation des NF-κB-Signalwegs verursacht wird.[32,53,54] In einem reziproken Ansatz unterdrückte die mikrobielle Stimulation der ebenfalls proentzündlichen Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, *engl.* toll-like receptor) 3 und 4 die transkriptionelle Aktivität von LXR, sodass die Expression von LXR-Zielgenen sank.[55] LXR Knockout-Mäuse waren empfindlicher gegenüber Lipopolysacchariden (LPS) und einer bakteriellen Infektion, während Wildtyp-Mäuse, die mit GW3965 (**2**) vorbehandelt wurden, resistenter waren.[56] Es besteht der Verdacht, dass diese antientzündlichen Effekte zur antiatherosklerotischen Wirkung von LXR beitragen.[32]

Therapeutische Rolle

LXR-Modulatoren weisen zahlreiche positive Effekte auf, die vor allem zur Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten vielversprechend sind. LXR-Agonisten steigern den reversen Cholesteroltransport zurück in die Leber, die Verstoffwechslung von Cholesterol und dessen Ausscheidung. Leider verhinderte die LXR-induzierte Lipogenese in der Leber die Weiterentwicklung vieler LXR-Agonisten, da infolgedessen in klinischen Studien erhöhte Trigylceridplasmaspiegel auftraten.[47] Aus demselben Grund kam bislang kein LXR-Agonist über eine klinische Studie der Phase I hinaus.[30] Da in der Leber der Subtyp α dominiert, wäre die Entwicklung eines selektiven LXRβ-Agonisten eine mögliche Option, diese Probleme zu beseitigen.[30] Wie jedoch zu Beginn des Kapitels erklärt, sind die Ligandbindetaschen der beiden Subtypen sehr ähnlich, sodass sich die Suche nach einem subtypspezifischen Liganden schwer gestaltet. Paradoxerweise deuten Studien darauf hin, dass sowohl LXR-Agonisten als auch Antagonisten die Glucosetoleranz und Insulinsensitivität steigern und aus diesem Grund potentielle antidiabetische Wirkstoffkandidaten sind.[45,46] Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz liefern LXR-defizitäre Mäuse, bei denen die Verlagerung der *de novo* Lipogenese von der Leber ins Fettgewebe beobachtet wurde.[46] Dadurch ergab sich eine verbesserte Insulinsensitivität, die der Behandlung mit einem PPARγ-Agonisten ähnelt. Die Konsequenz der Inhibition von LXR ist ein verringerter reverser Cholesteroltransport, der den antidiabetischen Nutzen infrage stellt.[46] Ein selektiver LXRβ-Agonist könnte nicht nur bei kardiovaskulären Erkrankungen, sondern auch als Antidiabetikum eingesetzt werden. LXR-Agonisten sind in der Alzheimer-Forschung von besonderem Interesse, da gezeigt werden konnte, dass sie zum Abbau von β-Amyloid beitragen.[50] Inwiefern die breite Modulation der Lipidspiegel und die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke dieses Konzept behindern, müssen künftige Studien belegen.

1.2.2 Liganden des LXR

Oxysterole bilden die **endogenen LXR-Liganden**, welche nicht zwischen LXRα und LXRβ diskriminieren (pan-LXR-Agonisten).[35,57,58] Sie wurden gegen Ende des 20. Jahrhunderts entdeckt und sind physiologische Metaboliten des Cholesterols (Abbildung 1.5). Die Liganden umfassen mit 20(*S*)- (**3**), 22(*R*)- (**4**), 24(*S*)- (**5**), 25-Hydroxycholesterol (**6**) und 24(*S*),25-Epoxycholesterol (**7**) in der Seitenkette hydroxylierte Cholesterole mit ähnlicher Potenz im einstellig mikromolaren Bereich (Luciferase-Reportergenassay, CV-1 Zellen).[35,57,58] Während Cholesterol selbst inaktiv ist, zeigt das 7α-Hydroxycholesterol (**8**), dass eine Hydroxylierung nicht nur in der Seitenkette, sondern auch am Steroidgerüst zu Aktivität an LXRs führt.[35] Metabolisch betrachtet sind in der Seitenkette oxidierte Cholesterole als Intermediate der Steroidbiosynthese und 7α-Hydroxycholesterol (**8**) als das erste Intermediat in der Gallensäuresynthese einzuordnen.[35] Dabei wird Cholesterol durch das LXR-Zielgen CYP7A1, auch 7α-Hydrolase genannt, umgesetzt. Weiter oxidierte (dihydroxylierte) Derivate sind hingegen nicht dazu in der Lage, an LXR zu binden.[57] Zwei weitere Vertreter endogener Agonisten sind mit dem Sterol *follicular fluid meiosis-activating sterol* (FF-MAS, **9**) und 24-Dehydrocholesterol (Desmosterol, **10**) Zwischenprodukte in der Cholesterolbiosynthese.[35,59] Auch diese verzeichnen mikromolare Aktivitäten, die im Bereich der hydroxylierten Cholesterole **3**-**8** liegen.[57,59] Insgesamt bestätigen seine physiologischen Agonisten die Funktion von LXR als Cholesterolsensor.

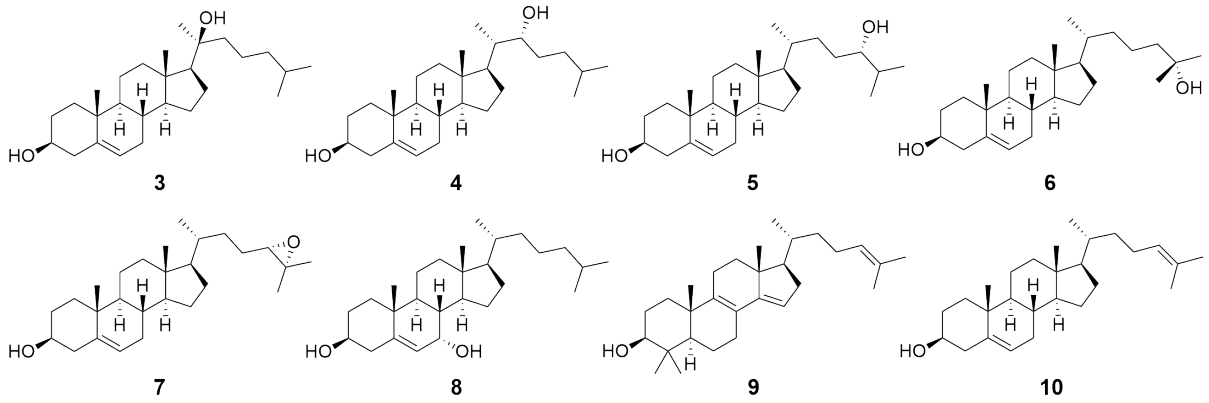


Abbildung 1.5: *Endogene LXR-Agonisten sind Oxysterole. Zu ihnen gehören 20(S)- (**3**), 22(R)- (**4**), 24(S)- (**5**) und 25-Hydroxycholesterol (**6**), sowie 24(S),25-Epoxycholesterol (**7**), 7α-Hydroxycholesterol (**8**) sowie die Intermediate der Cholesterolbiosynthese FF-MAS (**9**) und Desmosterol (**10**).*

Der erste beschriebene **synthetische LXR-Agonist** ist T0901317 (**11**, Abbildung 1.6) und wurde entwickelt, um die Funktion von LXR zu untersuchen (*tool compound*).[60] Es zeigte sich, dass **11** die hepatische Lipogenese fördert und die Plasmaspiegel von Triglyceriden und Phospholipiden erhöht.[60] Später sollte sich herausstellen, dass T0901317 (**11**) neben LXR auch FXR, den Pregnan X Rezeptor (PXR, NR1I2) und den Retinsäurerezeptor (RAR, NR1B1-3, *engl.* retinoic acid receptor)-verwandten Waisenrezeptor (ROR, NR1F1-3, *engl.* RAR-related orphan receptor) aktiviert.[61–63] Um herauszufinden, ob die lipogenen Effekte von **11** von der LXR-Aktivierung herrühren oder substanzspezifisch sind, wurde die Entwicklung eines selektiven Agonisten angestrebt.[64] GW3965 (**2**) bewirkte in präklinischen Studien jedoch außer zahlreichen positiven Eigenschaften auch eine gesteigerte Lipidsynthese und verursachte gar eine Lebersteatose in den Versuchstieren.[47] LXR-623 (WAY252623, **12**) ist der erste LXR-Agonist, der es in klinische Untersuchungen geschafft hat.[65] Obwohl das nichtacide Indazolderivat aussichtsreiche antiatherosklerotische Merkmale zeigte, wurde das Projekt aufgrund von unerwünschten psychischen und neurologischen Arzneimittelwirkungen beendet.[65] Bislang ist

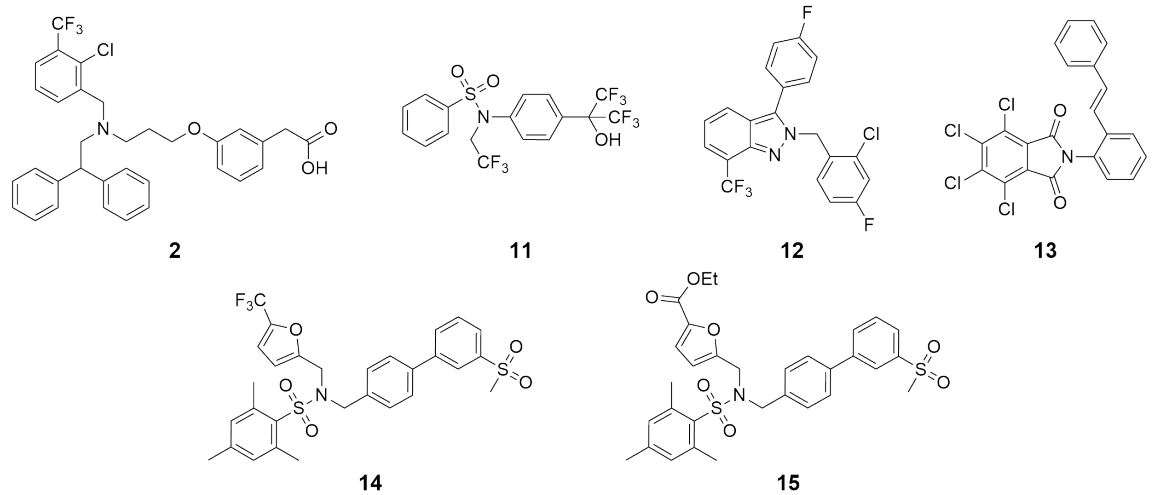


Abbildung 1.6: *Ausgewählte synthetische LXR-Agonisten sind GW3965 (**2**), T0901317 (**11**), Partialagonist LXR-623 (**12**) und selektiver LXRβ-Agonist **13**. Synthetische nichtsteroidale LXR-Antagonisten sind GSK2033 (**14**) und der leberspezifische LXR-Inhibitor SR9238 (**15**).*

kein Wirkstoffkandidat mit LXR als Zielstruktur über Phase I-Studien hinausgekommen. Der aktuelle Trend geht zur Synthese selektiver LXRβ-Agonisten, von denen man sich eine Verbesserung gegenüber bisheriger Liganden hinsichtlich lipogener Effekte verspricht.[66,67] Tetrachlorphthalimid **13** weist eine mindestens 100-fache Selektivität von LXRβ über LXRα (Reportergenassay in HEK293-Zellen) auf und zeigt, dass trotz hoher Konservierung der Aminosäuren in der Ligandbindetasche Selektivität erzielt werden kann.[67]

Unter den **LXR-Antagonisten** sind im Vergleich zu den Agonisten nur wenige verfügbar. Pan-LXR-Antagonist GSK2033 (**14**), der als *tool compound* dient (Abbildung 1.6),[68] wurde durch die Einführung einer labilen Estergruppe (SR9238, **15**), die den Trifluormethylsubstituenten ersetzt, optimiert.[69] Der Ethylester wird im Plasma schnell von Lipasen zu einem inaktiven Metaboliten gespalten, sodass der Antagonist hauptsächlich in der Leber wirkt. Dass dieses Konzept zumindest im NASH-Tiermodell aufgeht, zeigte ein Projekt, in dem SR9238 die hepatische Steatose, Entzündung und Fibrose reduzierte.[70]

1.3 Farnesoid X Rezeptor (FXR)

Im Jahr 1995 wurde ein weiterer Waisenrezeptor entdeckt, der nach dem ersten identifizierten Liganden, dem Farnesol, FXR getauft wurde.[71,72] Farnesolmetaboliten sind Intermediate des Cholesterol- und Gallensäurestoffwechsels und lieferten Hinweise auf die endogenen FXR-Liganden, die nur vier Jahre später gefunden wurden. Gallensäuren sind die physiologischen FXR-Agonisten und deren Homöostase wird maßgeblich durch FXR reguliert.[73,74] FXR (NR1H4) gehört zur Subfamilie 1 nukleärer Rezeptoren und entfaltet seine transkriptionelle Aktivität primär durch Ausbildung permissiver Heterodimere mit RXR. In Mäusen treten zwei Subtypen auf, FXRα und FXRβ.[75] Beim Menschen ist lediglich FXRα relevant, der im Folgenden FXR genannt wird. Es existieren vier Isoformen von FXR (FXRα1-4), die durch unterschiedliche Promotoren und alternatives Spleißen zustande kommen.[76] Sie unterscheiden sich nur geringfügig am *N*-Terminus sowie der Hinge-Region und führen nach aktuellem Wissensstand nur zu geringfügigen Unterschieden in der Stärke der Induktion einiger FXR-regulierter Gene.[77] FXR wird überwiegend in Geweben wie Leber, Darm, Nieren und Nebennieren exprimiert, die in Kontakt mit Gallensäuren treten.[73]

1.3.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial

FXR ist ein Gallensäuresensor, der dafür verantwortlich ist, Zellen vor hepatotoxischen Gallensäurekonzentrationen zu schützen.[78] Zudem beeinflusst er den Lipid- und Glucosestoffwechsel sowie Entzündungsprozesse und ist daher an vielen physiologischen wie auch pathophysiologischen Vorgängen beteiligt.[79] Aufgrund dessen erfährt FXR eine wichtige Bedeutung als pharmakologische Zielstruktur.

Gallensäurenhomöostase

In der Leber werden Gallensäuren in 15 Stufen ausgehend von Cholesterol biosynthetisiert.[79] Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt hierbei ist die CYP7A1-katalysierte Umsetzung zu 7α-Hydroxy-

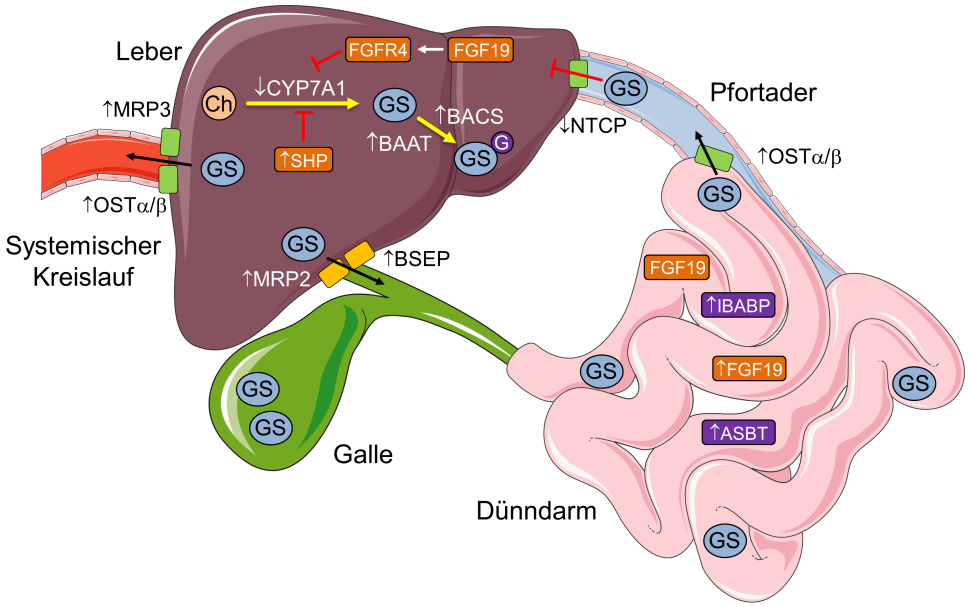


Abbildung 1.7: *FXR als Regulator der Gallensäurehomöostase. In der Leber kontrolliert FXR die Gallensäurespiegel durch Inhibition ihrer Biosynthese und Erhöhung des Efflux in Galle und den systemischen Kreislauf. Im Dünndarm werden Gallensäuren absorbiert und in die Pfortader sezerniert. Die negativ regulierte Rückaufnahme von Gallensäuren in die Leber schließt den enterohepatischen Kreislauf. Ch, Cholesterol; G, Glycin; GS, Gallensäuren. Adaptiert von [79, 85].*

Derivaten. Gallensäuren haben eine große Bedeutung für den Gastrointestinaltrakt, da sie Emulgatoren sind, welche die Resorption lipophiler Nahrungsbestandteile im Darm ermöglichen.[78] FXR ist ein wichtiger Regulator des enterohepatischen Kreislaufs der Gallensäuren (Abbildung 1.7).[79] Er inhibiert die Gallensäuresynthese über das Schlüsselenzym CYP7A1 auf indirektem Weg.[79] Dies geschieht durch positive Regulation des Waisenrezeptors SHP, der mit zwei weiteren nukleären Rezeptoren, dem Leberrezeptor Homolog 1 (LRH1, NR5A2, *engl.* liver receptor homolog 1) und LXRα, dimerisiert.[80,81] Dadurch bewirkt er die Transrepression deren Zielgene, zu denen CYP7A1 zählt.[82] Zusätzlich verursacht eine FXR-Aktivierung die Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF, *engl.* fibroblast growth factor) 19 im Dünndarm, der über die Pfortader zurück in die Leber gelangt.[83] Dort aktiviert er den FGF-Rezeptor (FGFR) 4, infolgedessen es zu einer SHP-unabhängigen Inhibition von CYP7A1 kommt.[83]
Weiterhin kontrolliert FXR die Ausscheidung von Gallensäuren aus der Leber und schützt sie somit vor hepatotoxischen Konzentrationen. Dies geschieht einerseits mittels Abtransport in die Gallenblase, wofür die Hydrophilie durch Konjugation mit Glycin erhöht wird.[84] Hierfür sind zwei Schritte notwendig. Im ersten überführt die Gallensäure-CoA-Synthase (BACS, *engl.* bile acid coenzyme A synthetase) die freien Gallensäuren in reaktive Thioester, im zweiten übertragt die Gallensäure-CoA:Aminosäure-*N*-Acyltransferase (BAAT, *engl.* bile acid-CoA:amino acid *N*-acyltransferase) Glycin auf die Gallensäuren. Über die Transporter *multidrug resistance-related protein* (MRP) 2 und *bile salt export pump* (BSEP), die sich in der kanalikulären Membran von Hepatozyten befinden und von FXR induziert werden, gelangen die Gallensäuren schließlich in die Gallenblase.[86,87] Andererseits können Gallensäuren auch durch die ebenfalls induzierten, basolateralen, integralen Membranproteine MRP3 und *organic solute transporter* (OST) α und β in die systemische Zirkulation exportiert werden.[79,88] FXR verhindert durch den negativ regulierten Na^+/Taurocholat Cotransporter (NTCP, *engl.* Na^+/taurocholate cotransporting peptide) die aktive Rückaufnahme von Gallensäuren, die vom

Darm über die Pfortader zurück in die Leber geführt werden.[89]
Im Darm bewirkt FXR neben der gesteigerten Sekretion von FGF19 auch die Komplettierung des enterohepatischen Gallensäurekreislaufs. Dazu reguliert es den apikalen natriumabhängigen Gallensäuretransporter (ASBT), über den Gallensäuren apikal absorbiert werden, um dann über das ileale Gallensäuren-Bindeprotein (IBABP, *engl.* ileal bile acid binding protein) zur basolateralen Seite der Membran gebracht zu werden.[90,91]

Lipid- und Glucosestoffwechsel

Neben seiner zentralen Rolle als Gallensäuresensor ist FXR auch am Cholesterolmetabolismus beteiligt. Durch die Inhibition von CYP7A1 kommt es zu einem Anstieg der Cholesterolspiegel in Leber und Plasma, wie Tierversuche an $FXR^{-/-}$-Mäusen bestätigten.[92] In diesen Mäusen waren zudem die Triglyceridplasmaspiegel erhöht, deren Biosynthese in der Leber durch SREBP1C reguliert wird. Daraufhin konnte gezeigt werden, dass FXR die Expression von SREBP1C wie auch einiger lipogener Gene wie FAS, die von SREBP1C reguliert sind, über SHP unterdrückt.[93]
Außerdem entfaltet FXR eine triglyceridsenkende Wirkung über die Induktion verschiedener Schlüsselenzyme. Zu diesen gehören das Apolipoprotein C2 (APOC2), ein Aktivator der Lipoproteinlipase (LPL), die für die Hydrolyse von VLDL-Triglyceriden verantwortlich ist und der VLDL-Rezeptor, der den Abbau triglyceridreicher Lipoproteine fördert.[94,95] Zudem induzieren natürliche wie auch synthetische FXR-Agonisten die Expression von PPARα, welcher die β-Oxidation von Fettsäuren anregt.[96]
Die Rolle von FXR im Glucosestoffwechsel ist eng verflochten mit weiteren nukleären Rezeptoren wie SHP, LXR und PPAR und sehr komplex. Über SHP greift FXR indirekt in die Expression wichtiger Enzyme der Gluconeogenese ein, wie die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und die Glucose-6-Phosphatase (G6Pase).[97,98] Die Behandlung von Mäusen mit einem FXR-Agonisten führte entsprechend zur Erniedrigung der Glucosespiegel in Plasma, Erhöhung der Glycogenspiegel in der Leber und verbesserter Insulinsensitivität.[97–99]

Entzündungsprozesse

Aufgrund seiner Hauptfunktion im Gallensäurehaushalt ist FXR an Entzündungsprozessen beteiligt, die mit pathologisch veränderten Gallensäurespiegeln einhergehen. Diese werden im nächsten Abschnitt behandelt. FXR ist außerdem ein Gegenspieler des Entzündungsmediators NF-κB, das proentzündliche Gene wie die IL-1β und IL-6, sowie das Monozyten-chemotaktische Protein (MCP, *engl.* monocyte chemoattractant protein) 1 und TNFα reguliert.[100,101] FXR und NF-κB beeinflussen sich gegenseitig in ihrer transkriptionellen Aktivität.[100,102] Während NF-κB die Expression von FXR sowie seinen Zielgenen SHP und BSEP unterdrückt, destabilisiert die Aktivierung von FXR die Bindung zwischen NF-κB und DNA-Sequenzen.[100,102] FXR-Agonisten sind dazu in der Lage, die Expression NF-κB-regulierter Gene in Hepatozyten zu inhibieren.[100] Im Einklang damit waren in $FXR^{-/-}$-Mäusen die mRNA-Level der induzierbaren NOS (iNOS), COX2, des Interferon γ-induzierbaren Proteins (IP, *engl.* interferon-γ-inducible protein) 10 und Interferon γ nach Stimulation mit LPS höher als in Wildtyp-Kontrollen.[100] Die Autopsie der $FXR^{-/-}$-Lebern zeigte massiv nekrotisches und entzündetes Gewebe nach LPS-Behandlung, während die gleiche Dosis bei Wildtyp-Mäusen keine signifikanten Leberschädigungen verursachte.[100] Neben Hepatozyten konnten FXR-Agonisten auch im Darm eine

protektive Funktion bei Entzündungen zeigen.[101] Die Behandlung mit FXR-Agonist OCA (**1**) schützte Mäuse vor einer chemisch induzierten Colitis und reduzierte zudem die Produktion proinflammatorischer Zytokine in der Darmmucosa.[101] Darüber hinaus senkte OCA (**1**) in verschiedenen Immunzellen, die Patienten mit CED entnommen wurden, die Sekretion von TNFα.[101] Insgesamt erwies sich FXR in diesen Studien als wertvolle Zielstruktur für neue therapeutische Strategien gegen Entzündungen der Leber und des Darms.

Therapeutische Rolle

FXR besitzt ein ausgeprägtes therapeutisches Potenzial, das sich durch seine vielseitige physiologische Rolle ergibt. Der bedeutsamste therapeutische Nutzen einer FXR-Modulation besteht bei Lebererkrankungen wie PBC und NASH.[103] PBC ist eine chronische Autoimmunerkrankung, in deren Verlauf es zur entzündlichen Zerstörung des Lebergewebes kommt. Mit seiner antifibrotischen und den Gallenfluss fördernden Wirkung stellt FXR dabei ein attraktives Ziel dar, was 2016 in die Zulassung von OCA (**1**, Handelsname Ocaliva®) zur Zweitlinientherapie mündete.[4] Bei OCA (**1**) handelt es sich um ein semisynthetisches Gallensäurederivat, das an FXR vollagonistische Aktivität zeigt. In klinischen Studien reduzierte OCA (**1**) im Vergleich zur Placebogruppe die Spiegel der alkalischen Phosphatase, Alanin-Aminotransferase und γ-Glutamyltransferase als Surrogatparameter.[104,105] Ebenso wurden weniger inflammatorische Marker wie Immunglobulin M detektiert, sodass die choleretische und antientzündliche Wirkung an PBC-Patienten belegt wurde.[105] Aufgrund der positiven Studienlage bekam OCA (**1**) in dieser Indikation den *orphan drug* Status von der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA (*food and drug administration*) und der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) verliehen.[4]
NASH ist die fortgeschrittene Stufe der nichtalkoholischen Fettleber (NAFLD), die als hepatische Manifestation des metabolischen Syndroms angesehen wird.[106] Die Pathogenese der NAFLD ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von Fett in der Leber, welche bei Fortschreiten eine chronische Entzündung hervorrufen kann (NASH). Unbehandelt kann NASH zu einer Leberzirrhose oder einem Leberzellkarzinom führen.[106] Ein möglicher Therapieansatz ist der Einsatz von FXR-Agonisten mit antientzündlichen und antifibrotischen Eigenschaften. Die Leberhistologie OCA-behandelter Patienten war im Vergleich zur Placebogruppe von signifikant kleineren Fetteinlagerungen gekennzeichnet.[107] Des Weiteren verbesserte OCA (**1**) die hepatische Steatose, Entzündungsmarker und Fibrose, aber die therapeutische Wirksamkeit konnte noch nicht ausreichend belegt werden.[107] Derzeit befindet sich OCA (**1**) in Phase III klinischer Studien zur Behandlung von NASH und es kann mit einer baldigen Zulassung gerechnet werden, nicht zuletzt, weil bisher keine Therapieoption verfügbar ist.[4]
Der Einsatz von FXR-Modulatoren als Antidiabetikum oder Lipidsenker bei Atherosklerose scheint unwahrscheinlich. Die Gründe hierfür sind eine geringe Beteiligung von FXR an der Pathogenese bzw. heterogene präklinische Studienlagen.[97,108,109] Jedoch ist die therapeutische Modulation von FXR bei anderen entzündlichen und fibrotischen Prozessen in Darm und Nieren denkbar.[110] Die Inhibition von TNFα und weiterer proinflammatorischer Gene validieren FXR als Zielstruktur für chronisch-entzündliche Erkrankungen wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn.[101,110]

1.3.2 Liganden des FXR

Farnesol (**16**) und seine Metaboliten wurden 1995 als erste FXR-Liganden entdeckt, aktivieren FXR jedoch nur bei supraphysiologischen Konzentrationen (Abbildung 1.8).[72] Die **endogenen Liganden** sind Gallensäuren, die eine moderate Potenz verzeichnen und deren wichtigster Vertreter die primäre Chenodesoxycholsäure (CDCA, **17**) ist ($EC_{50} \approx 8\,\mu M$).[73,74,111] Mit EC_{50}-Werten von 10-50 µM zeigen die sekundären Gallensäuren Lithocholsäure (LCA, **18**) und Desoxycholsäure (DCA, **19**) eine schwächere Potenz.[111] Durch ihre einzigartige Struktur unter den Steroiden (A- und B-Ring sind *cis*-verknüpft) und der räumlichen Anordnung polarer Hydroxy- und unpolarer Methylreste zeigen sich Gallensäuren sehr selektiv für FXR.[73,79] CDCA wird seit den 1970er Jahren bei der Therapie von Gallensteinen eingesetzt und senkt dabei die Plasmaspiegel von Triglyceriden effektiv.[79]

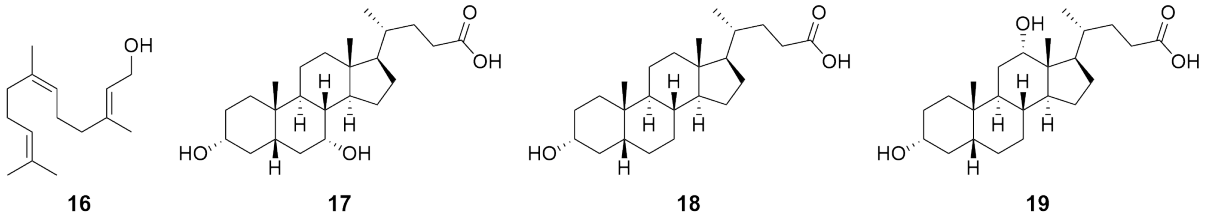


Abbildung 1.8: *Natürliche FXR-Agonisten. Obwohl kein endogener Ligand ist Farnesol (**16**) der Namensgeber des FXR. Unter physiologischen Bedingungen aktivieren Chenodesoxycholsäure (CDCA, **17**), Lithocholsäure (LCA, **18**) und Desoxycholsäure (DCA, **19**) FXR.*

Unter den **synthetischen FXR-Liganden** findet man sowohl semisynthetische Steroidderivate wie auch nichtsteroidale Modulatoren (Abbildung 1.9). Das Isoxazol GW4064 (**20**) ist ein nichtsteroidaler FXR-Agonist, der zwar sehr potent an FXR ist ($EC_{50} = 70\,nM$), jedoch auch mit zahlreichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR, *engl.* G protein-coupled receptor) interagiert.[79,112,113] Zu diesen zählt TGR5, der neben FXR der zweite große Spieler in der Gallensäurehomöostase ist.[114] TGR5 ist ein Membranrezeptor, der ubiquitär exprimiert wird und zahlreiche intrazelluläre Signalwege durch Aktivierung mit Gallensäuren reguliert.[115] Tierstudien legten nahe, dass er an der Energiehomöostase

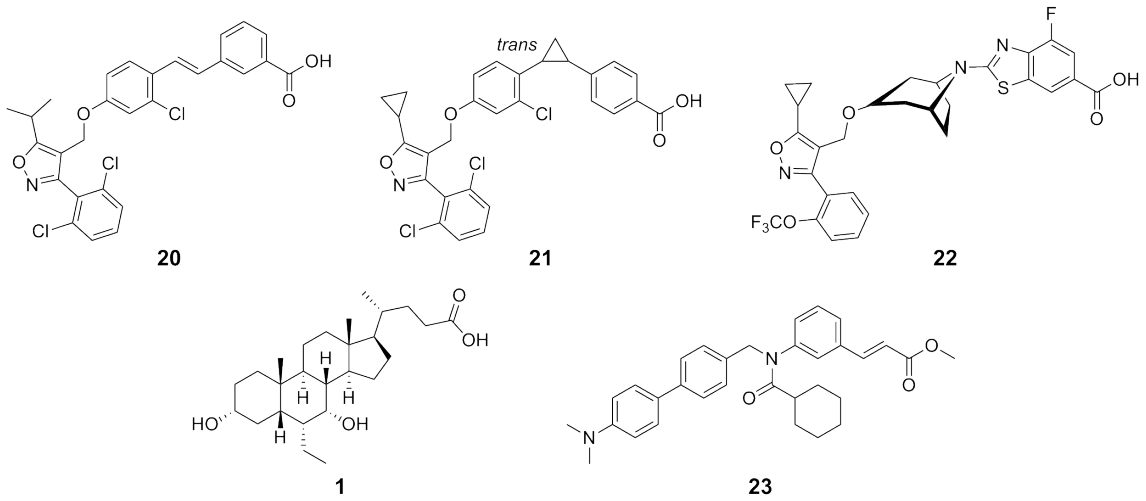


Abbildung 1.9: *Synthetische FXR-Modulatoren sind das nichtsteroidale GW4064 (**20**), dessen Derivate GS-9674 (**21**) und Tropifexor (**22**) sowie das steroidale OCA (**1**) und der darmspezifische FXR-Agonist Fexaramin (**23**).*

beteiligt ist.[115] Obwohl aus diesem Grund GW4064 (**20**) für eine klinische Testung ungeeignet war, lieferte es die Grundlage zur Entwicklung selektiver Derivate.[78,79] Unter diesen werden aktuell das Eutomer des *trans*-verknüpften Cyclopropanderivats **21** (GS-9674, PX-104) und das Tropan Tropifexor (**22**) in klinischen Studien der Phase II zu NASH, PBC und der primär sklerosierenden Cholangitis evaluiert.[116–118] Das semisynthetische CDCA-Derivat OCA (**1**) verfügt über eine zusätzliche Ethylgruppe in Position 6α, welche eine Potenzsteigerung um den Faktor 100 bewirkt, sodass CDCA (**17**) einen EC_{50}-Wert von 8,7 µM und OCA (auch 6-EDCA genannt) von 0,098 µM aufweist.[119,120] Dieser Umstand ist durch Besetzung einer kleinen lipophilen Untertasche zu erklären.[121] Fexaramin (**23**) ist ein weiterer nichtsteroidaler FXR-Vollagonist, der sich durch ein besonderes Genexpressionsprofil auszeichnet.[122] Dies rührt vom strukturellen Unterschied zu CDCA (**17**) oder OCA (**1**), der eine unterschiedliche Coaktivator-Rekrutierung verursacht.[122] Da seine Resorption aus dem Darm sehr gering ist, gilt Fexaramin (**23**) als darmspezifischer Ligand.[123] Aus therapeutischer Hinsicht wäre jedoch für NASH und PBC ein leberspezifischer FXR-Agonist wünschenswert, der die Nebenwirkungen in anderen Organen minimiert.[124] Der FXR-Vollagonismus inhibiert neben den erwünschten Effekten auch die CYP7A1-katalysierte Biosynthese von Gallensäuren sowie deren Transport, was die Cholesterolhomöostase beeinträchtigen könnte.[111] Aus diesem Grund würde die Entwicklung von FXR-Partialagonisten, die potentiell weniger Nebenwirkungen haben, helfen, das therapeutische Potenzial von FXR aufzuklären.

1.4 Peroxisomen Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR)

Die PPARs wurden bereits 1990 entdeckt und nach einer Molekülklasse benannt, welche die hepatischen Peroxisomen in Nagetieren dramatisch proliferieren lässt.[125] Nur zwei Jahre später entdeckte man neben diesem Subtyp, PPARα (NR1C1), noch zwei weitere in Xenopus-Oozyten, PPARβ (NR1C2) und PPARγ (NR1C3).[126] Das 1994 in der Maus identifizierte PPARδ entpuppte sich als Säugervariante von PPARβ, sodass insgesamt nur drei Subtypen existieren.[127] Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird PPARβ/δ im Folgenden als PPARδ bezeichnet. Wie LXR und FXR bilden auch alle PPARs permissive Heterodimere mit RXR.[128] Die PPAR-Subtypen unterscheiden sich stark in ihrem Expressionsmuster und ihrer physiologischen Funktion.[128]

PPARα wird in allen Geweben exprimiert, die katabolen Fettstoffwechsel betreiben, wie Leber, braunes Fettgewebe, Herz, Nieren und Darm.[128] Er ist der Hauptregulator der β-Oxidation der Fettsäuren und an der homöostatischen Kontrolle des Energiehaushalts beteiligt.[128]

Von PPARγ existieren zwei Isoformen, γ1 und γ2, welche sich am *N*-Terminus unterscheiden.[129] Während im Fettgewebe sowohl PPARγ1 als auch γ2 vorliegen, dominiert im Skelettmuskel PPARγ1.[130] Weiterhin ist PPARγ in Geweben zu finden, in denen die insulinstimulierte Glucoseaufnahme geschieht und nimmt eine Schlüsselrolle in der Lipid- und Glucosehomöostase ein.[129]

PPARδ ist ubiquitär exprimiert und reguliert hauptsächlich die Fettsäureoxidation im Skelettmuskel.[128]

1.4.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial

PPARs sind wichtige Mediatoren des Fettsäure- und Glucosestoffwechsels, wie die Entwicklung gleich zweier Arzneistoffklassen mit dieser Zielstruktur, die Fibrate und die Glitazone, verdeutlicht.[128] Nur PPARδ wird bislang nicht (gezielt) von einem Arzneistoff adressiert.[131] Obwohl alle drei Subtypen von PPAR an Entzündungsprozessen beteiligt sind, liegt der Fokus dieser Arbeit auf PPARγ und PPARδ.

Lipid- und Glucosemetabolismus

Im Gegensatz zu den Subtypen α und δ fördert **PPAR**γ nicht den Abbau von Fettsäuren, sondern die Lipogenese und die Speicherung von Lipiden im Fettgewebe (Abbildung 1.10).[132] PPARγ ist essentiell für die Differenzierung von Präadipozyten in Adipozyten im weißen und braunen Fettgewebe.[134,135] Ferner sind reife Adipozyten nicht in der Lage, ohne PPARγ zu überleben, was seine fundamentale Rolle im Fettgewebe verdeutlicht.[136] Die Aktivierung von PPARγ verursacht die Aufnahme von zirkulierenden Fettsäuren in Adipozyten.[132] Wichtige Zielgene, die hierbei kontrolliert werden, sind LPL, das Fettsäuretransportprotein (FATP, *engl.* fatty acid transport protein) 1 und die Fettsäuretranslokase (CD36, *engl.* cluster of differentiation 36).[137–139] Zusätzlich wird durch positive Regulation der PEPCK, welche ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese darstellt, der Export von Lipiden verhindert.[132,140] Ein weiteres Enzym, das von PPARγ in Adipozyten kontrolliert wird, ist das Fettsäuren-bindende Protein 4 (FABP4, *engl.* fatty acid binding protein 4).[141]
Die klinische Entwicklung der Thiazolidindione, synthetischer PPARγ-Agonisten (siehe Kapitel 1.4.2),

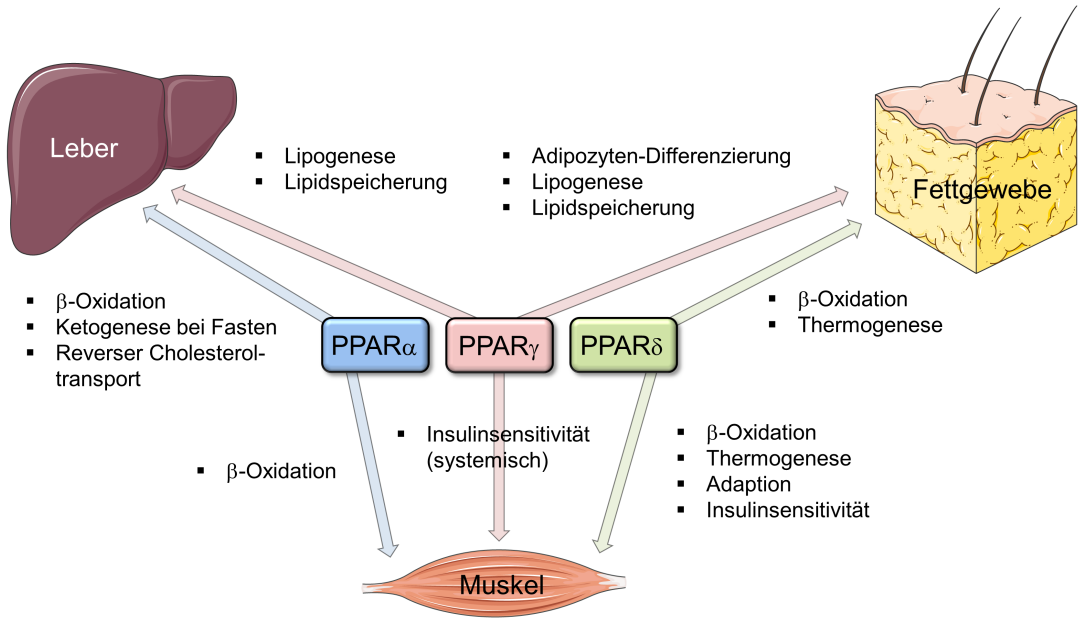


Abbildung 1.10: *Physiologische Rolle der PPARs in Leber, Fettgewebe und Muskeln. PPARα und PPARδ sind wichtige Regulatoren der β-Oxidation von Fettsäuren. Während PPARα vor allem in der Leber aktiv ist, ist der Hauptwirkort von PPARδ im Skelettmuskel. PPARγ ist für die Synthese und Speicherung von Lipiden im Fettgewebe verantwortlich und stellt gemeinsam mit PPARδ ein wichtiges Zielprotein zur Behandlung der Insulinresistenz dar. Adaptiert von [133].*

lieferte wichtige Erkenntnisse zur Beteiligung von PPARγ am Glucosestoffwechsel. Die Aktivierung von PPARγ steigert die Insulinsensitivität über mehrere Wege: Einerseits wird die Expression von Proteinen induziert, die in die Glucosehomöostase eingreifen, wie das c-Cbl-assoziierte Protein (CAP, *engl.* c-Cbl-associated protein) oder der Glucosetransporter Typ 4 (GLUT4).[142,143] GLUT4 stellt ein Transportprotein dar, das in Vesikeln lokalisiert ist und Glucose insulinvermittelt in die Zelle aufnimmt.[144] Andererseits steigert PPARγ die Plasmakonzentration von Adiponektin, einem Adipokin, das die Fettsäureoxidation in Leber und Muskel induziert.[145] Außerdem werden durch PPARγ-Agonisten zirkulierende Triglyceride reduziert, sodass die Insulinsensitivität effektiv verbessert wird.[132] Dabei handelt es sich nicht um einen fettgewebespezifischen, sondern systemischen Effekt.

PPARδ übernimmt eine ähnliche Rolle wie PPARα und steigert die β-Oxidation von Fettsäuren, allerdings über einen anderen Mechanismus.[146] In seinem Hauptexpressionsort, dem Skelettmuskel, aber auch im Fettgewebe treibt PPARδ die Fettverbrennung voran.[146,147] Dies geschieht über direkte Zielgene, die in den Fettsäuretransport involviert sind.[146] Dazu zählen das integrale Membrantransportprotein FATP1 und die Carnitin-Acyltransferase (CPT, *engl.* carnitine palmitoyltransferase) I, welche Fettsäuren über die mitochondriale Membran befördert.[146] Es werden aber auch Enzyme aktiviert, die Bestandteil der β-Oxidationskette sind, wie die langkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase (LCAD, *engl.* long chain acyl-CoA dehydrogenase).[146] Zusätzlich erhöht eine PPARδ-Aktivierung über ABCA1 den reversen Cholesteroltransport, infolgedessen die Plasmaspiegel von HDL steigen und die von LDL sinken.[148,149] Insgesamt verschiebt PPARδ die Energiegewinnung zur β-Oxidation und inhibiert die Glucoseverbrennung und Gluconeogenese durch Induktion der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) 4.[146]
Darüber hinaus stellen die Thermogenine (UCP, *engl.* uncoupling protein) weitere Zielgene von PPARδ dar, die im braunen Fettgewebe (UCP1,2) und Skelettmuskel (UCP2,3) die Thermogenese fördern.[146,150] In einer *in vivo* Studie zeigten PPARδ-Agonisten zudem eine direkte Interaktion mit dem thermogenen Faktor PPARγ Coaktivator-1α (PGC-1α, *engl.* PPARγ coactivator-1α).[146,147,150] Dieser ist ein Regulator der mitochondrialen Biogenese, dessen Induktion Ausdauertraining simuliert. Folglich konnte gezeigt werden, dass Mäuse durch Behandlung mit einem PPARδ-Agonisten deutlich weiter laufen konnten als ihre unbehandelten Wurfgeschwister.[151,152] Dabei wurde auch festgestellt, dass PPARδ den Anteil an S-Fasern im Muskel erhöht, die langsamer ermüden.[152] PPARδ spielt somit eine wichtige Rolle in der Adaption von Muskeln an äußere Umstände.[153] Die Summe all dieser Effekte PPARδs auf den Lipid- und Glucosehaushalt führte zu gesteigerter Insulinsensitivität in Mäusen und reduzierte die Gewichtszunahme von Mäusen, die mit fettreicher Nahrung gefüttert wurden.[146,149]

Entzündungsprozesse

Trotz seiner adipogenen Funktion weist **PPAR**γ zahlreiche antientzündliche Effekte auf. Diese sind nicht nur auf die Reduktion der Triglyceridplasmaspiegel und die Steigerung der Insulinsensitivität zurückzuführen, sondern auch auf die Inhibition inflammatorischer Proteine wie iNOS und TNFα, sowie der Zytokine IL-1 und IL-6.[154–156] Bislang wurde noch kein Hintergrund auf molekularer Ebene gefunden, der diesen Befund erklärt.[157] PPARγ-Agonisten förderten die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen und erhöhten die Aufnahme von oxidiertem LDL in diese Zellen durch die Regulation von CD36.[158] Zudem wurde die Produktion des proinflammatorischen MMP9 unterdrückt.[159] In den

Adipozyten von Ratten hemmten entzündungsfördernde Zytokine die Expression von PPARγ, welche durch die Behandlung mit Thiazolidindionen wieder anstieg.[160] Die Kombination von hypolipidämischen und antientzündlichen Effekten legt die Anwendung von PPARγ-Agonisten bei Atherosklerose nahe. Zumindest in Diabetes-Tiermodellen wurde die antiatherogene Wirkung bestätigt.[161]

Als Sensor für sterbende Zellen instrumentiert **PPAR**δ die phagozytotische Antwort auf die Konfrontation von Makrophagen mit apoptotischen Zellen.[162] Die Deletion des PPARδ-Gens führte zur eingeschränkten Beseitigung apoptotischer Zellen und reduzierte die Produktion antientzündlicher Zytokine.[162] Dadurch wurden Autoantikörper verstärkt gebildet und prädisponierten PPARδ$^{-/-}$-Mäuse für Autoimmunerkrankungen der Nieren.[162] PPARδ scheint maßgeblich am zytokinvermittelten Übergang von Monozyten in antientzündliche M2-Makrophagen beteiligt zu sein.[163] In kultivierten murinen Makrophagen senkten PPARδ-Agonisten die Spiegel von Entzündungsmediatoren wie MCP1, MCP3 und IL-1β, was auf eine atheroprotektive Funktion von PPARδ hindeutet.[164] Durch seine physiologische Rolle in der β-Oxidation und als Lipidsenker ist der δ-Subtyp insbesondere bei der Auflösung von entzündlichen Prozessen von Bedeutung, die in Zusammenhang mit erhöhten Lipidspiegeln stehen. Beispielsweise linderten PPARδ-Agonisten in einer präklinischen Studie eine hepatische Steatose durch die Förderung von Fettsäureoxidation, der Reduktion der Lipogenese und der Verbesserung der Insulinsensitivität.[165]

Therapeutische Rolle

Das therapeutische Potenzial von **PPAR**γ besteht vor allem in der insulinsensitisierenden Wirkung von PPARγ-Agonisten.[128] Der Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) ist eng mit dem metabolischen Syndrom verknüpft, welches den Komplex von Krankheiten beschreibt, die sich aus der mangelnden Bewegung und unausgeglichenen Ernährung vor allem in der westlichen Welt ergeben. Dazu zählen neben T2DM unter anderem auch kardiovaskuläre Erkrankungen, Adipositas und Hypertonie. Da die PPARγ-Aktivierung außer der insulinsensitisierenden Wirkung auch triglyceridsenkende Effekte zeigt, scheint er eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung von oralen Antidiabetika zu sein und führte zur klinischen Zulassung der Arzneistoffklasse der Glitazone (Kapitel 1.4.2).[132] Deren Einnahme verursacht allerdings eine moderate Gewichtszunahme, welche vermutlich der gesteigerten Adipogenese, der Flüssigkeitsretention und der Erweiterung des extrazellulären Volumens geschuldet ist.[132] Weitere Nebenwirkungen wie Osteoporose und Herzinsuffizienz haben dazu geführt, dass die Glitazone heute kaum noch in der Therapie eingesetzt werden.[166] Aus diesem Grund rücken derzeit selektive PPARγ-Modulatoren (sPPARγM) in den Fokus, die adipogene Zielgene aussparen und Nebenwirkungen minimieren könnten.[167]
Ein weiterer Ansatz ist die Kombination dualer PPARα/γ-Liganden, die Glitazare genannt werden. Mit Ausnahme von Saroglitazar, das in Indien eine Zulassung für diabetische Dyslipidämie erhielt, wurde jedoch deren Entwicklung aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen abgebrochen.[168]

Das therapeutische Potenzial von **PPAR**δ wurde noch nicht ausgeschöpft. Seine antiatherogenen, insulinsensitivitätssteigernden und vor allem hypolipidämischen Eigenschaften machen es zu einem attraktiven Zielprotein für verschiedene Erkrankungen im Rahmen des metabolischen Syndroms.[169,170] Aufgrund der Bildung von Adenokarzinomen in Mäusen wurde die klinische Entwicklung von GW501516 (**24a**, Kapitel 1.4.2), dem bisher vielversprechendsten selektiven PPARδ-Agonisten, abgebrochen.[171] Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die kanzerogenen Eigenschaften ein

substanz- oder PPARδ-spezifischer Effekt sind. Es gibt nur sehr wenige Studien bislang, welche die Sicherheit von PPARδ-Agonisten am Menschen untersucht haben. Eine kürzlich veröffentliche Phase II-Studie zum selektiven Agonisten Seladelpar (**25**) bei PBC konnte anticholestatische Effekte beweisen, wurde jedoch abgebrochen, weil drei Teilnehmer einen Anstieg in den Alanin-Aminotransferase-Werten verzeichneten.[172] Die aktuelle Studienlage legt daher nahe, dass die Kanzerogenität bisheriger Wirkstoffkandidaten substanzspezifische Ursachen hatte.
Neben selektiven PPARδ-Agonisten wird aktuell mit Elafibranor (**26**) auch ein dualer PPARα/δ-Agonist in klinischen Studien untersucht. Elafibranor (**26**) zeigte in einer randomisierten, doppelblinden Studie substantielle Verbesserungen der NASH-Histologie einschließlich der Auflösung der Steatohepatitis und einem verbesserten kardiovaskulärem Risikoprofil.[131] Da der duale Agonist gut vertragen wurde, findet aktuell eine Phase III-Studie bei NASH mit Fibrose statt. Elafibranor (**26**) wäre der erste zugelassene Wirkstoff, der gezielt für PPARδ entwickelt wurde.

1.4.2 Liganden des PPAR

Die **natürlichen Liganden** der PPARs bestehen aus einer Vielzahl an Fettsäuren sowie deren Metaboliten (inklusive Eicosanoide) und verdeutlichen ihre Funktion als Lipidsensoren.[173–175] Dabei kann man nur bedingt von endogenen Liganden reden, da Fettsäuren auch exogen über die Diät zugeführt werden. Viele der mehrfach ungesättigten Fettsäuren aktivieren alle drei Subtypen wie die Linolsäure (**27**) und die Arachidonsäure (**28**), aber es gibt auch einige Fettsäuren und Eicosanoide, die eine Präferenz für einen Subtypen aufweisen (Abbildung 1.11).[173–175] Beispielsweise ist das 15-Desoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 (**29**) für PPARγ und die (*S*)-13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure (**30**) für PPARδ selektiv.[176,177]

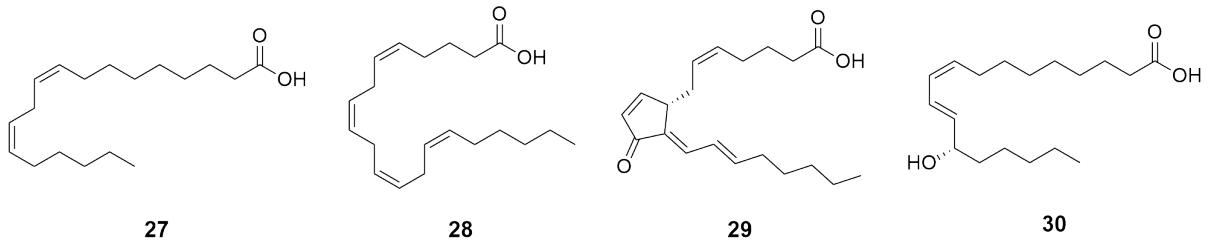


Abbildung 1.11: *Natürliche PPARγ- und PPARδ-Agonisten sind Fettsäuren und Eicosanoide. Beispiel für pan-PPAR-Agonisten sind Linolsäure (**27**) und Arachidonsäure (**28**), während das 15-Desoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 (**29**) für PPARγ und die (S)-13-Hydroxy-9,11-octadecadiensäure (**30**) für PPARδ selektiv sind.*

Zu den **synthetischen PPARγ-Liganden** zählt die Arzneistoffklasse der Glitazone, deren prominenteste Vertreter das Pioglitazon (**31**) und Rosiglitazon (**32**) sind (Abbildung 1.12).[128] Chemisch betrachtet verfügen sie über eine Thiazolidindiongruppe und wurden in racemischer Form als orale Antidiabetika verwendet.[178] Heutzutage werden die PPARγ-Agonisten aber kaum noch eingesetzt aufgrund schwerer Nebenwirkungen, die in Kapitel 1.4.1 beschrieben sind. Deshalb werden derzeit unterschiedliche Ansätze verfolgt, um die adipogenen Effekte der PPARγ-Aktivierung zu unterdrücken, aber die therapeutisch wertvollen wie die Senkung von Triglyceridspiegel und Verbesserung der Insulinsensitivität zu nutzen. Die Entwicklung von Partialagonisten wie Arhalofenat (**33**) ist eine Methode, um die Lipidsynthese zu minimieren.[179] An diesem Beispiel lässt sich allerdings auch zeigen, dass der gewünschte Effekt, die Senkung der Plasmaglucosespiegel, auch reduziert wird.

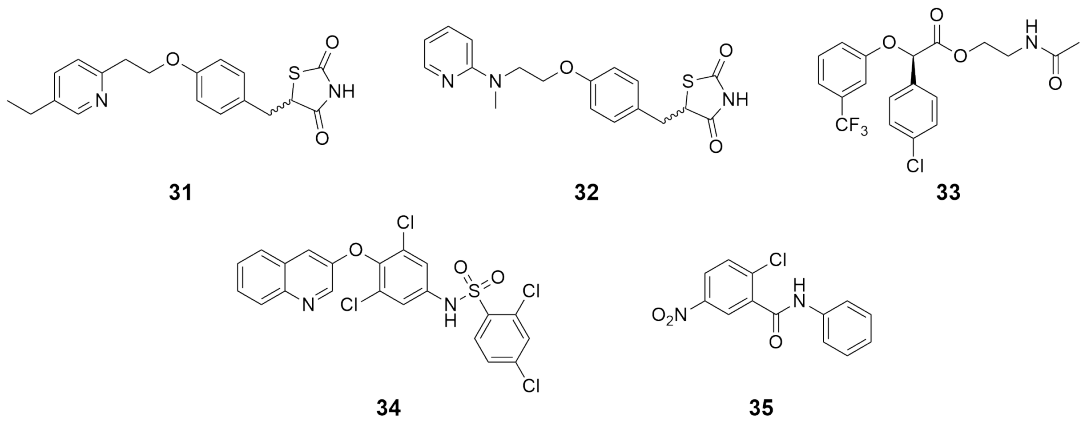


Abbildung 1.12: *Synthetische PPARγ-Modulatoren. Thiazolidindione wie Pioglitazon (**31**) und Rosiglitazon (**32**) sind überholte orale Antidiabetika, die von neueren Partialagonisten, zu denen Arhalofenat (**33**) und der sPPARγM INT131 (**34**) gehören, ersetzt werden könnten. Mit GW9662 (**35**) ist ein kovalenter Antagonist verfügbar.*

So wurde eine klinische Studie mit Arhalofenat bei T2DM abgebrochen, da als primärer Endpunkt gesetzte Werte des Glycohämoglobins HbA1c nicht erreicht wurden.[179] Arhalofenat (**33**) ist ein Prodrug, welches im Körper schnell zum aktiven Metaboliten durch Hydrolyse des Esters umgesetzt wird.[179] Da man im Verlauf der Untersuchungen herausfand, dass **33** auch ein Inhibitor des Harnsäuretransporters (URAT, *engl.* uric acid transporter) 1 ist, wird es derzeit in klinischen Studien zur Behandlung von Gichtanfällen untersucht, wo es Wirksamkeit belegt und sehr gut vertragen wird.[180] Dabei scheinen die antientzündlichen Effekte eines PPARγ-Partialagonimus auch eine Rolle zu spielen.
sPPARγM bilden die zweite Methode zur Suppression lipogener Effekte.[181] Dabei steht die Entwicklung partieller Agonisten im Fokus, die im Gegensatz zu Vollagonisten Coaktivatoren unterschiedlich potent rekrutieren und dadurch andere Genprofile ansprechen könnten.[181] INT131 (**34**) ist ein Beispiel eines sPPARγMs, welcher die Expression adipogener Gene deutlich weniger steigert als diejenigen, welche die Glucosehomöostase betreffen.[182] Strukturell gesehen lässt **34** die Thiazolidindion-Kopfgruppe missen und verfügt stattdessen über ein charakteristisches Sulfonamid. Erste klinische Studien zeigten positive Ergebnisse in Bezug auf Wirksamkeit und Unbedenklichkeit.[181]
PPARγ-Antagonisten gibt es nur sehr wenige, da der therapeutische Nutzen fragwürdig ist. Als *tool compound* steht GW9662 (**35**) zur Verfügung, das kovalent an PPARγ bindet.[183] Die freie Thiolgruppe des Cysteins 285 in der Ligandbindetasche reagiert mit dem 2-Chlor-5-nitrobenzamid **35**, sodass es die Bindetasche für weitere Liganden physikalisch blockiert.[183]

Synthetische PPARδ-Liganden werden von Phenoxyessigsäurederivaten dominiert (Abbildung 1.13). Aus einer Serie von PPARδ-selektiven Agonisten gingen GW501516 (**24a**) und GW0742 (**24b**) hervor.[184] Beide Verbindungen weisen äußerst potente EC_{50}-Werte im einstellig nanomolaren Bereich auf und unterscheiden sich nur durch einen Fluorsubstituenten. Für die klinische Weiterentwicklung wurde GW501516 ausgewählt, scheiterte jedoch letztendlich trotz vielversprechender Ergebnisse für die Behandlung von Hyperlipidämien an seiner tumorigenen Aktivität in Mäusen.[171,181] GW501516 (**24a**) ermöglichte gemeinsam mit L-165,041 (**36**), das der GW-Serie strukturell sehr nahe kommt, die Aufklärung der physiologischen Rolle PPARδs.[185,186] Allerdings ist die Selektivität von **36** unter den PPAR-Subtypen weniger stark ausgeprägt, sodass es nicht in klinischen Versuchen getestet wurde und hauptsächlich als Referenz für *in vitro* Assays genutzt wird. Seladelpar (**25**) ist ein enantiomeren-

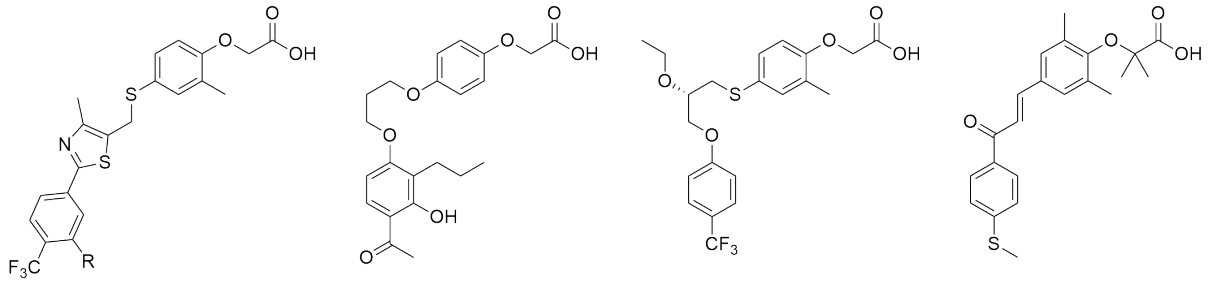


Abbildung 1.13: *GW501516 (**24a**), GW0742 (**24b**), L-165,041 (**36**) und Seladelpar (**25**) sind synthetisch hergestellte selektive PPARδ-Modulatoren. Elafibranor (**26**) ist ein dualer PPARα/δ-Agonist, der sich in fortgeschrittenen klinischen Studien zu NASH befindet.*

reiner, selektiver PPARδ-Agonist, der auf dem gleichen 2-(4-Mercapto-2-methylphenoxy)essigsäure-Grundgerüst wie GW501516 (**24a**) aufgebaut ist und wird in klinischen Versuchen zu unterschiedlichen Fettstoffwechselstörungen wie PBC, NASH, Hyperlipidämie und der homozygoten familiären Hypercholesterinämie getestet.[172,187] Der PPARδ-Ligand mit den zurzeit größten Erfolgsaussichten auf Zulassung ist Elafibranor (**26**), ein dualer PPARα/δ-Agonist.[131] Im Unterschied zu den selektiven Agonisten basiert **26** auf 2-Phenoxy-2-methylpropansäure als acide Kopfgruppe. Mit der Komplettierung der Phase III-Studie zu NASH mit Fibrose ist Ende 2021 zu rechnen.[131] Eine Zulassung wäre ein bedeutsamer Durchbruch für die Indikation NASH, für die es keine adäquate Medikation gibt, weshalb die FDA Elafibranor (**26**) den *fast-track* Status verlieh.

1.5 Retinoid X Rezeptoren (RXR)

Im Jahr 1990 wurde RXR (NR2B1) entdeckt und bekam seinen Namen durch Vitamin A-Metaboliten (Retinoide), da hohe Konzentrationen von all-*trans*-Retinsäure diesen Rezeptor aktivierten.[25,188] Kurz darauf wurden neben RXRα zwei weitere Subtypen (RXRβ oder NR2B2 und RXRγ oder NR2B3) identifiziert.[189] Von jedem Subtyp treten überwiegend zwei Isoformen auf, die sich am *N*-terminalen Ende unterscheiden.[190–193] RXRα ist in zahlreichen Organen und Geweben vertreten wie Leber, Lunge, Muskel, Niere, Epidermis und Dünndarm, wobei die Isoform RXRα2 selektiv in den Testes zu finden ist.[25,189,194] Während RXRβ ubiquitär exprimiert wird, beschränkt sich die Expression von RXRγ1 auf Gehirn und Muskeln und die von RXRγ2 auf Herz- sowie Skelettmuskel.[25] Obwohl RXR auch von bestimmten Retinsäurederivaten wie der 9-*cis*-Retinsäure (**37**) aktiviert wird, unterscheidet er sich von RAR (NR1B1-3), sodass RXR und RAR gar in unterschiedlichen phylogenetischen Familien eingeordnet werden. RXR ist einzigartig in seiner Funktion unter den nukleären Rezeptoren. Er ist der Heterodimerpartner, ohne den viele Mitglieder der nukleären Rezeptoren ihre natürlichen Aufgaben nicht ausüben können.[25] Zu diesen Rezeptoren gehört der Hauptteil der NR1-Familie mit TR, RAR, PPAR, LXR, FXR, dem Vitamin D Rezeptor (VDR, NR1I1), PXR und dem konstitutiven Androstanrezeptor (CAR, NR1I3, *engl.* constitutive androstane receptor).[25] Die Erkennung des Heterodimers erfolgt dabei durch die Bindung an unterschiedliche RE-Sequenzen auf der DNA. Mit NGFIB und NURR1 sind auch Heterodimerpartner aus der NR4-Familie bekannt.[195,196] Darüber hinaus bildet

RXR, das selbst zur NR2-Familie gehört, auch Homodimere, die einen weiteren, unabhängigen RXR-Signalweg nahelegen.[197,198] Dieser ist nur spärlich erforscht und bedarf weiterer Aufklärung.

1.5.1 Physiologische Rolle und therapeutisches Potenzial

Als universeller Heterodimerpartner ist RXR an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt (Abbildung 1.14). Insbesondere die Existenz permissiver Heterodimere, deren Genexpression bereits durch einen RXR-Liganden alleine in Gang gesetzt werden kann, gestaltet die Aufklärung des Funktionsprinzips von RXR-Homodimeren sehr schwer, da keine klaren Grenzen zwischen den Signalwegen gezogen sind. Interessanterweise ist die Permissivität eines Heterodimers eng mit der physiologischen Funktion verknüpft.[2] Während permissive Heterodimere (Bsp. PPAR, LXR, FXR) durch Lipide mit hoher struktureller Vielfalt und niedriger Potenz gebunden werden, agieren nichtpermissive Heterodimere (Bsp. TR) als Hormonrezeptoren und binden endokrine Liganden, die unter strenger Regulation stehen, mit hoher Potenz.[2,25] Das Phänomen, dass RXR-Liganden alleine die transkriptionelle Aktivität der Hormonrezeptoren nicht regulieren können, wird *Subordination* bzw. *Silencing* genannt.[2] Neben Heterodimeren kann RXR zusätzlich funktionale Homodimere ausbilden.[199,200] RXR-Homodimere sind dazu in der Lage, unabhängig von der Anwesenheit PPARs an dessen RE zu binden und bewirken die ligandengesteuerte Transkription von PPAR-Zielgenen.[26] Diese Effekte wurden auch *in vivo* an PPARα Knockout-Mäusen bestätigt.[26] Darüber hinaus ist nur sehr wenig über die Wirkung dieser RXR-Homodimere bekannt.

RXR ist ein wichtiger Regulator des Stoffwechsels, der Entwicklung, der Zellproliferation und -differenzierung sowie der Erkennung und Verstoffwechslung von Xenobiotika (Abbildung 1.14).[25,27] All diese Funktionen beruhen auf der transkriptionellen Aktivität von RXR-Heterodimeren. In den vorherigen Kapiteln wurde bereits die Rolle der Fettsäurerezeptoren PPAR, LXR und FXR beschrieben, die sehr wichtige RXR-Heterodimere darstellen, da allesamt permissiv sind und der metabolischen

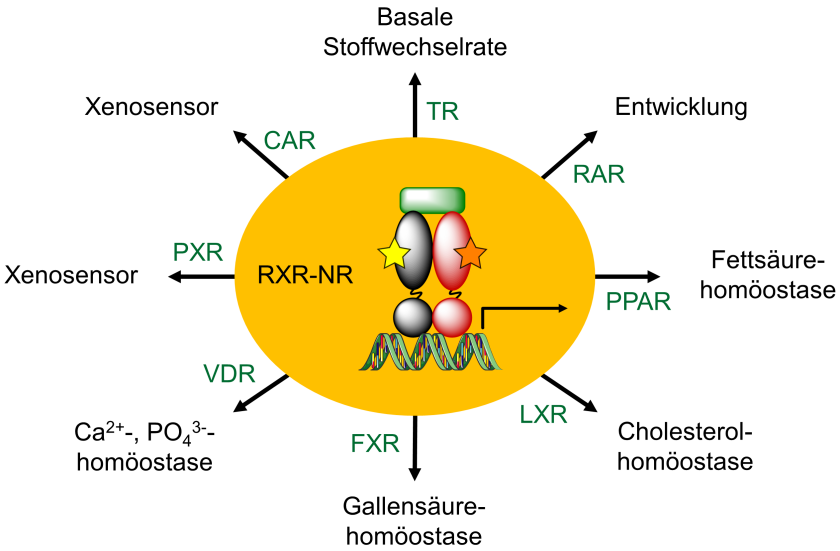


Abbildung 1.14: *Als universeller Heterodimerpartner vieler nukleärer Rezeptoren (NR) ist RXR ein Regulator zahlreicher physiologischer Vorgänge. Die wichtigsten Funktionen und die daran beteiligten Heterodimere sind aufgeführt. Adaptiert von [2].*

Homöostase dienen.
RXR-RAR ist ein *konditionelles* Heterodimer, das sich zwischen permissiven und nichtpermissiven Dimeren einordnet. Ein RAR-Ligand alleine reicht zwar zur Genexpression, doch führt die gleichzeitige Anwesenheit eines RXR-Liganden zur synergistischen Aktivierung.[201] Im Gegensatz zu permissiven Heterodimeren ist ein RXR-Agonist nicht ausreichend, um die Transkription zu veranlassen. Der Retinsäurerezeptor ist ein wichtiger Regulator der embryonalen Morphogenese und Organogenese, des Zellzyklusarrests, der Differenzierung und Apoptose.[202] Die Verwobenheit der RAR- und RXR-Signalwege ist an RXR Knockout-Tieren zu erkennen, welche die zentrale Rolle des RXR aufzeigen.[203–205] RXR$\alpha^{-/-}$-Mäuse überlebten das embryonale Stadium nicht und zeigten myokardiale sowie okulare Fehlbildungen, die auch bei Vitamin A-Mangel auftreten.[203] Da Vitamin A-Derivate die natürlichen Liganden des RAR sind, liegt dessen Beteiligung nahe.[202] In circa 50% der Fälle war ein RXRβ Knockout letal und männliche Mäuse waren steril.[204] RXRγ Null-Mutanten hingegen wiesen einen normalen Phänotyp auf und waren fruchtbar.[205] Nichtsdestotrotz waren die Plasmaspiegel des Thyroxins und Thyreotropins sowie die Stoffwechselrate erhöht, was auf die Interaktion von RXR mit dem Schilddrüsenhormonrezeptor TR hinweist.[206]
Die Xenobiotikasensoren PXR und CAR sind weitere nukleäre Rezeptoren, die RXR-Heterodimere bilden.[207] Mit ihren flexiblen Ligandbindetaschen erkennen sie eine Vielzahl an toxischen Nebenprodukten des endogenen Stoffwechsels wie auch exogene Chemikalien und fördern deren Eliminierung durch Induktion von Cytochrom P450 (CYP)-Enzymen. Die Mitglieder der CYP-Familie sind Bestandteil des Phase I-Metabolismus, erhöhen die Hydrophilie ihrer Substrate durch Oxidation und ermöglichen dadurch in vielen Fällen den Phase II-Metabolismus.[207] Ferner vermittelt RXR seine Effekte über VDR, welcher die Calcium- und Phosphathomöostase reguliert und damit die Knochenmineralisation stimuliert.[208]

Entzündungsprozesse

RXR spielt eine zentrale Rolle in Entzündungsvorgängen, die durch seine Heterodimerpartner reguliert werden.[209] Insbesondere für die Behandlung von Alzheimer und MS stellt RXR eine interessante Zielstruktur dar. Wie auch LXR-Agonisten (Kapitel 1.2.1) vermag der synthetische RXR-Agonist Bexaroten (**38**) durch Induktion der Cholesteroltransporter APOE und ABCA1 HDL-Spiegel anzuheben.[6] In einem Alzheimer-Tiermodell konnte Bexaroten (**38**) die Auflösung von β-Amyloidfibrillen begünstigen.[6] Der genaue Mechanismus wird kontrovers diskutiert und nicht alle Ergebnisse dieser Studien konnten reproduziert werden.[210–214] Dennoch präsentiert die Aktivierung von RXR eine neue therapeutische Strategie bei Alzheimer.
MS ist eine weitere neurodegenerative Erkrankung, bei der autoimmune Prozesse die Myelinschutzhülle der Nervenfasern angreifen. In Ratten konnte gezeigt werden, dass RXRγ ein physiologisches Verletzungssignal im zentralen Nervensystem (ZNS) vermittelt und nach fokaler Demyelinisierung verstärkt im betroffenen Gewebe exprimiert wird.[7] RXRγ Knockout-Tiere konnten Oligodendrozyten-Vorläuferzellen nur ineffizient differenzieren, sodass die Remyelinisierung gehemmt wurde.[7] Zudem führte die Aktivierung von RXR durch 9-*cis*-Retinsäure (**37**) zur Stimulation der Differenzierung und verbesserte die Remyelinisierung des ZNS.[7] Auch hier ist noch kein detaillierter Mechanismus bekannt. Die Autoren der Publikation vermuten eine Beteiligung von RXR-Heterodimeren, da im Transkriptom des *pedunculus cerebellaris inferior* die nukleären Rezeptoren LXRα, *chicken ovalbumin*

upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI, NR2F1) und NURR1 nach Läsion unterschiedlich exprimiert wurden.[7]
Weitere Studien zeigen antientzündliche Effekte von RXR und seinen Dimerpartnern PPAR und LXR in murinen Mikroglia nach LPS-induzierter Entzündung.[215–217] Die Aktivierung von RXR alleine genügte, um die Produktion von Stickstoffmonoxid und proentzündlicher Zytokine wie IL-1β, IL-6 und TNFα, zu senken.[215–217] Eine in humanen Endothelzellen durch hohe Glucosespiegel induzierte Entzündung konnte durch RXR-Agonisten unterdrückt werden.[218] Die Effekte ließen sich auf die RXR-vermittelte Inhibition von NF-κB und die reduzierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zurückführen.[218]

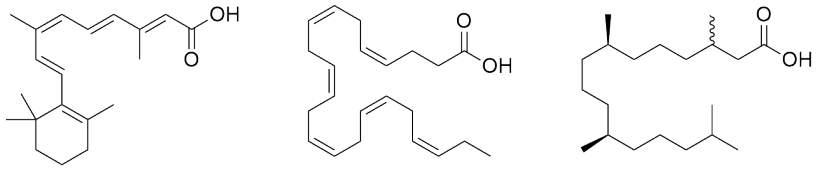
Therapeutische Rolle

RXRs haben eine sehr breite therapeutische Rolle, die sich durch ihre unter den nukleären Rezeptoren einzigartige Rolle als Heterodimerpartner ergibt.[209] In Mausmodellen von nicht insulinäbhängigem Diabetes mellitus und Adipositas zeigten RXR-Agonisten ähnliche Effekte wie Thiazolidindione, stimulierten die Empfindlichkeit für Insulin und senkten Plasmaspiegel von Glucose, Triglyceriden und Insulin.[130]
In Ratten, die mit einer cholesterolreichen, atherogenen Diät gefüttert wurden, senkten RXR-Agonisten den Gesamtcholesterolspiegel durch Induktion der ABCA1-Expression.[219,220] Ferner förderte die Aktivierung von RXR in APOE Knockout-Mäusen den reversen Cholesteroltransport aus Makrophagen ebenfalls durch gesteigerte Expression von ABCA1.[221] Dieses Tiermodell von Atherosklerose zeigt das therapeutische Potenzial von RXR-Agonisten auf.
Weitere Erkrankungen, an denen Entzündungsvorgänge beteiligt sind und für die RXR als Zielstruktur fungieren könnte, sind allergisches Asthma und CED.[222,223] Im murinen Asthma-Tiermodell konnten RXR-Agonisten die Spiegel der proinflammatorischen Mediatoren TNFα, IL-5, IL-13 und NO sowie die Expression von NF-κB senken.[222] Die orale Verabreichung eines RXR-Partialagonisten linderte die Symptome einer Dextransulfat-induzierten Colitis, was der negativen Regulation proentzündlicher Zytokine zugeschrieben werden konnte.[223]
Mit der 9-*cis*-Retinsäure (Alitretinoin, **37**) und Bexaroten (Handelsname Targretin®, **38**) sind gleich zwei RXR-Agonisten zur Pharmakotherapie zugelassen.[224,225] Alitretinoin (**37**) wird verwendet zur topischen Behandlung von Kaposi-Sarkom sowie chronischem Handekzem und Bexaroten (**38**) hat die Indikation kutanes T-Zell-Lymphom. Der Wirkmechanismus dieser Substanzen ist noch nicht aufgeklärt worden.[25] Derzeit wird untersucht, ob RXR-Agonisten auch für andere Krebsarten in Betracht gezogen werden können.[226,227] Allerdings stehen sowohl **37** als auch **38** nur als Zweitlinientherapie zur Verfügung. Grund hierfür sind zahlreiche Nebenwirkungen, die bei RXR-Vollagonisten auftreten, wie Hypertriglyceridämie und Hypothyreosen.[226,228–231] Vereinzelt sind auch eine Hepatomegalie und eine Lymphopenie beobachtet worden.[232,233]
Da Vollagonisten das komplette pharmakologische Profil von permissiven RXR-Heterodimeren ansprechen, tendieren neuere Projekte zur Entwicklung von Partialagonisten, welche die Nebenwirkungen minimieren.[27] Erste Studien lieferten vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf orale Antidiabetika, wurden allerdings noch nicht umfänglich im klinischen Umfeld getestet.[234,235] Einen weiteren Ansatz stellen heterodimerselektive RXR-Liganden dar, die entweder für die Zielgene von RXR/PPAR oder RXR/LXR spezifisch und potentielle Wirkstoffkandidaten zur Behandlung von T2DM bzw. Dyslipidä-

mien sind.[219,236]
Der klinischen Entwicklung von RXR-Agonisten zur Behandlung neuroinflammatorischer Erkrankungen wie Alzheimer und MS steht die ubiquitäre Expression von RXR im Wege.[6,7] RXRγ-selektive Wirkstoffe könnten dieses Problem beheben, da dieser Subtyp nur in Gehirn und Muskeln exprimiert wird.[237] Bislang erwies sich die Subtypselektivität als große Hürde, weil die Ligandbindetaschen aller drei RXR-Subtpyen aus den nahezu identischen Aminosäuren aufgebaut sind.[27,209] Die Synthese von zumindest subtyppräferentiellen RXR-Agonisten und eines RXRβ-selektiven Liganden (siehe Kapitel 1.5.2) macht Hoffnung, auch wenn noch keine RXRγ-Präferenz gezeigt werden konnte.[238–240]

1.5.2 Liganden des RXR

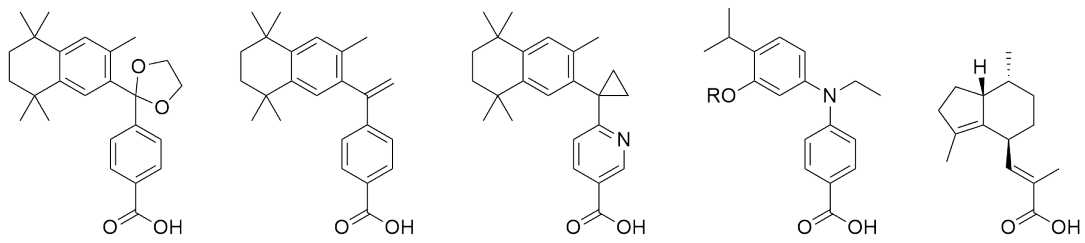
Die Betrachtung der 9-*cis*-Retinsäure (**37**) als *bona fide* **endogener RXR-Agonist** wird kontrovers diskutiert (Abbildung 1.15).[241] Das Diasteromer ist auch der aktive Metabolit der all-*trans*-Retinsäure und dadurch Namensgeber des nukleären Rezeptors, auch wenn physiologische Konzentrationen nicht ausreichen, um RXR zu aktivieren. Weiterhin bindet RXR natürliche Fettsäuren, die eine flexible räumliche Anordnung ermöglichen, promiskuitiv und mit schwacher Potenz.[27] Ausgewählte Vertreter wie die Docosahexaensäure (**39**) und das Terpenoid Phytansäure (**40**) bestätigen die Involvierung von RXR in der Lipidhomöostase und als intrazellulärer Sensor des metabolischen Status.[242,243]



37 **39** **40**

Abbildung 1.15: *Natürliche RXR-Agonisten sind die 9-cis-Retinsäure (Alitretinoin, **37**) und strukturell flexible Fettsäuren wie die Docosahexaensäure (**39**) und das Terpenoid Phytansäure (**40**).*

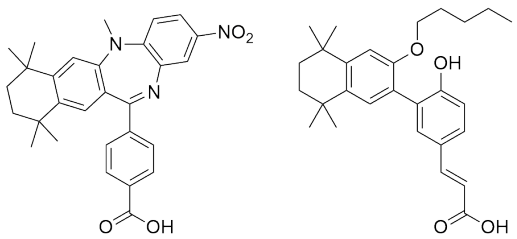
Potente **synthetische RXR-Agonisten** lehnen sich an die Struktur von **37** an, das sich konformationell gut an die L-förmige Ligandbindetasche RXRs anpassen kann, und sind deutlich rigider als natürliche Liganden. Selektive RXR-Liganden, die auch als Rexinoide bezeichnet werden, weisen eine sehr geringe strukturelle Varianz auf, wie an SR11237 (**41**), Bexaroten (**38**) und LG100268 (**42**) ersichtlich (Abbildung 1.16). SR11237 (**41**) war einer der ersten RXR-selektiven Agonisten, die keine Aktivität zu RAR verzeichneten.[244] Weitere Struktur-Wirkungsbeziehungs (SAR)-Untersuchungen



41 **38** **42** **43a** R = *i*Pr **43b** R = *i*Bu **44**

Abbildung 1.16: *Zu den synthetischen RXR-Agonisten gehören SR11237 (**41**), Bexaroten (**38**), LG100268 (**42**), NEt-3IP (**43a**), sowie NEt-3IB (**43b**). Der Naturstoff Valerensäure (**44**) ist der erste selektive RXRβ-Agonist.*

führten zu Bexaroten (**38**), das in der Linker-Region über einen Methylensubstituenten anstatt eines 1,3-Dioxolans verfügt.[245] Neben der Zulassung bei der Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms wurde **38** auch für die Indikation Alzheimer untersucht, scheiterte aber aufgrund mangelnder Wirksamkeit und kardiovaskulärer Risiken.[246] Der Ersatz der Benzoesäure durch die etwas hydrophilere Nikotinsäure und das Einführen eines Cyclopropylrests in der Linkergruppe lieferte LG100268 (**42**), das eine verbesserte Selektivität über RAR mit sich bringt.[247] Zudem konnte der EC_{50}-Wert des pan-RXR-Agonisten im Vergleich zu Bexaroten (**38**) vom zweistelligen in den einstellig nanomolaren Bereich gesenkt werden (**38**: 20-28 nM, **42**: 3-4 nM).[247] Die Cokristallisation von **41** in RXRα lieferte den Verdacht, dass gezielte Interaktionen des Liganden mit der zweiten Schicht von Aminosäuren um den Liganden herum zur Subtypselektivität beitragen könnten.[13] Durch die Einführung von polareren Alkoxyresten gelang mit den Verbindungen NEt-3IP (**43a**) und NEt-3IB (**43b**) ein subtyppräferentielles Profil.[239] Während das *iso*-Propylderivat NEt-3IP (**43a**) auf RXRα und RXRβ um den Faktor 10 potenter ist als auf RXRγ, verschiebt der größere *iso*-Butylrest in **43b** das Selektivitätsprofil zugunsten einer RXRα/γ-Präferenz.[239] Kürzlich wurde der Naturstoff Valerensäure (**44**) als RXRβ-Agonist charakterisiert ($EC_{50} = 5{,}2$ µM, Luciferase-Reportergenassay, HEK293T Zellen), der mindestens fünffach selektiv für RXRβ gegenüber RXRα und RXRγ war.[240] Auch hinsichtlich der Maximalaktivierung bevorzugte Valerensäure (**44**) RXRβ (69% maximale Aktivierung relativ zu 1 µM **38**), während die Aktivierungseffizienz auf RXRα und RXRγ unter 10% lag, sodass **44** als erster selektiver RXRβ-Agonist angesehen werden kann.[240] RXR-subtypselektive Liganden wie **44** können als pharmakologische Werkzeuge verwendet werden, um die Subtypen besser zu untersuchen.



45 46

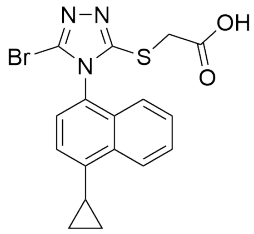
Abbildung 1.17: *RXR-Antagonisten HX531 (**45**) und UVI3003 (**46**)*

RXR-**Antagonisten** lassen sich durch die Einführung großer bzw. langer Seitenketten erhalten.[248] Partialantagonist HX531 (**45**) enstand durch Nitrosubstitution des polycyclischen Grundgerüsts eines RXR-Agonisten.[249] Eine molekulare Modellierung zeigte, dass die Nitrogruppe eine sterische Behinderung der Aminosäuren erzeugt, welche die agonistische Konformation der Helix 12 stabilisieren.[250] In UVI3003 (**46**) bewirkte eine sterisch anspruchsvolle Pentoxygruppe ähnliche Effekte. Eine mechanistische Studie zeigte, wie ausgehend vom 3-Methylderivat des 5,5,8,8-Tetramethyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalens über kleine hin zu großen 3-Alkoxyresten der RXR-Agonismus abnahm und schließlich in Antagonismus mündete.[251] Sowohl **45** als auch **46** übernehmen die Rolle einer *tool compound*.

2 Motivation und Zielsetzung

Chronische Entzündungsreaktionen erfüllen eine Schlüsselfunktion in vielen Krankheiten.[252] Für einige davon gibt es keine adäquate oder nur unzureichende Pharmakotherapie wie beispielsweise MS oder NASH. Deshalb bedarf es der Entwicklung neuer Arzneistoffe zur Behandlung von chronischen Entzündungen, wofür die Modulation nukleärer Rezeptoren einen möglichen pharmakologischen Ansatz bietet.

LXR ist ein wichtiger Regulator der Cholesterol- und Lipidhomöstase.[30] Seine darüber hinaus antientzündlichen Eigenschaften machen ihn, wie in Kapitel 1.2.1 dargelegt, zu einer Zielstruktur für Atherosklerose und Alzheimer.[30,49,50] Um Leitstrukturen für neue LXR-Liganden zu identifizieren, sollte die DrugBank nach niedermolekularen Verbindungen (*engl.* small molecules) gescreent werden, die mit LXR interagieren. Der Vorteil dieser Datenbank aus von der FDA zugelassenen Arzneistoffen besteht dabei in der Nutzung von Molekülen, die bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien getestet und hinsichtlich wichtiger pharmakologischer Parameter wie Bioverfügbarkeit und metabolischer Stabilität optimiert wurden. Zusätzlich wurde die Sicherheit der Wirkstoffe bewertet, sodass diese insgesamt sehr gut charakterisiert sind. Die ausgewählte Bibliothek an Arzneistoffen sollte mit einer zweiten Datenbank aus bekannten LXR-Liganden abgeglichen werden, um geeignete Arzneistoffe zu charakterisieren, die nach *in silico* Vorhersage mit einer selbstorganisierenden Karte (SOM, *engl.* self-organizing map) LXR aktivieren könnten. Anschließend sollten die identifizierten Treffer in Reportergenassays evaluiert und damit *in vitro* bestätigt werden. Vorausgesetzt, dass auch dies gelingt, sollte daraufhin das Bindungsprofil durch Studium kompetitiver Effekte mit bekannten synthetischen wie auch endogenen LXR-Voll- und Partialagonisten näher analysiert werden. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Kapitel 3.1 und die daraus resultierende Veröffentlichung im Kapitel 16.1 zu finden.



47

Abbildung 2.1: *Chemische Struktur von Lesinurad (**47**)*

Die transkriptionelle Aktivität von PPARγ reguliert die Lipogenese, Speicherung von Lipiden im Fettgewebe und Adipozytendifferenzierung.[132] T2DM und andere Erkrankungen des metabolischen Syndroms sind mit chronischen Entzündungen assoziiert.[253] Da PPARγ-Agonisten die Insulinsensitivität steigerten und die Produktion proinflammatorischer Zytokine unterdrückten,[132,154] werden derzeit sPPARγMs entwickelt. Diese beabsichtigen, wie in Kapitel 1.4.1 erläutert, die Probleme oraler Antidiabetika wie Pioglitazon (**31**) zu vermeiden und deren insulinsensitivitätssteigernde und antiphlogistische Eigenschaften beizubehalten.[167] Das Urikosurikum Lesinurad (**47**) ähnelt mit seiner Y-förmigen und fettsäuremimetischen Struktur bekannten PPARγ-Liganden (Abbildung 2.1).[178] Ziel der in Kapitel 3.2 dargestellten Studie war die Bestätigung, Untersuchung und Charakterisierung der Interaktion von Lesinurad (**47**), das kürzlich für die Pharmakotherapie von Gicht zugelassen wurde, mit PPARγ *in vitro*. Gicht ist eine metabolische Erkrankung und häufig mit Komorbiditäten des metabolischen Syndroms verbunden.[254] Daher zielt die klassische Gichttherapie gemäß der aktuellen S2e-Leitlinie „Gichtarthritis“ auf die Einstellung der metabolischen Balance als kausale Behandlung.[254] Die Bewertung eines möglichen Einflusses von Lesinurad (**47**) auf die Gichttherapie sollte deshalb nach Untersuchung der Bindung und Art der PPARγ-Modulation mit geeigneten *in vitro* Techniken erfolgen.

RXRs sind nukleäre Rezeptoren, die mit vielen anderen Mitgliedern der Superfamilie heterodimerisieren, aber auch funktionale Homodimere bilden.[25] Dadurch beteiligen sich RXRs wie in Kapitel 1.5.1 aufgezeigt an zahlreichen physiologischen Prozessen und eignen sich als pharmakotherapeutische Zielstruktur zur Behandlung entzündlicher und neurodegenerativer Erkrankungen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, RXR-Agonisten zu entwickeln, welche die Nachteile bestehender Liganden nicht aufweisen. Die Verbesserung physikochemischer Eigenschaften und Reduktion toxischer Effekte könnte erheblich dazu beitragen, das therapeutische Potenzial RXRs bei neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen weiter zu erschließen. Zu diesem Zweck sollte zunächst ein Pharmakophormodell basierend auf der Kristallstruktur von Bexaroten (**38**) in Komplex mit RXRα entwickelt und mit dessen Hilfe eine fokussierte Substanzbibliothek aus kommerziell verfügbaren Fettsäuremimetika gescreent werden. Die Treffer sollten anschließend im Reportergenassay verifiziert und eine geeignete Leitstruktur entwickelt werden. Bei diesem Vorgehen konnten die Verbindungen **48** und **49** identifiziert werden, die sich strukturell in drei Teile gliedern lassen (Abbildung 2.2). Die acide Kopfgruppe und der lipophile Phenoxysubstituent werden durch eine Linkergruppe miteinander verknüpft. Zur Darstellung von Derivaten der Leitstrukturen sollte eine geeignete Syntheseroute etabliert werden. Alle drei Einheiten sollten durch systematische SAR-Untersuchungen analysiert und die optimierten Strukturmotive in einem finalen Molekül vereint werden. Die resultierende Verbindung galt es abschließend umfassend *in vitro* pharmakologisch sowie physikochemisch zu charakterisieren und die erhaltenen Resultate mit dem RXR-Literaturagonisten Bexaroten (**38**) zu vergleichen. Kapitel 3.3 fasst die Ergebnisse der Publikation (Kapitel 16.3) zusammen.

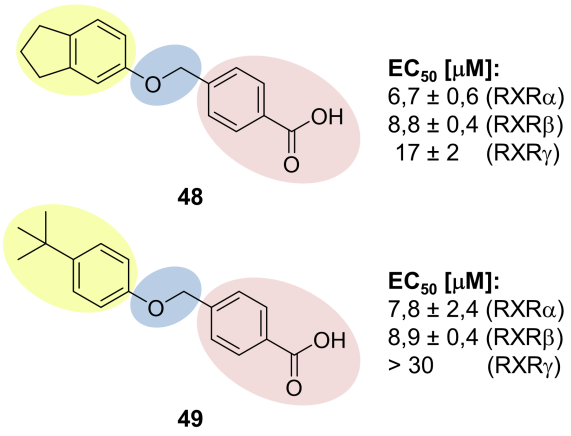
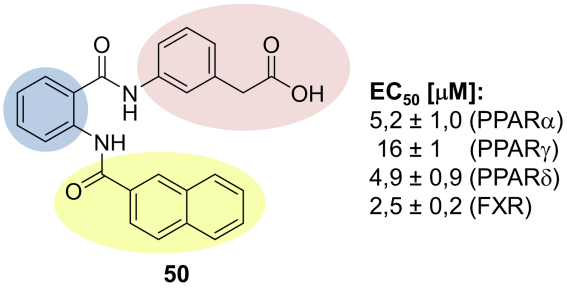


Abbildung 2.2: *Leitstrukturen zur Optimierung von RXR-Agonisten. Die Moleküle können in eine acide Kopfgruppe (rot), eine Linkereinheit (blau) sowie einen lipophilen Phenoxysubstituenten (gelb) unterteilt werden.*

FXR-Agonisten sind mit ihren hypolipidämischen, antientzündlichen und antifibrotischen Eigenschaften in der Leber potentielle Wirkstoffkandidaten für NAFLD und NASH.[107] Wie in Kapitel 1.3.1 diskutiert, reichte jedoch die Modulation von FXR alleine nicht aus, um die multifaktorielle Natur von NASH zu überwinden und eine vollständige Genesung der Leber zu bewirken.[107] Die Kombination von FXR mit einer weiteren Zielstruktur mit ähnlichen, komplementären therapeutischen Effekten liefert einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von NASH.[255] Eine solche Zielstruktur könnte durch PPARδ gegeben werden, der die Fettsäureoxidation im Skelettmuskel reguliert und ebenfalls antientzündliche Effekte vorweist.[133] Das periphere Wirkprinzip PPARδs könnte mit der Aktivierung von FXR im Zielorgan (Leber) eine additive Wirkung ergeben. Um das therapeutische Potenzial einer dualen Modulation zu überprüfen, sollten in dieser Arbeit duale PPARδ/FXR-Agonisten entwickelt werden. Vorausgehende Arbeiten im Arbeitskreis konnten mit Anthranilamid **50** eine passende Leitstruktur ausfindig machen (Abbildung 2.3).[256] Verbindung **50** lässt sich in eine acide Kopfgruppe, eine zentrale Anthranilsäureeinheit und einen lipophilen Acylsubstituenten einteilen. Nach der Entwicklung eines geeigneten Syntheseverfahrens sollte die SAR repräsentativer Derivate



50

Abbildung 2.3: *Die Leitstruktur zur Entwicklung dualer PPARδ /FXR-Agonisten lässt sich in eine acide Kopfgruppe (rot), ein Anthranilsäuregrundgerüst (blau) sowie einen lipophilen Acylsubstituenten (gelb) gliedern.*

in allen drei Molekülregionen systematisch untersucht werden. Dabei lag besonderes Augenmerk auf der Steigerung von sowohl der Potenz an PPARδ und FXR zu einem ausgeglichenen, nanomolaren Agonisten, als auch der Selektivität gegenüber PPARα und PPARγ. Die durch Kombination der optimierten Strukturmotive hervorgegangene Zielverbindung könnte im weiteren Verlauf des Projektes hinsichtlich ihrer pharmakologischen Eigenschaften umfassend charakterisiert werden. Die Resultate dieser Studie sind in Kapitel 3.4 zusammengefasst und wurden in einem deutschen sowie internationalen Verfahren zum Patent angemeldet (Kapitel 16.4).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Identifikation von Alitretinoin und Bexaroten als LXR-Liganden

LXR ist ein wichtiger Regulator der Cholesterolhomöostase und darüber hinaus am Lipid- und Glucosestoffwechsel beteiligt.[30] In entsprechenden Tiermodellen lieferten LXR-Agonisten vielversprechende Ergebnisse bezüglich des Abbaus von β-Amyloidfibrillen bei Alzheimer und der Remyelinisierung bei MS.[50–52] Dabei demonstrierten LXR-Liganden antiphlogistische Effekte durch Inhibition proentzündlicher Mediatoren und identifizierten LXR als Zielstruktur für entzündliche und neurodegenerative Erkrankungen.[51,52] Die Publikation „DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators“, die in *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* erschien,[257] beabsichtigte die Identifikation neuer Leitstrukturen für LXR-Liganden (Nachdruck siehe Kapitel 16.1).

Zu diesem Zweck wurde in Kollaboration mit dem Arbeitskreis (AK) Prof. Proschak (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) ein Datensatz von 1280 Wirkstoffen der DrugBank,[258] die von der FDA zugelassene Arzneistoffe enthält, auf sein Interaktionspotenzial mit LXRβ untersucht. Die Wirkstoffe mit einem Molekulargewicht unter 600 Da (*small molecules*) wurden mit einem zweiten Datensatz bestehend aus 458 bekannten LXR-Agonisten der ChEMBL-Datenbank mit EC_{50}-Werten unter 10 µM in einer SOM angeordnet.[259] Dabei wurden die Verbindungen zunächst durch einen *chemically advanced template search 2 descriptor* (CATS2D) vereinfacht beschrieben.[260] Dieser Deskriptor prüft jedes Atom auf vorhandene Pharmakophormerkmale (Wasserstoffbrückendonor, -akzeptor, positive oder negative Ladung, lipophil) und notiert die Anzahl der kovalenten Bindungen zwischen zwei Merkmalen in einen multidimensionalen Vektor.[260] Auf Basis dieser vektoriellen Darstellung können große Substanzbibliotheken nach Strukturen durchsucht werden, die einem vorgegebenen Molekül mit definierter biologischer Aktivität ähneln.[260] SOM ist eine unüberwachte Methode maschinellen Lernens und ordnet multidimensionale Datensätze wie in diesem Fall CATS2D-Vektoren auf einem Satz von miteinander verbundenen, sogenannten *Neuronen* an.[261] Um die Verteilung des vorgegebenen Datensatzes anzunähern, weist die SOM ähnliche Datenpunkte demselben Neuron zu.[261] SOMs ermöglichen zudem eine zweidimensionale Projektion dieser Daten, welche Karte genannt wird und vom Nutzer zur visuellen Auswertung verwendet werden kann (Abbildung 3.1). In diesem Fall ordnete die SOM CATS2D-Vektoren von Arzneistoffen und bekannten LXR-Liganden in toroidaler Geometrie mit 10 × 10 Neuronen an. Die Karte zeigte eine Gruppierung von LXR-Agonisten mit Arzneistoffen in bestimmten Regionen (grün markierte Neuronen) und erlaubte die Identifikation von elf Wirkstoffen (**37**, **51**-**60**), die auf demselben Neuron wie bekannte LXR-Agonisten angeordnet waren. Die Treffer

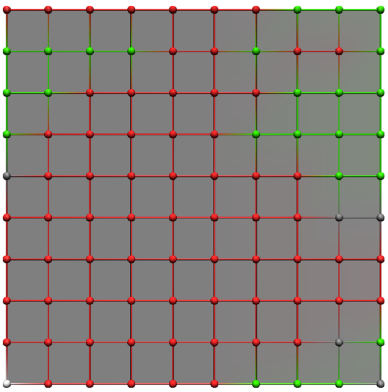


Abbildung 3.1: *Visualisierte selbstorganisierende Karte. Auf grünen Neuronen gruppieren sich LXRβ-Agonisten mit Arzneistoffen der DrugBank, für welche eine Aktivität an LXR vorausgesagt wird. Aufgrund toroidaler Topologie sind alle Cluster dieser 2D-Projektion zusammenhängend.*

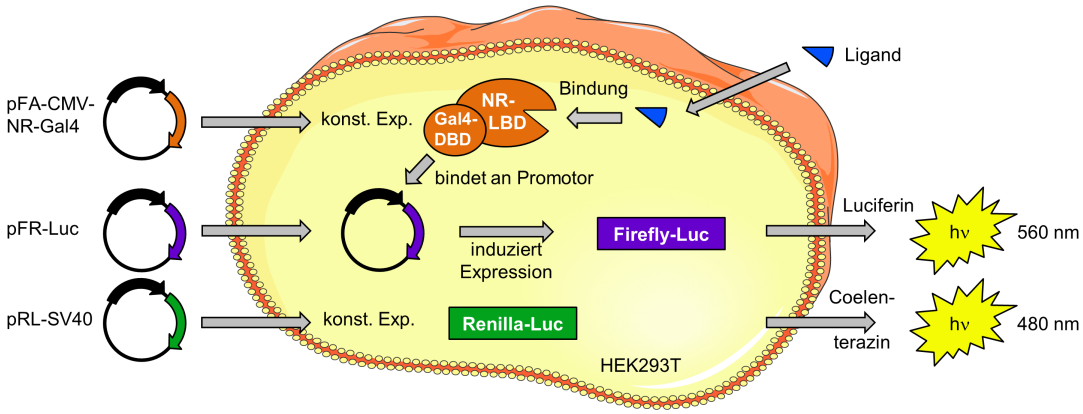


Abbildung 3.2: *Schematischer Aufbau des Gal4-Hybrid-Reportergenassays. Die Bindung eines Agonisten induziert die Expression des Firefly-Luciferase-Reporters und kann durch Zugabe des Substrates als Lumineszenzsignal quantifiziert werden. Exp., Expression; konst., konstitutiv; Luc, Luciferase; NR, (beliebiger) nukleärer Rezeptor.*

des *in silico* Screenings wurden anschließend in einem Gal4-Hybrid-Reportergenassay evaluiert, bei dem HEK293T Zellen transient mit drei Plasmiden transfiziert wurden (Abbildung 3.2). Ein Plasmid kodierte ein konstitutiv exprimiertes (CMV Promotor) Fusionsprotein, das aus der LXR-LBD und der Gal4-DBD (Hefe) bestand. Als Reporter diente die Firefly-Luciferase (Leuchtkäfer) unter Regulation des Gal4-RE. Zur Normalisierung und Kontrolle von Transfektionseffizienz sowie Toxizität wurde die Renilla-Luciferase (SV40 Promotor) cotransfiziert. Die genaue Methode ist in [257] beschrieben. Im Wesentlichen wurden HEK293T Zellen am Tag vor der Transfektion in Mikrotiterplatten mit 96 Wells ausgesät ($3{\cdot}10^4$ Zellen/Well). Fünf Stunden nach der Transfektion mit Lipofectamin LTX (Invitrogen) wurden die Zellen mit den Testsubstanzen, 0,1% DMSO als Negativkontrolle oder 1 µM T0901317 (**11**) als Positivkontrolle inkubiert. Nach 12-14 Stunden wurden die Zellen mit dem Dual-Glo™-Kit

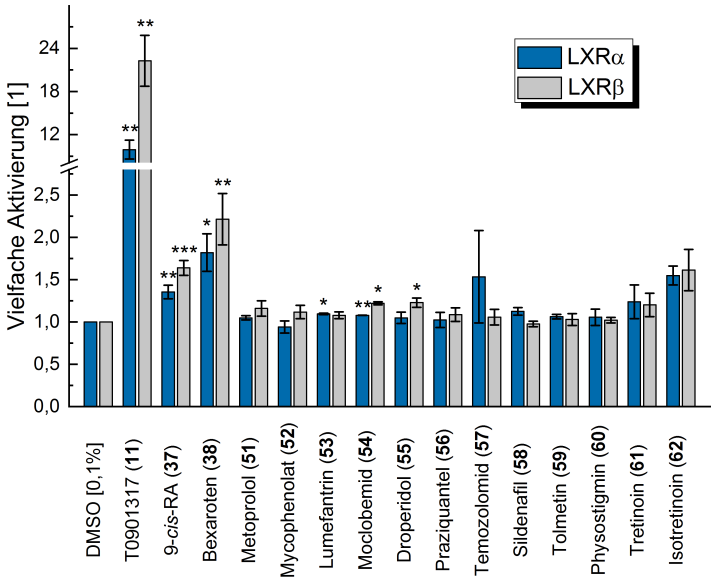


Abbildung 3.3: *Evaluation des virtuellen LXR-Screenings der DrugBank im Gal4-Hybrid-Reportergenassay. Alle Verbindungen wurden bei einer Konzentration von 10 µM getestet. Als Positivkontrolle diente 1 µM T0901317 (**11**). Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, $n \geq 2$; * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ (einseitiger Studentscher t-Test gegen 0,1% DMSO).*

(Promega) lysiert und die Firefly-Lumineszenz detektiert. Die Renilla-Lumineszenz wurde infolge der Zugabe des Substrats Coelenterazin und der Inhibition der Firefly-Luciferase gemessen. Die Firefly-Werte wurden mit den Renilla-Werten normiert und dem Faktor 1000 multipliziert, sodass relative Lichteinheiten (RLUs, *engl.* relative light unit) erhalten wurden. Die vielfache Aktivierung ist der Quotient aus den RLUs der Testsubstanz geteilt durch die RLUs der Negativkontrolle.
Unter den Kandidaten des virtuellen Screenings konnte lediglich Alitretinoin (9-*cis*-Retinsäure (RA), **37**) als LXR-Agonist mit niedriger Maximalaktivierung *in vitro* bestätigt werden (Abbildung 3.3). Um weitere Arzneistoffe zu finden, die eine Aktivität auf LXR verzeichnen, wurde daraufhin ein Rescreening durchgeführt, das eine Ähnlichkeitssuche mit **37** als Templat vornahm. Diese lieferte neben Bexaroten (**38**) auch die Retinsäuren Tretinoin (all-*trans*-Retinsäure, **61**) und Isotretinoin (13-*cis*-Retinsäure, **62**) als Treffer, von denen ausschließlich Bexaroten (**38**) eine Transaktivierung im Reportergenassay verursachte. Eine genauere Untersuchung der 9-*cis*-Retinsäure (**37**) und Bexaroten (**38**) mit Dosis-Wirkungskurven enthüllte die partialagonistische Aktivität beider Liganden ohne Präferenz für einen der Subtypen LXRα oder LXRβ (Abbildung 3.4). Während Alitretinoin (**37**) EC_{50}-Werte von 1,1 ± 0,2 µM (LXRα) und 1,7 ± 0,3 µM (LXRβ) aufwies, besaß Bexaroten (**38**) eine höhere Potenz mit EC_{50}-Werten von 0,20 ± 0,02 µM (LXRα) bzw. 0,43 ± 0,04 µM (LXRβ).
Anschließend wurde die partialagonistische Natur dieser Ligandbindung näher analysiert und ein potenziell kompetitives Verhalten von **37** und **38** in Anwesenheit unterschiedlicher literaturbekannter LXR-Agonisten untersucht (Abbildung 3.5). Bei Coinkubation mit den synthetischen Vollagonisten GW3965 (**2**) und LXR-623 (WAY252623, **12**) bei einer Konzentration von 3 und 10 µM antagonisierten 9-*cis*-Retinsäure (**37**, 10 µM) und Bexaroten (**38**, 1 µM) die LXRα-Aktivierung. Dies bestätigte **37** und **38** als Partialagonisten, da solche in Gegenwart von Vollagonisten partielle, antagonistische Effekte ausüben. Im Gegensatz dazu führte die Coinkubation der Wirkstoffe mit dem endogenen Partialagonisten 22(*R*)-Hydroxycholesterol (**4**) bei 10 und 20 µM zu einer synergistischen Aktivierung, die nicht von der Addition des RXR-Antagonisten HX531 (**45**, 1 µM) beeinträchtigt wurde. Aus diesem Grund ist in diesem Versuch eine Verwicklung des LXR-Heterodimerpartners auszuschließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wirkstoffe Alitretinoin (**37**) und Bexaroten (**38**) die Aktivität von LXR je nach Anwesenheit anderer LXR-Liganden unterschiedlich modulierten. Insbesondere

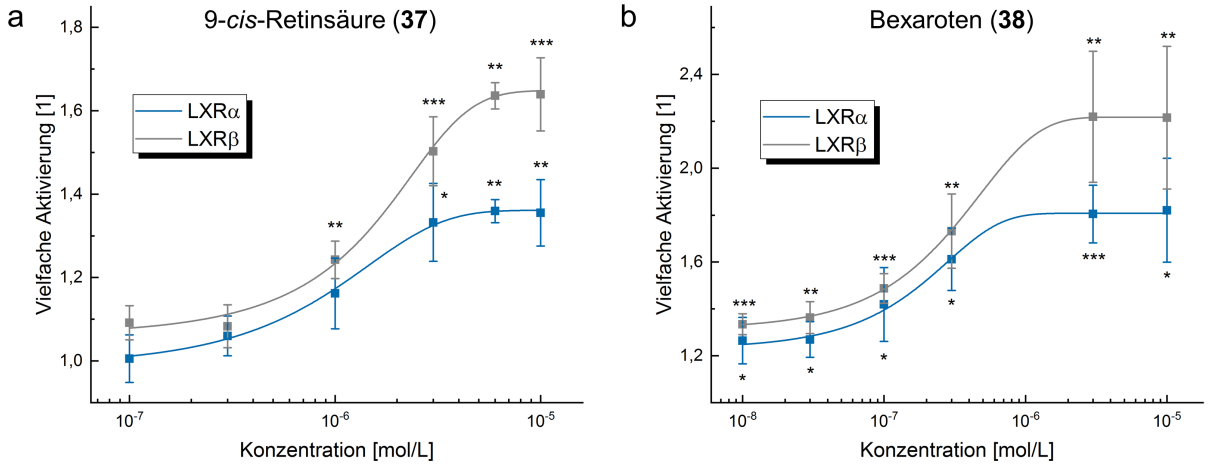


Abbildung 3.4: *Dosis-Wirkungsbeziehung von (a) 9-cis-Retinsäure (37) und (b) Bexaroten (38) in den Gal4-Hybrid-Reportergenassays von LXRα (blau) und LXRβ (grau). Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, $n \geq 3$; * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ (einseitiger Studentscher t-Test gegen 0,1% DMSO).*

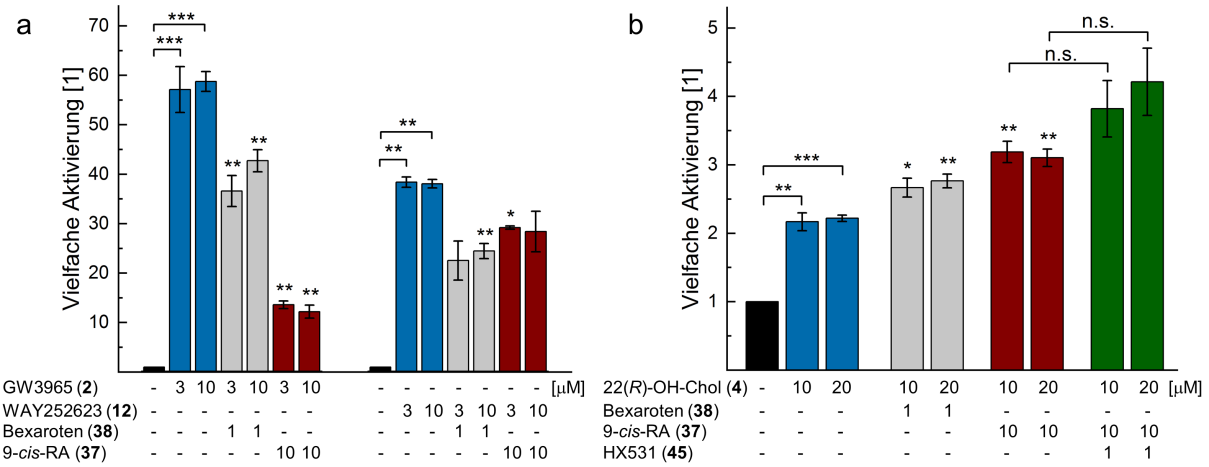


Abbildung 3.5: *Kompetition von 9-cis-Retinsäure (**37**) und Bexaroten (**38**) mit literaturbekannten LXR-Agonisten im LXRα-Gal4 Assay. Während **37** und **38** die LXR-Vollagonisten GW3965 (**2**) und WAY252623 (**12**) partiell antagonisierten (a), aktivierten sie LXR additiv mit dem endogenen Partialagonisten 22(R)-Hydroxycholesterol (**4**, b). Die Coinkubation mit dem RXR-Antagonisten HX531 (**45**), welche keine signifikante Veränderung der Aktivierung bewirkte, schließt RXR-vermittelte Effekte aus. Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, $n \geq 2$; * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$; n.s. nicht signifikant (einseitiger Studentscher t-Test gegen die coinkubierten LXR-Agonisten (a) GW3965 (**2**), WAY252623 (**12**) oder (b) 22(R)-Hydroxycholesterol (**4**)).*

die additive Wirkung mit dem endogenen LXR-Agonisten **4** könnte physiologische Relevanz haben. 9-*cis*-Retinsäure (**37**) ist ein RXR-Agonist und in einigen Ländern zur Behandlung des chronischen Handekzems und Kaposi-Sarkom zugelassen. Eine Phase III-Studie mit 1032 Patienten, denen **37** oral verabreicht wurde (30 mg täglich über einen Zeitraum von 24 Wochen) berichtete erhöhte Cholesterol- (14%) und Triglyceridspiegel (8%) im Blutserum.[262] Dies deutet auf eine Störung der Cholesterol- und Lipidhomöostase hin und könnte einer LXR-Aktivierung zugeschrieben werden. Klinische Studien der Phase II-III mit Bexaroten (**38**), der wie **37** ein Ligand des RXR ist, offenbarten noch schwerwiegendere Nebenwirkungen auf den Lipidhaushalt.[263] Bei 43% der 94 Patienten musste die anfängliche Dosis von 650 mg/m^2/d aufgrund von Hypercholesterolämie und Hypertriglyceridämie reduziert werden. Dennoch war auch in der niedrigeren Dosis (300 mg/m^2/d) als häufigste Nebenwirkung Hyperlipidämie (82%) gefolgt von Hypercholesterolämie (30%) zu beobachten. In den Studien wurden Plasmakonzentrationen von 243,2 ng/mL (0,81 µM) Alitretinoin (**37**) und 1182 ng/mL bzw. 3,39 µM Bexaroten (**38**, 300 mg/m^2/d) detektiert. Vergleicht man diese Werte mit den Ergebnissen des Reportergenassays, so stellt man fest, dass diese Konzentrationen ausreichen, um LXR physiologisch zu aktivieren, insbesondere in Anwesenheit des endogenen Liganden **4**. Da beide Wirkstoffe sowohl LXR als auch RXR aktivieren, könnten sie das permissive LXR/RXR-Heterodimer synergistisch aktivieren und zu einer stärkeren Aktivierung führen als Liganden, die nur einen Partner aktivieren.[175,201] Das höhere Plasmalevel, die höhere Maximalaktivierung und die nanomolare Potenz von Bexaroten (**38**) stehen im Einklang mit dem häufigeren Auftreten von Störungen des Cholesterol- und Lipidhaushalts in den klinischen Studien im Vergleich zu **37**. Basierend auf diesen Daten wurden Alitretinoin (**37**) und Bexaroten (**38**) als duale LXR/RXR-Agonisten identifiziert und eine mögliche Erklärung für beobachtete Nebenwirkungen aufgedeckt. Beide Substanzen können als Leitstruktur zur selektiven Optimierung der Nebenwirkungen (SOSA) dienen, um neue LXR- und duale LXR/RXR-Modulatoren mit antientzündlichen Eigenschaften zu entwickeln. Außerdem könnten aus **37** und **38**

LXR/RXR-heterodimerselektive RXR-Agonisten mit besserem Sicherheitsprofil hervorgehen, welche andere permissive Heterodimere nicht aktivieren.

3.2 Charakterisierung von Lesinurad als selektiver PPARγ-Modulator (sPPARγM)

Mit Lesinurad (**47**) wurde in der Publikation „Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulator (sPPARγM) *in Vitro*“ ein weiterer Ligand eines nukleären Rezeptors identifiziert, der zur Auflösung bestimmter Entzündungen beitragen kann.[264] Vorangetrieben wurde diese Entdeckung durch die auffallend starke strukturelle Ähnlichkeit Lesinurads (**47**) mit bekannten PPAR-Liganden wie WY14,643 (**63**, Abbildung 3.6a). Typische Vertreter synthetischer PPARγ-Liganden gehören zu den Fettsäuremimetika, welche endogene PPARγ-Agonisten (Fettsäuren und Eicosanoide) in ihrer Struktur nachahmen und über eine acide Kopfgruppe verfügen.[265] Molekulares Docking von Lesinurad (**47**) in die Y-förmige Ligandbindetasche von PPARγ (Abbildung 3.6b) deutete auf ein vorteilhaftes Bindungsprofil hin (Kooperation mit Prof. Dr. Ewgenij Proschak und Dr. Daniel Merk, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt). Das Netzwerk aus den Aminosäuren Ser_{289}, His_{323}, Tyr_{473} und His_{449} bildete Wasserstoffbrücken mit der Carboxylgruppe des Arzneistoffs, der kürzlich eine Zulassung bei Gicht erhielt.[267] Zusätzlich wurde die Protein-Ligand-Bindung durch π-Wechselwirkungen von His_{449} und Cys_{285} mit dem Triazolring gestärkt. Der lipophile Arm der Bindetasche wurde durch den hydrophoben 4-Cyclopropyl-1-naphthylrest eingenommen.
Die Hypothese, dass Lesinurad (**47**) ein PPARγ-Ligand ist, wurde in Gal4-Hybrid-Reportergenassays von PPARs und zwölf eng verwandten nukleären Rezeptoren überprüft (Abbildung 3.7a). Diese

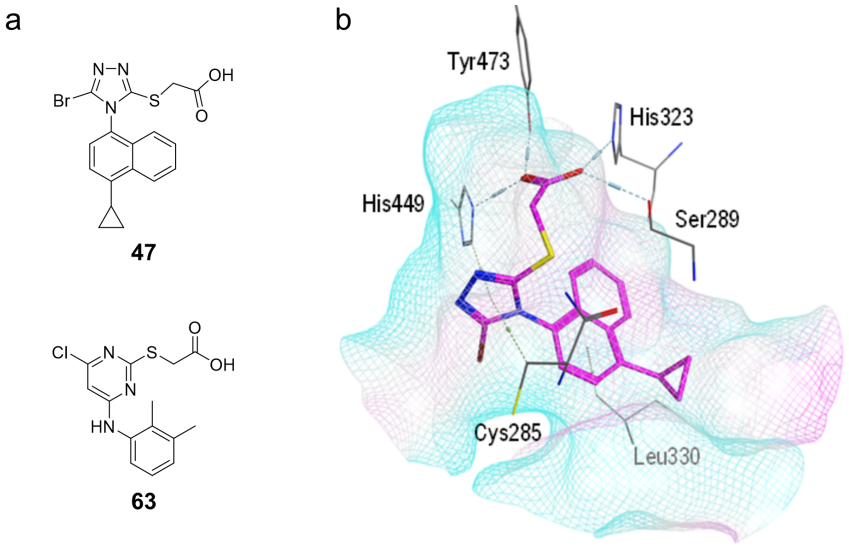


Abbildung 3.6: *(a) Das Fettsäuremimetikum Lesinurad (**47**) weist strukturelle Ähnlichkeit mit dem dualen PPARα/γ-Agonisten WY14,643 (**63**) auf. (b) Molekulares Docking von Lesinurad (**47**) in die LBD von PPARγ (PDB-ID: 3ET3[266]) legt einen günstigen Bindemodus nahe, in dem die Carboxylgruppe Wasserstoffbrückenbindungen mit der Tetrade aus Ser_{289}, His_{323}, Tyr_{473} und His_{449} bildet. Das Triazol geht π-Bindungen mit His_{449} und Cys_{285} ein und der hydrophobe 4-Cyclopropyl-1-naphthylrest in **47** ist in einem lipophilen Arm der Bindetasche platziert.*

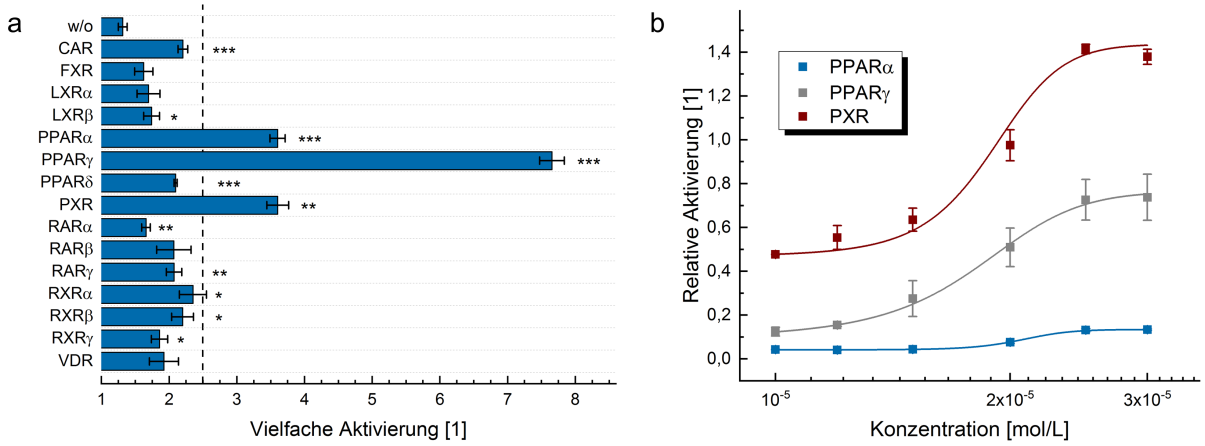


Abbildung 3.7: *(a) Das in vitro Screening von Lesinurad (**47**, 30 µM) auf nukleären Rezeptoren in 15 Gal4-Hybrid-Reportergenassays charakterisierte den Arzneistoff als Agonist von PPARγ, PPARα und PXR. In Abwesenheit eines nukleären Rezeptorplasmids (w/o) wurde keine Transaktivierung beobachtet und somit unspezifische Effekte ausgeschlossen. * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ (zweiseitiger Studentscher t-Test gegen w/o-Kontrolle). (b) Dosis-Wirkungskurven von Lesinurad (**47**) auf PPARα, PPARγ und PXR. Die Aktivierung ist normiert auf die Referenzagonisten GW7647 (**64**, PPARα), Pioglitazon (**31**, PPARγ) und SR12813 (**65**, PXR) bei 1 µM. Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, $n \geq 3$.*

sind bereits in Kapitel 3.1 für LXRα und LXRβ beschrieben und unterscheiden sich davon nur im Expressionsplasmid des Gal4-Fusionsproteins, wo die LBD des entsprechenden (humanen) nukleären Rezeptors kodiert ist. In diesen Testsystemen aktivierte Lesinurad (**47**) bei einer Konzentration von 30 µM PPARγ und mit geringerer Potenz und Effizienz auch PPARα sowie PXR. Vielfache Aktivierungen unter einem Wert von 2,5 wurden trotz statistischer Signifikanz als unerheblich betrachtet. In Abwesenheit eines Hybridrezeptors bewirkte Lesinurad (**47**) keine Aktivierung, sodass dieses Kontrollexperiment bestätigt, dass die Transaktivierung des Reporters durch die nukleären Rezeptoren vermittelt wurde. Anschließend wurde **47** mittels Dosis-Wirkungskurven auf PPARγ, PPARα und PXR vollständig charakterisiert (Abbildung 3.7b). Die relative Aktivierung stellt die Normierung der RLUs der Testsubstanz auf je 1 µM der Referenzagonisten GW7647 (**64**, PPARα), Pioglitazon (**31**, PPARγ) oder SR12813 (**65**, PXR) dar. Lesinurad (**47**) aktivierte PPARγ mit einem EC_{50}-Wert von 19 ± 1 µM und annähernd gleicher Effizienz ($79 \pm 5\%$) wie PPARγ-Vollagonist Pioglitazon (**31**). Auf PPARα besaß Lesinurad (**47**) zwar einen ähnlichen EC_{50}-Wert (21 ± 1 µM), jedoch eine deutlich niedrigere Maximalaktivierung ($14 \pm 1\%$) im Vergleich zu PPARα-Agonist GW7647 (**64**). Zudem wurde ein PXR-aktivierender Effekt von **47** festgestellt ($EC_{50} = 19 \pm 1$ µM, $145 \pm 9\%$ max. Akt.). Dies ist nicht verwunderlich, weil vorausgehende Studien bereits Lesinurad (**47**) als CYP3A4-Induktor charakterisierten, das durch den Xenobiotikasensor PXR reguliert wird.[268] Im Vergleich zur bemerkenswerten PPARγ-Aktivierung scheint der schwache Partialagonismus an PPARα kaum nennenswert und aus diesem Grund wurde der Fokus der weiteren Charakterisierung Lesinurads (**47**) auf PPARγ gelegt.
Zunächst wurde die Ligandbindung in einem weniger artifiziellen PPARγ-Volllängen (VL)-Reportergenassay analysiert (Abbildung 3.8). Mit Ausnahme der verwendeten Plasmide ist das allgemeine Protokoll dieses Testsystems identisch mit dem der Gal4-Hybride. Mithilfe des Lipofectamin LTX-Reagenzes (Invitrogen) wurden HEK293T Zellen mit dem Firefly-Luciferasekonstrukt PPRE1-pGL3, das unter Kontrolle eines humanen PPAR-RE steht, sowie der Renilla-Luciferase pRL-SV40 (Promega) als interne Kontrolle transfiziert. Dieser Assay verzichtet auf eine Überexpression des PPAR/RXR-Heterodimers, sondern nutzt die intrinsisch vorhandenen Rezeptoren der humanen embryonalen

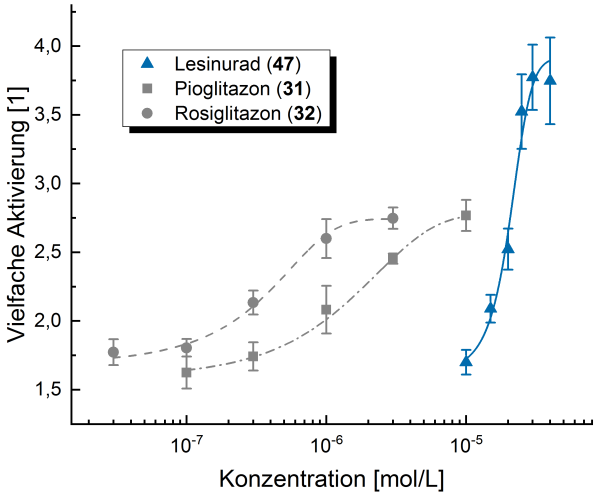


Abbildung 3.8: *PPARγ-Volllängen-Reportergenassay von Lesinurad (**47**) und den synthetischen Vollagonisten Pioglitazon (**31**) und Rosiglitazon (**32**). HEK293T Zellen wurden mit einem Firefly-Luciferase-Reporter unter Kontrolle des humanen PPAR-RE sowie einer Renilla-Luciferase transfiziert und über Nacht mit den Testsubstanzen inkubiert. Die vielfache Aktivierung der Negativkontrolle (0,1% DMSO) ist dargestellt und alle Ergebnisse ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, $n \geq 3$.*

Nierenzelllinie. Dieses Prüfsystem wurde mit den PPARγ-Vollagonisten Pioglitazon (**31**) und Rosiglitazon (**32**) validiert, deren Potenzen (**31**: $EC_{50} = 1{,}7 \pm 0{,}1$ µM, **32**: $EC_{50} = 0{,}39 \pm 0{,}03$ µM) sich mit Literaturwerten deckten.[269] Die im Gal4-Assay beobachte Aktivierung PPARγs durch Lesinurad (**47**) konnte im VL-Assay reproduziert werden ($EC_{50} = 21 \pm 2$ µM).
Um die direkte Modulation PPARγs in zellfreier Umgebung zu bestätigen, wurde die Wechselwirkung mit Lesinurad (**47**) durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC, *engl.* isothermal titration calorimetry) studiert (Kooperation mit Leonie Gellrich, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, Abbildung siehe Nachdruck der Publikation in Kapitel 16.2). Der eingeschränkten Löslichkeit von **47** geschuldet, wurde der Wirkstoff mit rekombinanter PPARγ-LBD revers titriert. Die Affinität Lesinurads (**47**) zur PPARγ-LBD wurde durch eine unabhängige Dissoziationskonstante K_d von 1,3 µM untermauert. Außerdem zeigte die Auswertung der ITC-Daten, dass die Bindung sowohl exotherm ($\Delta H = -26$ kJ/mol) ist, als auch entropisch begünstigt wird ($\Delta S = 27$ J/(mol·K)).
PPARγ ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Fettgewebe, wo er die Lipidhomöostase und Adipozytendifferenzierung reguliert. Murine 3T3-L1 Adipozyten dienten als Testsystem, um die adipogenen Effekte des Urikosurikums Lesinurad (**47**) zu untersuchen (Abbildung 3.9). PPARγ ist hochkonserviert zwischen dem Menschen und der Maus, welche nach allgemeiner Auffassung ein geeignetes Tiermodell darstellt.[270] Um 3T3-L1 Zellen in reife Adipozyten zu differenzieren, wurden diese durch einen Cocktail aus Insulin, Dexamethason, 3-*iso*-Butyl-1-methylxanthin und der jeweiligen Testsubstanz stimuliert (Zusammenarbeit mit Tamara Göbel und Dr. Astrid Kahnt, AK Prof. Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt). Nach insgesamt 14 Tagen wurde die Akkumulation von Fetttröpfchen durch Färbung mit Oil Red O sichtbar gemacht. Als Negativkontrollen wurden undifferenzierte Zellen und mit 0,1% DMSO behandelte Zellen verwendet. Im Unterschied zu diesen zeigte die Positivkontrolle Rosiglitazon (**32**, 2 µM) eine starke Anhäufung von Lipiden in den Adipozyten. Mit Lesinurad (**47**) behandelte Zellen hingegen waren selbst bei der höchsten Konzentration von 50 µM nicht von den Negativkontrollen zu unterscheiden. Um größeres Verständnis

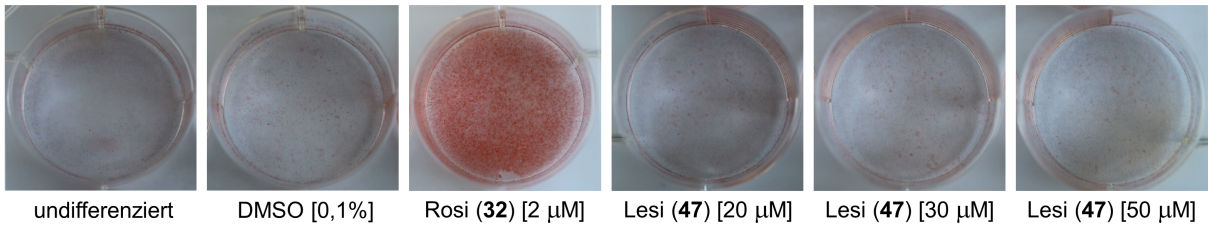


Abbildung 3.9: *Im Gegensatz zur Positivkontrolle Rosiglitazon (Rosi, **32**) verursachte Lesinurad (Lesi, **47**) keine Akkumulation von Lipidtröpfchen in differenzierten murinen 3T3-L1 Adipozyten. Eine Anfärbung von Lipiden mit Oil Red O war in undifferenzierten, mit 0,1% DMSO behandelten Zellen (Negativkontrolle), sowie bei der Inkubation mit Lesinurad (**47**) kaum erkennbar. Repräsentative Fotografien aus drei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.*

dieser ausbleibenden Wirkung zu erlangen, wurde das Genexpressionsprofil der murinen 3T3-L1 Adipozyten nach der Differenzierung mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR, *engl.* quantitative real-time polymerase chain reaction) studiert (Abbildung 3.10). Dafür wurden die Zellen mit dem TRIzol-Reagenz lysiert (Ambion, Life Technologies), die gesamte mRNA extrahiert und DNA-Verunreinigungen durch DNase-Abbau entfernt (DNase I, RNase-free Kit, Ambion, Life Technologies). Anschließend wurden die mRNA-Proben in cDNA transkribiert (high capacity RNA-to-cDNA Kit, Applied Biosystems). Als Referenzgen für die murine 3T3-L1 Zelllinie diente das *non-POU domain-containing octamer-binding protein* (NonO) und die Proben wurden nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode ausgewertet. Zusätzlich wurde die Expression PPARγ-regulierter Gene in der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 analysiert. Hierfür wurden HepG2 Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert, geerntet und unmittelbar zur RNA-Isolation mit dem Total RNA Mini Kit (Omega Bio-Tek) verwendet. Die übrigen Schritte waren identisch mit dem Protokoll für murine 3T3-L1 Zellen, allerdings wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen amplifiziert. In murinen 3T3-L1 Zellen induzierte Rosiglitazon (**32**, 2 µM) die Expression von PPARγ-Zielgenen, die an der Adipogenese beteiligt sind (Abbildung 3.10a). Dazu zählen der Scavenger-Rezeptor CD36, das Adipokin Adiponektin (welches durch das ADIPOQ-Gen codiert wird), der Fettsäuretransporter FABP4 und der Glucosetransporter GLUT4. Demgegenüber führte die Inkubation mit Lesinurad

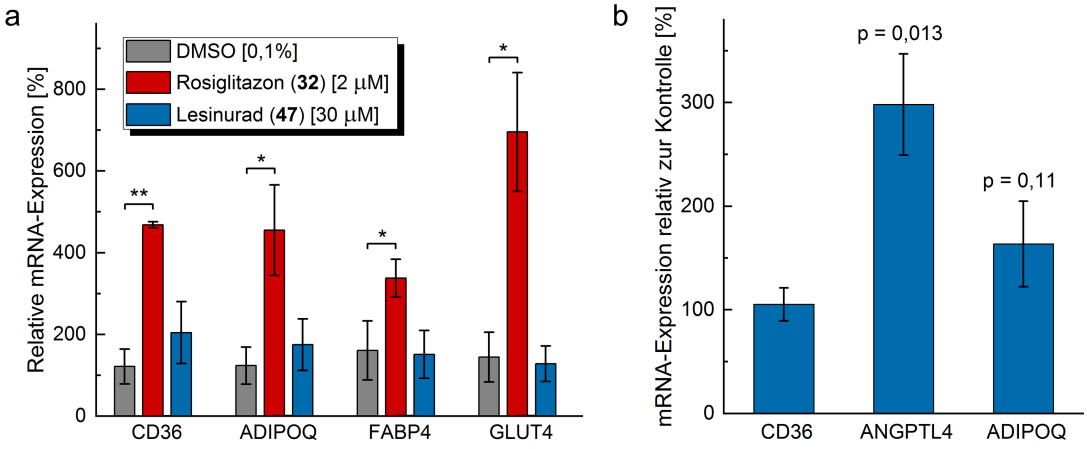


Abbildung 3.10: *Expression PPARγ-regulierter Gene (mRNA) nach Inkubation mit (a) Lesinurad (**47**) und Rosiglitazon (**32**) in differenzierten murinen 3T3-L1 Adipozyten ($n = 3$) und (b) **47** in humanen HepG2 Hepatozyten ($n = 4$). Alle Ergebnisse sind nach der $\Delta\Delta C_T$-Methode ausgewertet und ausgedrückt als Mittelwert ± SEM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (einseitiger Studentscher t-Test gegen 0,1% DMSO).*

(**47**) bei 30 µM zu keiner signifikanten Änderung der Genexpression. Im Vergleich zu mit 0,1% DMSO behandelten murinen Adipozyten ließen nur CD36 und Adiponektin einen geringen Trend zur Überexpression erkennen. Somit bestätigte dieses Experiment die Ergebnisse der Anfärbung mit Oil Red O und zeigte, dass **47** die Expression PPARγ-regulierter, proadipogener Gene nicht steigert. In der humanen Hepatomzelllinie HepG2 verursachte Lesinurad (**47**) ein unterschiedliches transkriptionelles Profil (Abbildung 3.10b) und induzierte die Expression des Angiopoetin-ähnlichen Proteins 4 (ANGPTL4, *engl.* angiopoietin-like protein 4), während CD36 und Adiponektin kaum oder gar nicht davon betroffen wurden.
Da Lesinurad (**47**) die Expression von PPARγ-Zielgenen unterschiedlich modulierte und infolgedessen als sPPARγM bezeichnet werden kann, wurde die Interaktion mit Coaktivatoren untersucht, welche hierfür verantwortlich sein könnten (Abbildung 3.11). Der Einfluss von **47** auf die Rekrutierung von Coaktivatoren durch die PPARγ-LBD wurde in einem zeitaufgelösten Förster-Resonanzenergietransfer (TR-FRET)-Assay analysiert (Kollaboration mit Dr. Jan Heering, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Frankfurt). In diesem Testsystem wurde an Streptavidin konjugiertes Terbiumkryptat (cisbio) als FRET-Donor verwendet und an *N*-terminal biotinylierte Coaktivatorpeptide gebunden (Eurogentec GmbH). Als FRET-Akzeptor diente ein Fusionsprotein aus rekombinanter PPARγ-LBD und *N*-terminalem grün fluoreszierendem Protein (GFP). Der FRET-Donorkomplex und der FRET-Akzeptor wurden gemeinsam mit der Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen für zwei Stunden inkubiert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten (FI) bei einer Wellenlänge von 520 nm (Akzeptor) und 620 nm (Donor-Referenz) nach Anregung bei 340 nm gemessen. Der Quotient aus FI_{520} und FI_{620} multipliziert mit dem Faktor 10^4 ergab einen dimensionslosen TR-FRET-Wert. Dieser Wert ist umso größer, je näher sich FRET-Donor und Akzeptor kommen, was durch erfolgreiche Coaktivatorrekrutierung begünstigt wird. Das TR-FRET- bzw. Rekrutierungssignal wurde auf 1 µM Rosiglitazon (**32**) referenziert. Lesinurad (**47**) vermittelte in diesem Assay coaktivatorspezifische Unterschiede in der Rekrutierung durch PPARγ. Während die Rekrutierung des Steroidrezeptor Coaktivators 1 (SRC-1, *engl.* steroid receptor coactivator 1), oder auch nukleärer Rezeptor Coaktivator 1 (NCOA1, *engl.* nuclear receptor coactivator 1) genannt, mit einem EC_{50}-Wert

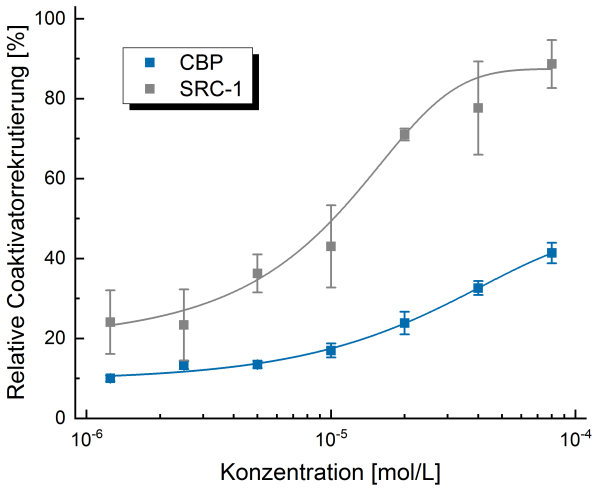


Abbildung 3.11: *Lesinurad (**47**) induzierte die Coaktivatorrekrutierung durch PPARγ im zeitaufgelösten FRET-Assay. Dabei bestanden Unterschiede zwischen den Coaktivatoren SRC-1 und CBP in Bezug auf Potenz und maximaler Rekrutierung relativ zu 1 µM Rosiglitazon (**32**). Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± Standardabweichung.*

von 12 ± 2 μM und einer maximalen relativen Rekrutierung von 91 ± 5% erfolgte, war die Lesinurad-induzierte Rekrutierung des cAMP Response-Element-Bindeprotein (CREB)-Bindeproteins (CBP, *engl.* CREB-binding protein) deutlich schwächer ausgeprägt ($EC_{50} = 44 \pm 8$ μM, max. rel. Rekrutierung 59 ± 4%). Diesen Ergebnissen zufolge dominierte bei den Konzentrationen, die in den *in vitro* Studien eingesetzt wurden, die Rekrutierung von SRC-1, wohingegen CBP nur eine untergeordnete Rolle zu spielen schien.

Lesinurad (Handelsname Zurampic®, **47**) ist ein Urikosurikum und Inhibitor des URAT1 sowie des organischen Anionentransporters (OAT) 4.[267] Es senkt den Harnsäurespiegel im Blutplasma und wurde aufgrund dessen zur Behandlung von Gicht zugelassen, obwohl es nur eine moderate Aktivität an den Zielproteinen verzeichnet (IC_{50}(URAT1) = 3,5 μM, IC_{50}(OAT4) = 2,0 μM).[267] Pharmakokinetische Studien mit **47** berichteten von mittleren maximalen Plasmakonzentrationen zwischen 15 und 29 μM nach oraler Verabreichung der üblichen Dosis von 200 mg.[271,272] Die freien Plasmakonzentrationen sind jedoch deutlich geringer (0,3-0,6 μM), da der Wirkstoff zu 98% an Plasmaproteine gebunden vorliegt. Nichtsdestotrotz ist Lesinurad (**47**) ein Substrat diverser organischer Anionentransporter der *solute carrier*-Familie und könnte daher in Zellen akkumulieren.[272] Die in den Reportergenassays gemessenen EC_{50}-Werte von 19-21 μM sind nur geringfügig größer als die IC_{50}-Werte an URAT1 (3,5 μM) bzw. OAT4 (2,0 μM), sodass die Möglichkeit einer klinischen PPARγ-Modulation im Menschen besteht.
Charakteristisch für Gicht sind hohe Konzentrationen der Harnsäure, die sich in Form von Kristallen ablagern, was zu einer entzündlichen Arthritis führen kann.[273] Dabei spielen neben der Harnsäure auch andere Faktoren wie freie Fettsäuren eine Rolle bei der Pathogenese der Entzündung.[274] Gicht ist mit dem metabolischen Syndrom assoziiert und stark unter den häufigsten Komorbiditäten vertreten.[254] Diese sind Hypertension (74%), chronische Niereninsuffizienz (71%) und Adipositas (54%), gefolgt von Diabetes mellitus (24%), sodass die aktuelle S2e-Leitlinie „Gichtarthritis“ als kausale Behandlung eine Änderung des Lebensstils empfiehlt.[254] Insbesondere die Spiegel frei zirkulierender Fettsäuren und Diabetes mellitus stellen eine Verbindung zu PPARγ her. Lesinurad (**47**) gruppierte sich in der hier beschriebenen Studie zu einer Reihe von sPPARγMs, die als „selektive“ Modulatoren entweder gewebe- oder wie in diesem Fall genspezifische Effekte aufweisen.[167,182] In der humanen HepG2 Zelllinie induzierte Lesinurad (**47**) die Expression von ANGPTL4, das an der Glucosehomöostase und dem Lipidstoffwechsel beteiligt ist und außerdem unter Verdacht steht, die Insulinsensitivität zu steigern.[275,276] Darüber hinaus wurde unter Behandlung mit **47** Adiponektin tendenziell verstärkt exprimiert, das als Regulator von Glucosespiegel und Fettsäureabbau fungiert.[277] Dabei lässt Lesinurad (**47**) adipogene Nebenwirkungen aus, die bei Vollagonisten wie Pioglitazon (**31**) oder Rosiglitazon (**32**) beobachtet wurden.[132] Daher könnten Gichtpatienten mit metabolischen Komorbiditäten wie T2DM und anderen Manifestationen des metabolischen Syndroms von einer Behandlung mit Lesinurad (**47**) profitieren. Auch die PPARγ-vermittelte Inhibition von Zytokinen wie IL-6 käme der Gicht als entzündlicher Erkrankung zugute.[155,156]
Obwohl im murinen Fettgewebe sowohl SRC-1 als auch CBP exprimiert wird, wurde gezeigt, dass die Wechselwirkung zwischen PPARγ und CBP für die Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten entscheidend ist.[278–280] Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass Lesinurad (**47**) die Rekrutierung von CBP nur mit schwacher Potenz vermittelte und deshalb Konzentrationen bis 50 μM nicht ausreichten, um die Differenzierung von Adipozyten zu fördern. Durch Bindung von **47** rekrutierte PPARγ dagegen SRC-1 mit höherer Potenz, das mit der Regulation des Energiehaushalts im Fettgewebe sowie der

Thermogenese in Verbindung gebracht wird.[281]
Zusammenfassend wurde die selektive Modulation der Aktivität von PPARγ durch sPPARγM Lesinurad (**47**) aufgeklärt. Gemeinsam mit seiner urikosurischen Wirkung ergibt sich dadurch ein dualer Mechanismus, der sich insbesondere bei Patienten mit metabolischen Begleiterkrankungen als vorteilhaft erweisen könnte. Ferner liefert Lesinurad (**47**) den Einstiegspunkt eines SOSA-Ansatzes, welcher die Inhibition der Anionentransporter URAT1 und OAT4 reduzieren und einen potenteren sPPARγM hervorbringen könnte. Dies könnte die vorteilhafte antientzündliche und insulinsensitivitätssteigernde Wirkung von PPARγ-Agonisten in den Vordergrund und die nachteilige adipogene Wirkung in den Hintergrund rücken lassen.

3.3 Entwicklung einer neuen Strukturklasse von RXR-Agonisten

RXR besitzt ein ausgeprägtes therapeutisches Potenzial bei Entzündungsprozessen, insbesondere bei neuroinflammatorischen Erkrankungen.[6,7] Die vollständige Erforschung dieses Potenzials wird jedoch durch Eigenschaften bislang verfügbarer RXR-Liganden beeinträchtigt, welche mit zahlreichen Nachteilen behaftet sind. Dazu zählt eine mangelnde Selektivität für RXR gegenüber RAR, wie sie etwa bei Alitretinoin (**37**) oder Bexaroten (**38**) beobachtet wurde.[27,209,226] Ebenso wurden im Rahmen dieser Arbeit **37** und **38** als LXR-Agonisten charakterisiert.[257] Der mangelnden Selektivität der RXR-Agonisten könnten zahlreiche Nebenwirkungen geschuldet sein. So erhöhten unter anderem Alitretinoin (**37**), Isotretinoin (**62**) und Bexaroten (**38**) Serumtriglyceride.[226,228,233] Bexaroten (**38**) induzierte zudem bei der Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms eine Hypothyreose[229–231] und in einem Fall eine Lymphopenie.[233] In präklinischen Studien zu Brustkrebs verursachte das Alitretinoin-Derivat 9-*cis*-UAB30 bei den Versuchsmäusen eine Hepatomegalie.[232] Ein weiterer Nachteil aktueller RXR-Agonisten ist die stark ausgeprägte Lipophilie, die eine schlechte Wasserlöslichkeit bedingt.[27,209,282]
Mit einem Lösungsansatz dieser Probleme durch Entwicklung eines neuen Chemotyps von RXR-Agonisten beschäftigte sich die Publikation „Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype“.[283] Dabei sollte eine Leitstruktur für RXR-Liganden mithilfe des computergestützten Wirkstoffdesigns entwickelt werden, welches sich in strukturbasierte und ligandbasierte Methoden unterteilen lässt.[284] Das strukturbasierte Wirkstoffdesign fokussiert sich auf die dreidimensionale biologische Zielstruktur, um neue Liganden basierend auf der vorhergesagten Wechselwirkung mit der Ligandbindetasche zu identifizieren.[284] Im Gegensatz dazu konzentrieren sich ligandbasierte Ansätze auf bekannte Liganden des Rezeptors und versuchen molekulare Deskriptoren (strukturelle und physikochemische Eigenschaften) zu charakterisieren, welche für die biologische Aktivität verantwortlich sind.[284] Mithilfe der Liganden kann ein Pharmakophormodell abgeleitet werden, das Moleküle auf die wesentlichen sterischen und elektronischen Merkmale reduziert, die notwendig sind, um die gewünschte biologische Aktivität zu erreichen.[284]
In Kooperation mit dem AK Prof. Proschak (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) wurde ein Pharmakophormodell entwickelt, das auf dem Bindemodus des synthetischen RXR-Vollagonisten Bexaroten (**38**, Abbildung 3.12a) in der hRXRα-LBD (PDB-ID: 4K6I[285]) beruht und Wasserstoffbrückendonatoren, -akzeptoren, positive und negative Ladungen, lipophile Gruppen

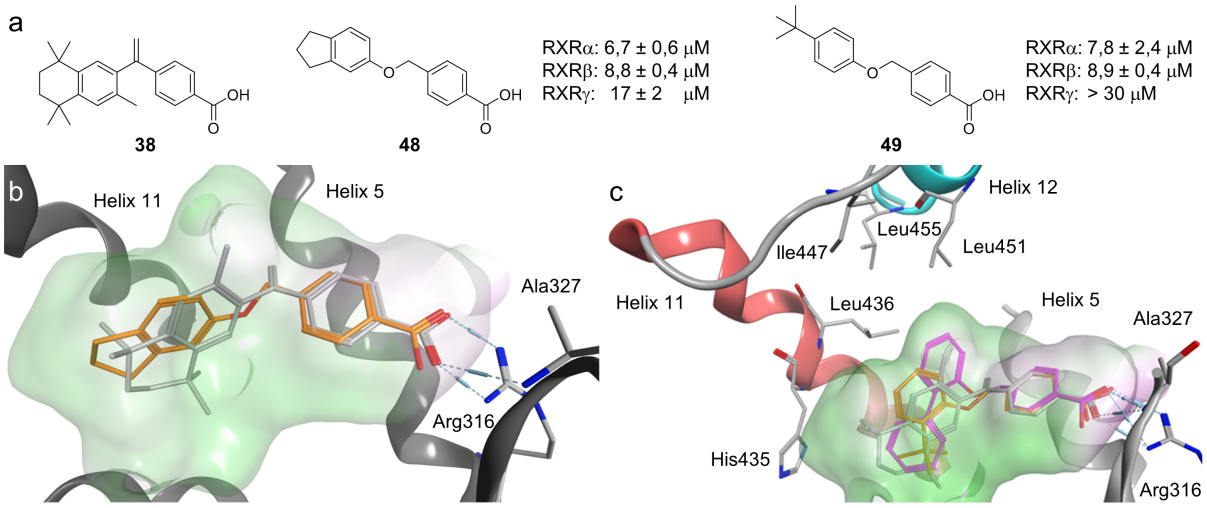
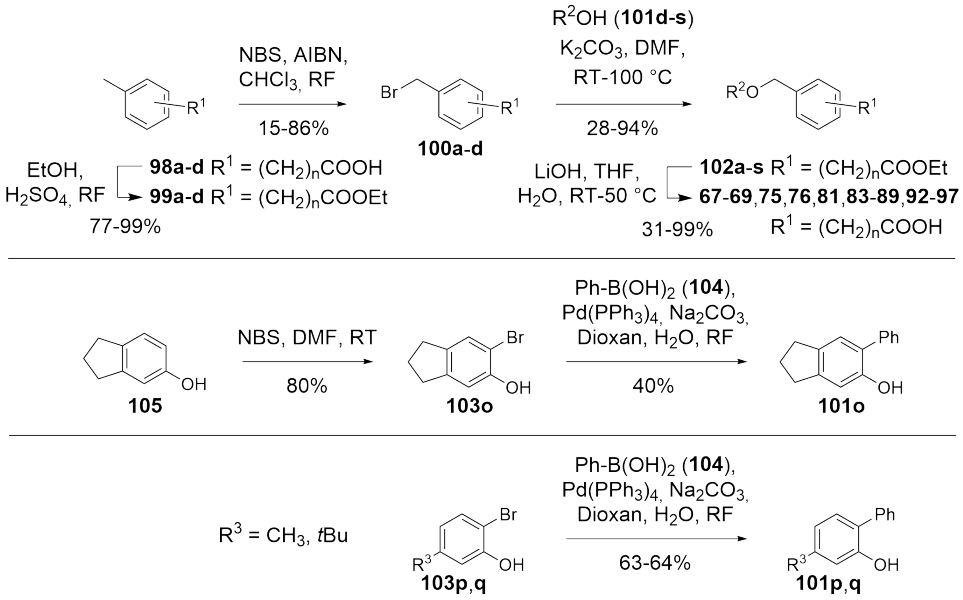


Abbildung 3.12: *(a) Chemische Strukturen von RXR-Literaturagonist Bexaroten (**38**), auf dessen Basis das Pharmakophormodell entwickelt wurde, sowie der in vitro bestätigten Treffer des Screenings (**48** und **49**). Molekulares Docking von (b) **48** (orange) sowie (c) der optimierten RXR-Agonisten **88** (orange) und **89** (magenta) in der LBD von hRXRα (PDB-ID: 4K6I[285]). Eine unbesetzte Untertasche zwischen Helices 5 und 11, die essentiell zur Ausbildung stabilisierender Kontakte mit Helix 12 scheint, wird durch **89** eingenommen. Dies könnte die höhere Aktivierungseffizienz im Vergleich zu **88** erklären. Der kristallisierte Ligand **38** (grau) ist zum Vergleich eingezeichnet und die Oberflächen der Bindetasche gemäß der Lipophilie eingefärbt (grün ist lipophil und rot hydrophil).*

sowie aromatische und π-Zentren als Merkmale berücksichtigte. Mithilfe dieses Computermodells wurde eine fokussierte Substanzbibliothek, die aus 6298 kommerziell verfügbaren Fettsäuremimetika bestand, gescreent und dabei 29 Primärtreffer erzielt. Davon wurden 15 Verbindungen manuell ausgewählt, die strukturell möglichst divers waren, und *in vitro* in subtypspezifischen RXR-Gal4-Hybrid-Reportergenassays für alle drei Subtypen (RXRα, RXRβ, RXRγ) evaluiert. Die Testsysteme wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln erklärt. Die Aktivität auf RXR von insgesamt vier Verbindungen wurde bei 10 µM bestätigt, von denen zwei aufgrund sehr niedriger Maximalaktivierungen unter 10% der Referenz und Positivkontrolle Bexaroten (**38**, 1 µM) aussortiert wurden. Die vollständige Charakterisierung der Dosis-Wirkungsbeziehung der verbleibenden Treffer **48** und **49** ergab eine ähnliche Potenz im niedrigen mikromolaren Bereich auf allen Subtypen (Abbildung 3.12a).
Um Potenzial für strukturelle Verbesserungen zu finden, wurde der Bindemodus von **48** durch molekulares Docking in die LBD von hRXRα (PDB-ID: 4K6I[285]) analysiert (Abbildung 3.12b). Dieses legte nahe, dass sich ein neutralisierendes kanonisches Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der Carboxylgruppe und Arg_{316} bildet, zeigte aber auch, dass die Methyleneinheit des kristallisierten Liganden Bexaroten (**38**) zu einer kleinen Untertasche deutet, die durch **48** nicht eingenommen wurde. Ebenso deutete die Dockingpose unausgeschöpften Raum im lipophilen Bereich des Moleküls am Indanrest an.

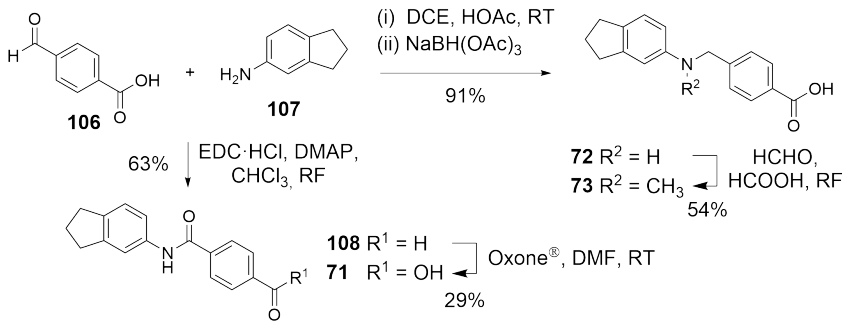
Um das ungenutzte Potenzial auszuschöpfen, wurde die SAR von **48** und **49** als RXR-Agonisten mit den Derivaten **66**-**97** untersucht. Die Analoga **48**, **49**, **66**, **77**-**80**, **82** und **90** waren kommerziell verfügbar. Die Synthese der übrigen Derivate wurde nach drei verschiedenen Syntheserouten bewerkstelligt (Schemata 3.1-3.3). In der Route A (Schema 3.1) wurden Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge und terminalem Tolylrest (**98a**-**d**) als Ethylester **99a**-**d** durch radikalische Substitution zu den Benzyl-



Schema 3.1: *Synthese von RXR-Agonisten nach Route A. n ist in Tabelle 3.1, R^2 in den Tabellen 3.3 und 3.4 definiert.*

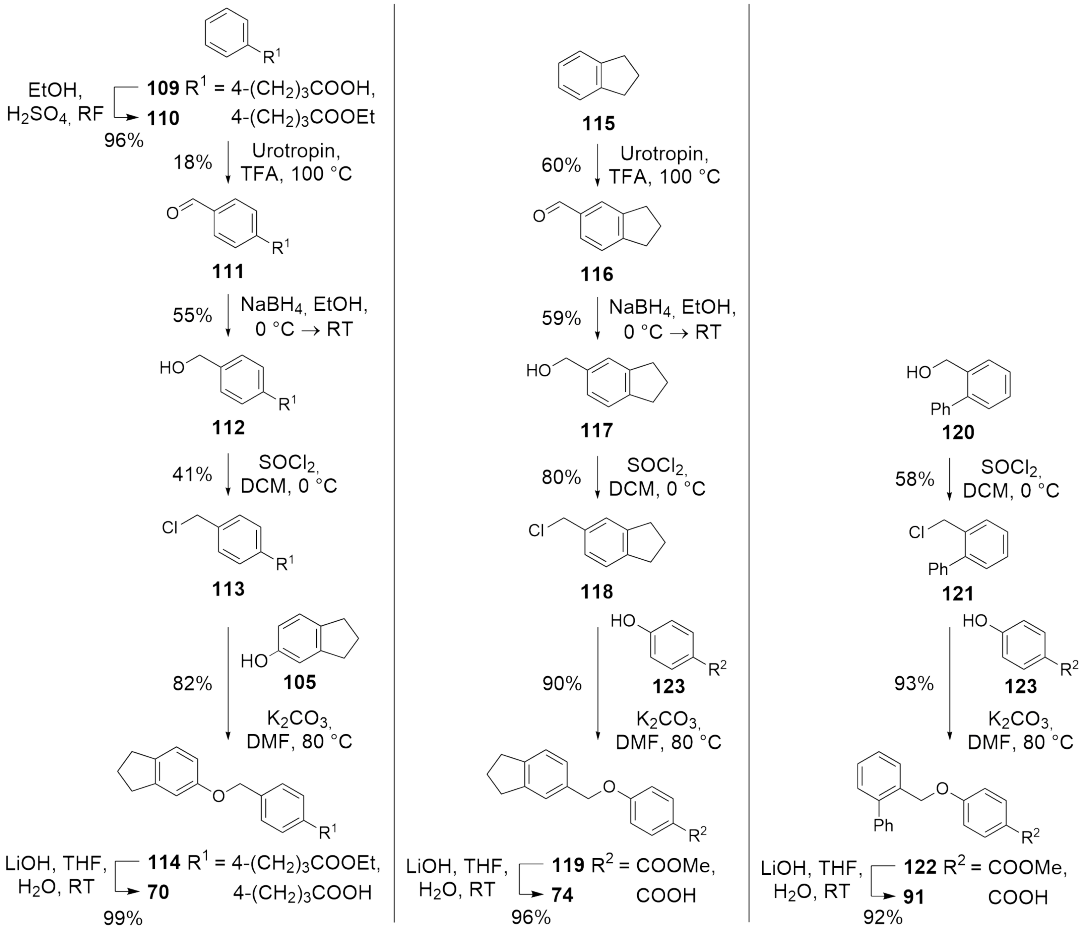
bromiden **100a**-**d** umgesetzt. In einer Williamson-Synthese reagierten diese anschließend mit den Phenolen **101d**-**s** zu den Ethern **102a**-**s**. Die dafür benötigten Phenole wurden entweder käuflich erworben oder durch Suzuki-Kupplung der entsprechenden 2-Bromphenole (**103o**-**q**) mit Phenylboronsäure (**104**) erhalten. Die Bromierung von 5-Indanol (**105**) lieferte 6-Brom-5-indanol (**103o**), während die restlichen 2-Bromphenole (**103p**,**q**) erstanden wurden. Basische Verseifung der Ester **102a**-**s** brachte schließlich die Testverbindungen **67**-**69**, **75**, **76**, **81**, **83**-**89** und **92**-**97** hervor.

4-Formylbenzoesäure (**106**) und 5-Aminoindan (**107**) reagierten nach Syntheseschema B in einer Amidsynthese zu **108** oder durch reduktive Aminierung zum sekundären Amin **72** (Schema 3.2). Der Aldehyd **108** wurde anschließend zu Carbonsäure **71** oxidiert und das Amin **72** in einer Eschweiler-Clarke-Reaktion methyliert (**73**).



Schema 3.2: *Synthese von RXR-Agonisten nach Route B*

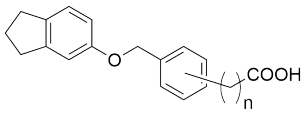
Für die Darstellung von **70**, **74** und **91** nach Syntheseroute C (Schema 3.3) wurde Carbonsäure **109** in den Ethylester **110** überführt. Die Arene **110** und **115** wurden in einer Duff-Reaktion formyliert und die resultierenden Aldehyde (**111**, **116**) zum entsprechenden Benzylalkohol (**112**, **117**) reduziert. Daraufhin wurden die Benzylalkohole **112**, **117** und **120** zu den Benzylchloriden **113**, **118** und **121** umgesetzt, welche für die Williamson-Ethersynthese mit 5-Indanol (**105**) zu **114** bzw. mit 4-Hydroxybenzoesäuremethylester (**123**) zu den „inversen" Ethern **119** und **122** verwendet wurden. Die ungeschützten Carbonsäuren **70**, **74** und **91** wurden durch alkalische Hydrolyse ihrer Ester (**114**, **119** und **122**) erhalten.



Schema 3.3: *Synthese von RXR-Agonisten nach Route C*

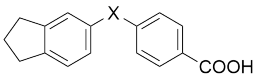
Für die systematische Untersuchung der SAR wurden die Leitstrukturen **48** und **49** in drei Teile gegliedert: saure Kopfgruppe, Linker und lipophiler Phenoxysubstituent. Zunächst wurde der Einfluss von Position und Länge der aliphatischen Carboxylkette im Gal4-Hybrid-Reportergenassay mit

Tabelle 3.1: *Leitstrukturoptimierung in der sauren Kopfgruppe. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid-Reportergenassay. *, Firefly-Luciferase-Inhibitor; Pos., Position; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf 1 µM **38**; tox., toxisch bei 30 µM; Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.*



#	Pos.	n	RXRα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRβ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
48	4	0	6,7 ± 0,6 (29 ± 3%)	8,8 ± 0,4 (28 ± 1%)	17 ± 2 (5,0 ± 0,2%)
66	3	0	*	*	*
67	2	0	> 30	> 30	> 30
68	4	1	13 ± 2 (47 ± 5%)	18 ± 1 (9,9 ± 0,1%)	22 ± 1 (8,8 ± 0,1%)
69	4	2	6,7 ± 0,5 (28 ± 1%)	10 ± 1 (29 ± 2%)	21 ± 1 (19 ± 1%)
70	4	3	tox.	tox.	tox.

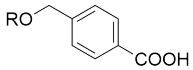
Tabelle 3.2: *Leitstrukturoptimierung in der Linkereinheit. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid-Reportergenassay. i.a., inaktiv bei 30 µM; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf 1 µM* ***38****; Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.*



#	X	RXRα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRβ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
48		6,7 ± 0,6 (29 ± 3%)	8,8 ± 0,4 (28 ± 1%)	17 ± 2 (5,0 ± 0,2%)
71		i.a.	i.a.	i.a.
72		> 30	> 30	> 30
73		10 ± 1 (22 ± 1%)	9,9 ± 0,4 (15 ± 1%)	30 ± 1 (8,5 ± 0,2%)
74		> 30	21 ± 1 (25 ± 1%)	> 30

den Derivaten **48** und **66**-**70** evaluiert (Tabelle 3.1). Von allen drei RXRs wurde nur die 4-Position toleriert, wo 4-Benzoesäure **48** eine ausgeglichene Potenz im niedrig mikromolaren Bereich aufwies trotz schwacher Maximalaktivierung auf RXRγ. Die Optimierung der Seitenkettenlänge in 4-Position erzielte neben Benzoesäure **48** auch 3-Phenylpropionsäure **69** mit vergleichbarer Potenz und diese war **48** (5%) hinsichtlich der Aktivierungseffizienz auf RXRγ (19%) leicht überlegen.
In der Linkereinheit, welche die hydrophile Kopfgruppe und den lipophilen Rest miteinander verknüpft, wurde der Ersatz des Ethers durch eine Amidgruppe (**71**) nicht toleriert (Tabelle 3.2). Während das sekundäre Amin **72** erheblich weniger potent war als **48**, konnte *N*-Methylamin **73** die Potenz zurückgewinnen, aber mit verringerter Maximalaktivierung im Vergleich zu **48**. Der inverse Ether **74** aktivierte zwar RXR, war allerdings zu toxisch, um eine vollständige Charakterisierung zu gewährleisten. Insgesamt erwies sich ein Ether (**48**) als geeignetster Linker für die RXR-Aktivierung.
Zur systematischen Evaluation der SAR der lipophilen Phenoxygruppe (Tabelle 3.3) wurde das Indan (**48**) zunächst durch das Minimalgerüst eines Phenylrests ersetzt (**75**). Dieses war immer noch dazu in der Lage, RXR mit geringer Potenz zu aktivieren. Die Einführung von Halogenatomen als 4-Substituenten (**76**-**78**) verbesserte die Potenz an RXR mit zunehmender Atomgröße. Eine ähnliche SAR wurde auch für 4-Alkylderivate mit zunehmender sterischer Beanspruchung von Ethyl- (**79**) über *iso*-Propyl- (**80**) hin zu *tert*-Butylsubstituenten (**49**) beobachtet. Alle Substituenten in 4-Position, insbesondere Alkylreste, reduzierten die Aktivierungseffizienz und Potenz auf RXRγ. Die Verlagerung eines Chlorsubstituenten von 4- (**76**) in 3-Position (**81**) verbesserte sowohl Potenz als auch Maximalaktivierung, welche durch das 2-Chlorderivat nochmals übertroffen wurden (**82**). Aus diesem Grund wurden weitere Substituenten in der bevorzugten 2-Position erforscht. Ein Fluoratom (**83**) an dieser Stelle schwächte die Potenz, wohingegen die Einführung kleiner lipophiler Gruppen wie Methyl (**84**) oder vor allem Trifluormethyl (**85**) zu einer merklichen Potenzsteigerung führte. Ein ähnlicher Trend war beim Methoxy- (**86**) und Trifluormethoxyderivat (**87**) zu erkennen. Letzteres verfügte über eine ausgeglichen hohe Potenz und Aktivierungseffizienz auf allen RXR-Subtypen. Die noch größeren *tert*-Butyl- (**88**) und Phenylsubstituenten (**89**) erzielten eine weitere Steigerung der Potenz mit nanomolarer Aktivität. Trotz hoher Potenz besaß **88** eine niedrige Maximalaktivierung (11-21%).

Tabelle 3.3: *Leitstrukturoptimierung in der Phenoxygruppe. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid-Reportergenassay. i.a., inaktiv bei 30 µM; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf 1 µM* ***38****; Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.*

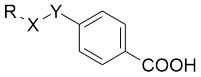


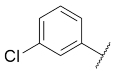
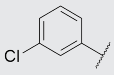
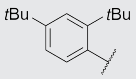
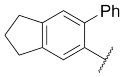
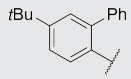
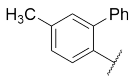
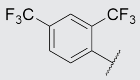
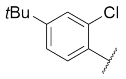
#	R	RXRα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRβ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
75	Ph	> 30	> 30	> 30
76	4-Cl-Ph	> 30	> 30	> 30
77	4-Br-Ph	40 ± 4 (21 ± 4%)	48 ± 10 (36 ± 15%)	> 30
78	4-I-Ph	24 ± 1 (19 ± 1%)	29 ± 2 (25 ± 2%)	> 30
79	4-Et-Ph	28 ± 3 (11 ± 1%)	35 ± 3 (7,4 ± 0,7%)	i.a.
80	4-*i*Pr-Ph	16 ± 1 (11 ± 1%)	16 ± 1 (9,5 ± 0,5%)	i.a.
49	4-*t*Bu-Ph	7,8 ± 2,4 (16 ± 4%)	8,9 ± 0,4 (15 ± 1%)	> 30
81	3-Cl-Ph	17 ± 1 (54 ± 3%)	20 ± 4 (26 ± 5%)	44 ± 16 (9,3 ± 3,4%)
82	2-Cl-Ph	9,9 ± 0,5 (58 ± 2%)	8,3 ± 0,8 (31 ± 2%)	> 30
83	2-F-Ph	> 30	> 30	> 30
84	2-CH_3-Ph	5,0 ± 0,1 (24 ± 1%)	8,6 ± 1,1 (27 ± 2%)	19 ± 1 (19 ± 1%)
85	2-CF_3-Ph	1,1 ± 0,1 (22 ± 1%)	2,1 ± 0,1 (22 ± 1%)	10 ± 1 (52 ± 1%)
86	2-OCH_3-Ph	29 ± 1 (21 ± 1%)	> 30	> 30
87	2-OCF_3-Ph	1,1 ± 0,1 (26 ± 1%)	1,9 ± 0,1 (18 ± 1%)	4,2 ± 0,1 (25 ± 1%)
88	2-*t*Bu-Ph	0,16 ± 0,01 (11 ± 1%)	0,37 ± 0,03 (12 ± 1%)	1,1 ± 0,1 (21 ± 1%)
89	(1,1'-Biphenyl)-2-yl	0,28 ± 0,01 (70 ± 1%)	0,31 ± 0,01 (44 ± 1%)	1,6 ± 0,1 (94 ± 4%)

Im Gegensatz dazu wurde **89** als RXR-Agonist mit ausgesprochen hoher Maximalaktivierung auf RXRγ (94%) identifiziert.
Das erworbene Wissen um die SAR jedes Molekülteils der Leitstrukturen wurde abschließend genutzt, um die vielversprechendsten Strukturelemente zu vereinen. Zunächst wurde angestrebt, das RXRγ-präferentielle Profil von **89** durch Invertieren des Etherlinkers in Bezug auf die Potenz auszubauen (Tabelle 3.4), da der 3-Chlor-substituierte inverse Ether (**90**) die Potenz und Aktivierungseffizienz an den drei Subtypen ausglich. Die erhaltene Verbindung (**91**) erzielte jedoch nicht die gewünschte Aktivität und war zudem toxisch. Sterisch anspruchsvolle, lipophile Reste wurden sowohl in 2- als auch 4-Position des Phenylethers bevorzugt (z.B. **49** und **89**) und deren Kombination bot Potenzial für weitere Verbesserungen der Aktivität an RXR. Das 2,4-Di-*tert*-butylderivat **92**, 6-Phenylindan **93**, 4-*tert*-Butyl-2-phenylanalog **94** und 4-Methyl-2-phenylderivat **95** brachten jedoch keine additiven Effekte hervor. Die Vermutung lag nahe, dass sterische Gründe dazu führten, dass diese voluminösen Kombinationen Aktivitätseinbußen verzeichneten. Deshalb wurden mit dem 2,4-Bis(trifluormethyl)- (**96**) und 4-*tert*-Butyl-2-chlorderivat (**97**) Kombinationen untersucht, die geringere sterische Ansprüche aufwiesen. Beide Verbindungen erreichten nicht die Potenz von **89**, aber **96** erwies sich als RXRα-Vollagonist und zeigte eine höhere Aktivierungseffizienz an RXRβ als das einfach substituierte 2-Trifluormethylderivat (**85**).

Um die Befunde der strikten SAR im Bereich des Phenylethers erklären zu können, wurde die Interaktion von **89** mit hRXRα (PDB-ID: 4K6I[285]) virtuell inspiziert (Abbildung 3.12c). Bemerkenswerterweise drang der zentrale Benzenring von **89** in eine lipophile Untertasche zwischen Helices 5 und 11 ein, wo er eine lipophile Oberfläche zur Wechselwirkung mit dem Netzwerk aus Leu_{436}, Leu_{451} und Leu_{455} bot. Der Bindemodus legte nahe, dass dadurch eine stabilisierende Interaktion

Tabelle 3.4: *Kombination struktureller Motive mit verbesserter Potenz. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid-Reportergenassay. max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf 1 µM* ***38****; tox., toxisch bei 30 µM; Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 3.*



#	X	Y	R	RXRα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRβ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	RXRγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
82	O	CH_2		17 ± 1 (54 ± 3%)	20 ± 4 (26 ± 5%)	44 ± 16 (9,3 ± 3,4%)
90	CH_2	O		27 ± 4 (27 ± 10%)	28 ± 4 (24 ± 11%)	29 ± 5 (29 ± 11%)
91	CH_2	O		> 30	> 30	tox.
92	O	CH_2		tox.	tox.	tox.
93	O	CH_2		> 30	> 30	> 30
94	O	CH_2		> 30	> 30	> 30
95	O	CH_2		> 30	> 30	tox.
96	O	CH_2		6,0 ± 0,9 (118 ± 22%)	4,3 ± 0,5 (66 ± 7%)	11 ± 2 (49 ± 8%)
97	O	CH_2		4,2 ± 0,1 (37 ± 1%)	5,3 ± 0,4 (36 ± 3%)	4,0 ± 1,0 (14 ± 2%)

mit Helix 12 zustande kommt, welche **88** vermissen lässt. Dies würde, ähnlich wie in früheren Untersuchungen gezeigt,[234,286] die niedrigere Aktivierungseffizienz von **88** verglichen mit **38** und **89** erklären. Insgesamt deckte die Dockingstudie einen potentiellen Bindemodus für **89** auf, der sich signifikant vom klassischen Rexinoid **38** unterscheidet und **89** als einen innovativen RXR-Liganden charakterisiert.

Für die weitere Charakterisierung dieses neuen RXR-Agonisten (**89**) wurden seine Eigenschaften *in vitro* untersucht. Zunächst wurde die Wechselwirkung von **89** mit der rekombinanten RXRα-LBD mittels ITC unter zellfreien Bedingungen studiert (Kooperation mit Leonie Gellrich, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, Abbildung siehe SI der Publikation in Kapitel 16.3). Die hohe Affinität von **89** zu RXRα wurde dabei mit einer Dissoziationskonstante K_d von 0,095 ± 0,005 µM bestätigt (n = 2), wobei sowohl enthalpische (ΔH = -25 kJ/mol) als auch entropische (ΔS = 49 J/(mol·K)) Effekte zur Bindungsstärke beitrugen. Die Diskrepanz zwischen K_d- und EC_{50}-Wert lässt sich durch das zelluläre Umfeld erklären, wo die Aktivität der Testsubstanzen auch von ihrer Zellpenetration und einem möglichen Abbau beeinflusst wird.

Unter zwölf eng verwandten nukleären Rezeptoren der NR1-Familie zeigte **89** eine verbesserte

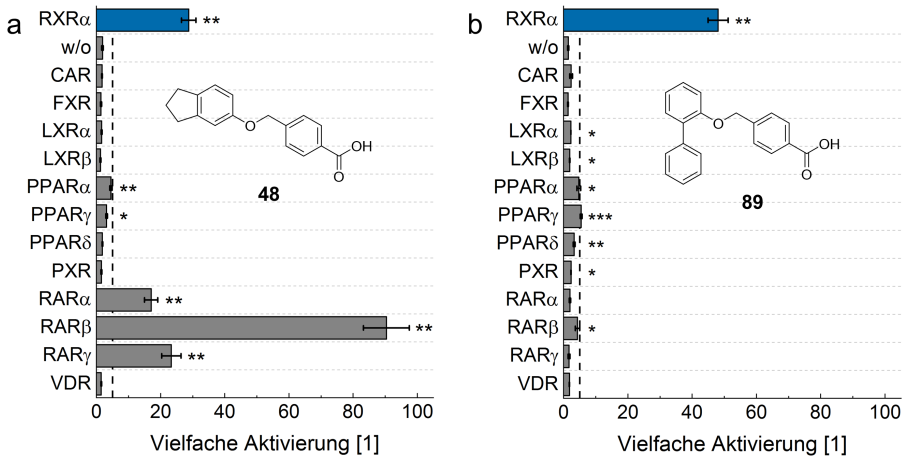


Abbildung 3.13: *Selektivitätsprofil von (a) Leitstruktur **48** und (b) optimierter Verbindung **89** bei 30 µM auf eng verwandten nukleären Rezeptoren im Reportergenassay. Ohne Cotransfektion eines NR-Gal4-Hybrids (w/o) wurde keine Aktivität beobachtet; Die vielfache Aktivierung mit 0,1% DMSO behandelter HEK293T Zellen ist dargestellt. Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, $n \geq 3$; * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ (einseitiger Studentscher t-Test gegen w/o-Kontrolle).*

RXR-Selektivität gegenüber der Leitstruktur **48** (Abbildung 3.13). Während **48** bei 30 µM hohe Aktivitäten an RARs aufwies, verursachte **89** in Gal4-Hybrid-Reportergenassays nur an RXR eine Transaktivierung. Darüber hinaus war **89** dem klassischen Rexinoid **38** hinsichtlich der wässrigen Löslichkeit (**89**: 1,3 µg/mL; **38**: 0,31 µg/mL), Hydrophilie (experimenteller logP **89**: 2,0; **38**: 5,2; siehe SI der Publikation) und reduzierter Zytotoxizität (siehe SI der Publikation) überlegen. Die Wirkung von **89** auf RXR-Heterodimere wurde in weniger artifiziellen Reportergenassays in der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T analysiert, die auf die intrinsisch vorhandenen nukleären Rezeptoren PPAR, LXR und RXR in voller Länge beruhen (Abbildung 3.14). Diese VL-Assays

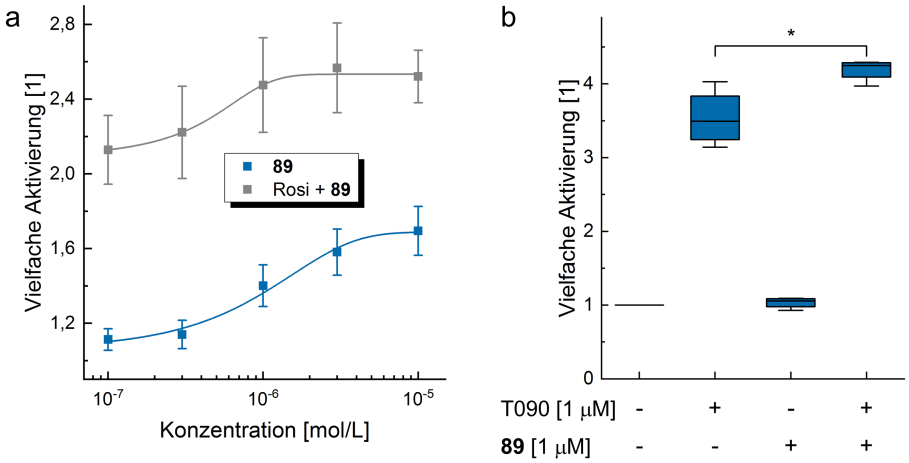


Abbildung 3.14: *Verbindung **89** aktivierte die permissiven RXR-Heterodimere mit PPAR (a) und LXR (b) in Volllängen-Reportergenassays. HEK293T Zellen wurden mit einem konstitutiven Renilla-Luciferase-Kontrollplasmid sowie einem Luciferase-Reporter unter der Kontrolle eines Response-Elements von PPARγ bzw. LXR transfiziert und über Nacht mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Inkubation mit RXR-Agonist **89** alleine genügte, um PPAR/RXR (a) zu aktivieren. Mit den jeweiligen Agonisten der Partnerrezeptoren Rosiglitazon (**32**, Rosi) und T0901317 (**11**, T090) wurden additive Effekte festgestellt; Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM; (a) $n = 3$; (b) $n = 4$; * $p < 0{,}05$; ** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$ (einseitiger Studentscher t-Test).*

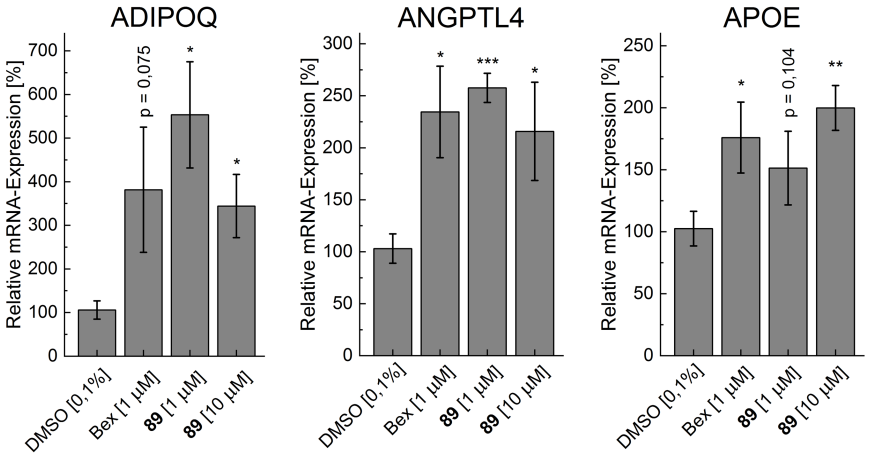


Abbildung 3.15: *Effekte der Negativkontrolle (0,1% DMSO), von Bexaroten (**38**) und **89** auf die Expression der RXR-Zielgene Adiponektin (ADIPOQ), ANGPTL4 und APOE. HepG2 Zellen wurden acht Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend geerntet. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA transkribiert und mit qRT-PCR analysiert. Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n = 4; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (einseitiger Studentscher t-Test gegen 0,1% DMSO).*

evaluieren die Aktivität der Testsubstanzen auf den permissiven Heterodimeren PPARγ/RXR und LXR/RXR mithilfe eines Firefly-Luciferase-Reporters. Der PPARγ/RXR-Assay wurde bereits in Kapitel 3.2 beschrieben. Analog zu diesem funktioniert auch der LXR/RXR-Reportergenassay, welcher einen Firefly-Luciferase-Reporter unter Kontrolle des ABCA1-RE nutzt (weitere experimentelle Details siehe SI der Publikation). Das Biphenylderivat **89** war dazu in der Lage, PPARγ/RXR mit einem EC_{50}-Wert von 1,0 ± 0,2 µM zu aktivieren und unterstützte die Aktivierung des permissiven Heterodimers durch PPARγ-Vollagonist Rosiglitazon (**32**, 1 µM) auf synergistische Weise (EC_{50} = 0,47 ± 0,12 µM). Die Aktivierung von LXR/RXR durch **89** bei 1 µM alleine erreichte keine statistische Signifikanz, jedoch besaß der RXR-Agonist **89** wiederum eine additive Wirkung mit dem LXR-Agonisten T0901317 (**11**, 1 µM).
Zudem wurden die RXR-modulatorischen Eigenschaften der optimierten Verbindung **89** auf der Ebene der mRNA-Expression RXR-regulierter Gene mithilfe qRT-PCR charakterisiert (Abbildung 3.15). Zu diesem Zweck wurden HepG2 Zellen mit **89** oder Bexaroten (**38**) als Positivkontrolle inkubiert und die mRNA gemäß dem Protokoll, das in Kapitel 3.2 beschrieben wurde, extrahiert. **89** induzierte die Expression von Adiponektin (ADIPOQ), ANGPTL4, sowie APOE, die von RXR und seinen Heterodimerpartnern PPAR und LXR reguliert werden. Dabei war die Amplitude des Effekts bei einer Konzentration von 1 und 10 µM vergleichbar mit Bexaroten (**38**, 1 µM). Vereint belegten die *in vitro* Experimente, dass **89** ein potenter und selektiver RXR-Agonist ist.

In dieser Studie wurde somit ein neuer RXR-Agonist entwickelt, der das klassische Rexinoid Bexaroten (**38**, Handelsname Targretin®) durch Senkung der Lipophilie, Steigerung der Löslichkeit und Reduktion der Toxizität übertrifft. Damit stellt der nanomolare Partialagonist **89** einen wichtigen Schritt dar, um die Probleme bisheriger RXR-Agonisten zu vermeiden. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten zudem, dass RXR-Modulatoren mit partialagonistischer Aktivität ein besseres Sicherheitsprofil unter Erhalt der therapeutischen Effizienz vorweisen.[27,234,235,286] Neben diesen vorteilhaften pharmakodynamischen Eigenschaften wies das Docking von **89** in die hRXRαLBD auf einen neuartigen Bindemodus hin, welcher dem neuen Ligandgerüst zu einem Durchbruch bei der Subtypselektivität verhelfen könnte. Die leichte RXRγ-Präferenz von **89** in Bezug auf die Aktivierungseffizienz birgt das

Potenzial, den ersten selektiven RXRγ-Agonisten zu entwickeln. Trotz seiner kleinen Molekülgröße (Molekulargewicht M = 304 g/mol) verfügt **89** über eine hohe Potenz, die durch weitere Optimierungen, insbesondere am terminalen Phenylrest, noch gesteigert werden könnte. Demzufolge trägt die Entwicklung des neuen Chemotyps, die in Partialagonist **89** gipfelte, dazu bei, das therapeutische Potenzial einer RXR-Modulation bei neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen zu erschließen.

3.4 Duale Liganden von PPARδ und FXR zur Behandlung nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH)

Die nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) ist eine mit dem metabolischen Syndrom assoziierte Leberentzündung, die durch Akkumulation von Fetten in der Leber kombiniert mit oxidativem Stress hervorgerufen wird.[106] Ohne therapeutische Intervention oder Änderung des Lebensstils kann sie zu einer Leberzirrhose und im fortgeschrittenen Verlauf zu einem Leberzellkarzinom führen.[106] Der semisynthetische FXR-Agonist OCA (**1**) steht kurz vor der Zulassung zur Behandlung von NASH und zeigt das therapeutische Potenzial FXRs auf.[4] Das Gallensäurederivat **1** erwies sich als antifibrotisch und antientzündlich wirksam.[100,288] Die Studienlage zur Wirkung von **1** auf die Lipid- und Glucosehomöostase ist nicht eindeutig, da eine Senkung von Plasmatriglyceridspiegeln und Insulinresistenz nur in manchen Studien belegt wurde.[100,107,288] Die Behandlung mit OCA (**1**) in einer klinischen Studie der Phase II wies eine verbesserte Leberhistologie auf, jedoch war die therapeutische Effizienz noch nicht zufriedenstellend.[107] Dies könnte durch die multifaktorielle Natur von NASH bedingt sein. Aus diesem Grund ist es ein vielversprechender Ansatz, die förderlichen Eigenschaften eines FXR-Agonismus mit einer weiteren molekularen Zielstruktur zu kombinieren.[255] Eine solche ist PPARδ, dessen Agonisten auch lipidsenkende Wirkungen zeigten, die jedoch über einen gänzlich anderen Mechanismus zustande kamen.[146,147] Die Aktivierung PPARδs induziert vor allem

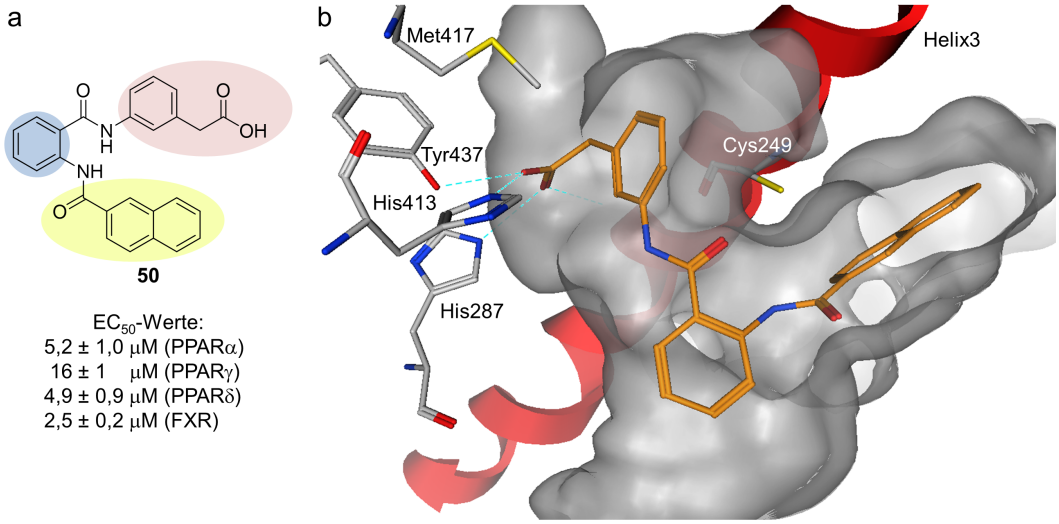
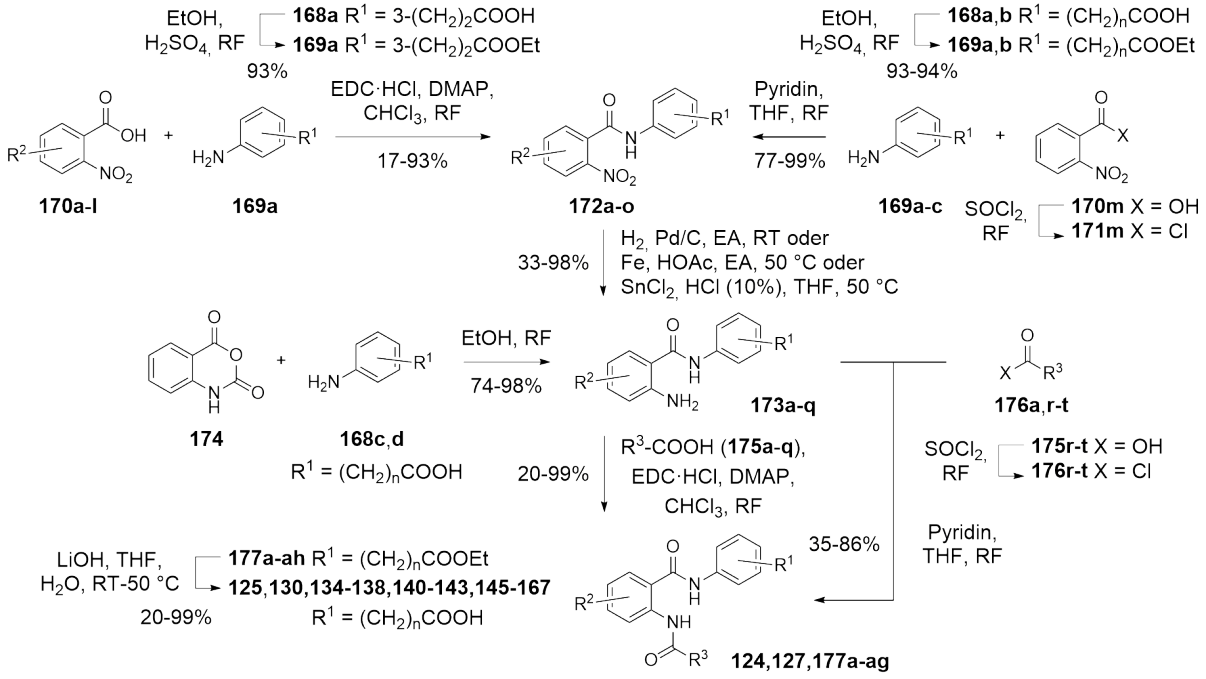


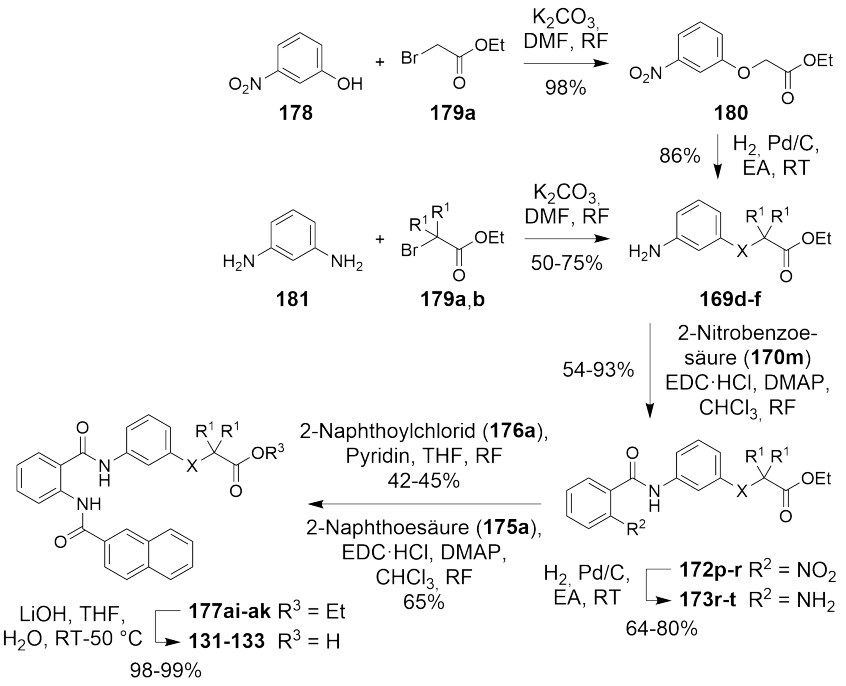
Abbildung 3.16: *(a) Leitstruktur **50** zur Entwicklung dualer PPARδ/FXR-Agonisten, die aus einer sauren Kopfgruppe (rot), einem Anthranilamidgrundgerüst (blau) und einer lipophilen Acylgruppe (gelb) aufgebaut ist. (b) Docking von **50** in die PPARδ-LBD (PDB-ID: 2J14[287]) zeigte unausgeschöpftes Interaktionspotenzial von Cys_{249} mit der lipophilen Naphthaleneinheit. Bearbeitet nach [256] und mit Genehmigung durch Elsevier.*

die Fettsäureoxidation im Muskel und senkt hepatische Triglyceridlevel durch periphere Effekte.[146,147] Durch die Interaktion mit zwei Zielstrukturen und unterschiedlichem Wirkort könnten duale Liganden eine verstärkte Wirksamkeit aufweisen. Ziel dieser Studie war es, duale Agonisten von PPARδ und FXR zu entwickeln und die Hypothese zu überprüfen, dass sich deren positive lipidsenkende und antientzündliche Eigenschaften kombinieren lassen und die multimodale therapeutische Strategie zu Synergien führt. Die aus dieser Untersuchung resultierenden Wirkstoffkandidaten zur Behandlung von NASH wurden erst in Deutschland[289] und anschließend in einem internationalen[290] Verfahren zum Patent angemeldet.

In vorausgehenden Studien des AK Prof. Schubert-Zsilavecz wurde das Anthranilamid **50** identifiziert, das eine moderate Aktivität an PPARδ und FXR verzeichnet (Abbildung 3.16a).[256,291,292] Es lässt sich in drei Regionen einordnen, die jeweils über eine Amidbindung miteinander verknüpft sind: eine hydrophile, saure Kopfeinheit, ein aromatisches Anthranilsäuregrundgerüst sowie eine lipophile Acylgruppe. Ausgehend von dieser Leitstruktur sollte durch systematische Untersuchung der SAR ein dualer PPARδ/FXR-Agonist mit gesteigerter Aktivität auf beiden Zielrezeptoren entwickelt werden. Dabei wurde besonderer Wert auf die Identifikation struktureller Motive gelegt, welche eine Selektivität gegenüber den Subtypen PPARα und PPARγ ermöglichen. Das molekulare Docking von **50** in die PPARδ-LBD (PDB-ID: 2J14[287]) zeigte, dass die Potenz des Naphthalens durch kleine lipophile Substituenten gesteigert werden könnte und mit Cys_{249} eine polare Aminosäure räumlich nahe liegt (Abbildung 3.16b).[256] Deren gezielte Interaktion mit einem polaren Rest am Naphthalen birgt das Potenzial, zwischen den PPAR-Subtypen zu diskriminieren. In Zusammenhang mit der Betreuung der Masterarbeit von Giuseppe Faudone (18 Derivate) wurden insgesamt 49 Moleküle synthetisiert, die hinsichtlich ihrer Potenz an PPARδ und FXR sowie der Selektivität gegenüber PPARα und PPARγ evaluiert wurden. Deren wichtigste Vertreter (**50**, **124**-**167**)

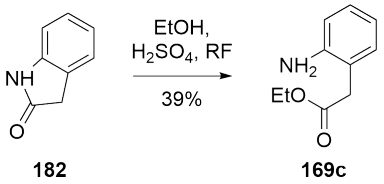


Schema 3.4: *Synthese von dualen PPARδ/FXR-Modulatoren nach Route A. n = 0-2; R^1 ist in Tabelle 3.5, R^2 in Tabelle 3.6 und R^3 durch Tabellen 3.7 sowie 3.8 definiert.*



Schema 3.5: *Synthese von dualen PPARδ/FXR-Modulatoren nach Route B. X = O, NH; R^1 = H, CH_3.*

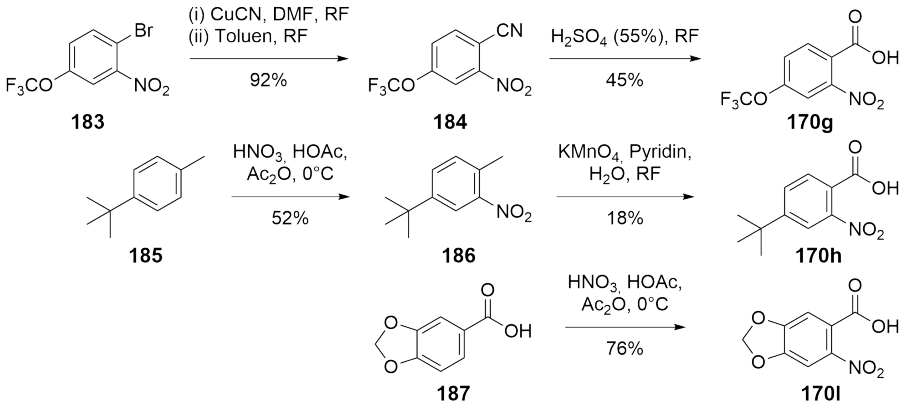
werden hier vorgestellt. Davon waren die Verbindungen **50**, **126**, **128** und **129** aus Vorarbeiten bereits vorhanden[256,291,292] und die restlichen Derivate wurden in einer fünfstufigen Synthese dargestellt (Route A, Schema 3.4). Carbonsäuren mit terminalem Anilinrest (**168a**,**b**) wurden in ihre Ethylester **169a**,**b** überführt. Anschließend reagierten die Ethylester **169a-c** entweder mit den 2-Nitrobenzoesäuren **170a-l** oder mit 2-Nitrobenzoylchlorid (**171m**) zu den 2-Nitrobenzamiden **172a-o**. 2-Nitrobenzoylchlorid (**171m**) wurde dabei aus 2-Nitrobenzoesäure (**170m**) dargestellt und direkt mit den Anilinen **169a-c** umgesetzt. Die Reduktion der 2-Nitrobenzamide (**172a-o**) lieferte die entsprechenden Anthranilamide **173a-q**, welche in einer parallelen Route aus der Reaktion von Isatosäureanhydrid (**174**) und den Anilinderivaten mit carboxylfunktionalisierter Seitenkette **168c**,**d** alternativ gewonnen werden konnten. Durch Knüpfen der zweiten Amidbindung mit den Carbonsäuren **175a-q**, 2-Naphthoylchlorid (**176a**) oder in ihr Säurechlorid (**176r-t**) überführten Carbonsäuren **175r-t** wurden die Zielverbindungen **124** und **127** sowie Ethylester **177a-ag** erhalten. Die Hydrolyse der Ester **177a-ah** brachte die Zielverbindungen **125**, **130**, **134-138**, **140-143** und **145-167** hervor.



Schema 3.6: *Synthese von Baustein **169c** durch Öffnung des Lactams.*

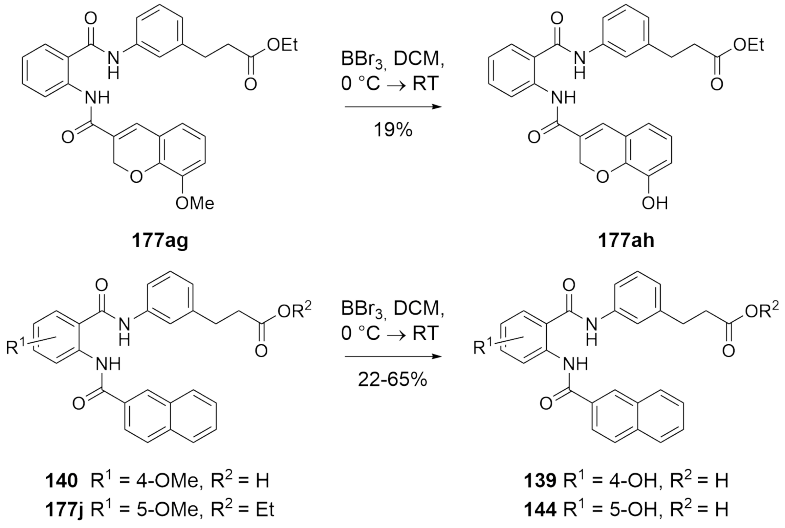
Verbindungen **131-133** mit Heteroatomen in der carboxylfunktionalisierten aliphatischen Seitenkette wurden gemäß der in Schema 3.5 dargestellten alternativen Syntheseroute B präpariert. Diese unterscheidet sich von Route A nur durch die Darstellung der Ethylester aliphatischer Carbonsäuren mit terminalem 3-Anilinrest (**169d-f**). Das 3-Aminophenoxyessigsäurederivat **169d** wurde durch die Williamson-Synthese von 3-Nitrophenol (**178**) und Bromessigsäureethylester (**179a**) zu Ether **180** und anschließender Reduktion erhalten. Die Analoga mit Stickstoff in der Seitenkette (**169e**,**f**) konnten durch die nukleophile Substitution der Bromessigsäureethylester **179a**,**b** mit 1,3-Phenylendiamin (**181**) isoliert werden.

Für eine Reihe von Derivaten waren entweder keine Edukte verfügbar oder die Synthesen der Routen

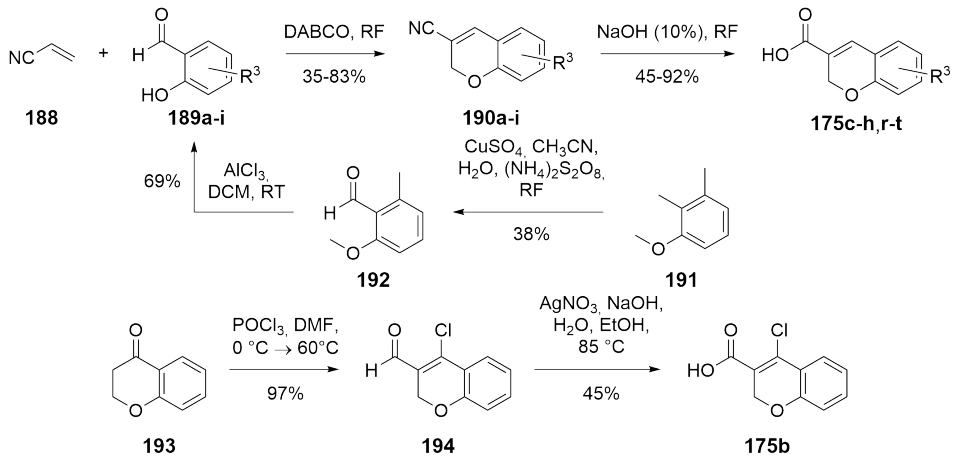


Schema 3.7: *Synthese 4-substituierter 2-Nitrobenzoesäuren*

A und B konnten nicht erfolgreich angewendet werden, sodass die entsprechenden Molekülbausteine synthetisiert wurden. Das Anilinderivat **169c** wurde durch Öffnung des Lactams **182** und Veresterung unter sauren Bedingungen synthetisiert (Schema 3.6). 2-Nitrobenzoesäuren **170g**,**h**,**l** waren nicht kommerziell erhältlich (Schema 3.7). 4-Trifluormethoxy-2-nitrobenzoesäure (**170g**) wurde ausgehend von Brombenzen **183** durch Rosenmund-von-Braun-Reaktion zu Benzonitril **184** und saurer Hydrolyse zu Benzoesäure **170g** hergestellt. Die Nitrierung von 4-*tert*-Butyltoluen (**185**) und die anschließende Oxidation des Toluens **186** lieferten Benzoesäure **170h**. Die Darstellung des 1,3-Benzodioxolderivats **170l** erfolgte ebenso durch Nitrierung von **187** in einer elektrophilen Substitutionsreaktion. Wirkstoffkandidaten mit Phenoleinheit (**139**, **144**, **158**) wurden ausgehend von den Methoxyaromaten **140**, **177j** und **177ag** synthetisiert (Schema 3.8). Die Ether **140**, **177j** und **177ag** wurden mit Bortribromid gespalten (**139**, **144**, **177ah**) und **177ah** gemäß Route A (Schema 3.4) hydrolysiert. 2*H*-Chromen-3-carbonsäuren (**175b**-**h**, **r**-**t**) als Ersatz der Naphthaleneinheit in **50** wurden nach Schema 3.9 hergestellt. Salicylaldehyde **189a**-**i** cyclisierten mit Acrylnitril (**188**) zu 2*H*-Chromen-3-nitrilen (**190a**-**i**), die durch alkalische Hydrolyse zu 2*H*-Chromen-3-carbonsäuren (**175c**-**h**, **r**-**t**) reagierten. Spezielle Synthesen waren für 6-Methylsalicylaldehyd (**189c**) und 4-Chlor-2*H*-chromen-3-carbonsäure (**175b**) erforderlich. Die Oxidation von 3-Methoxy-1,2-dimethylbenzen

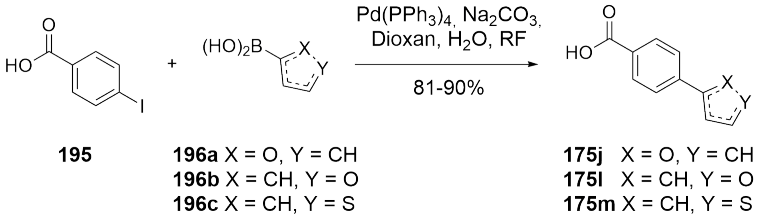


Schema 3.8: *Reduktion von Methoxyverbindungen zu Hydroxyderivaten*



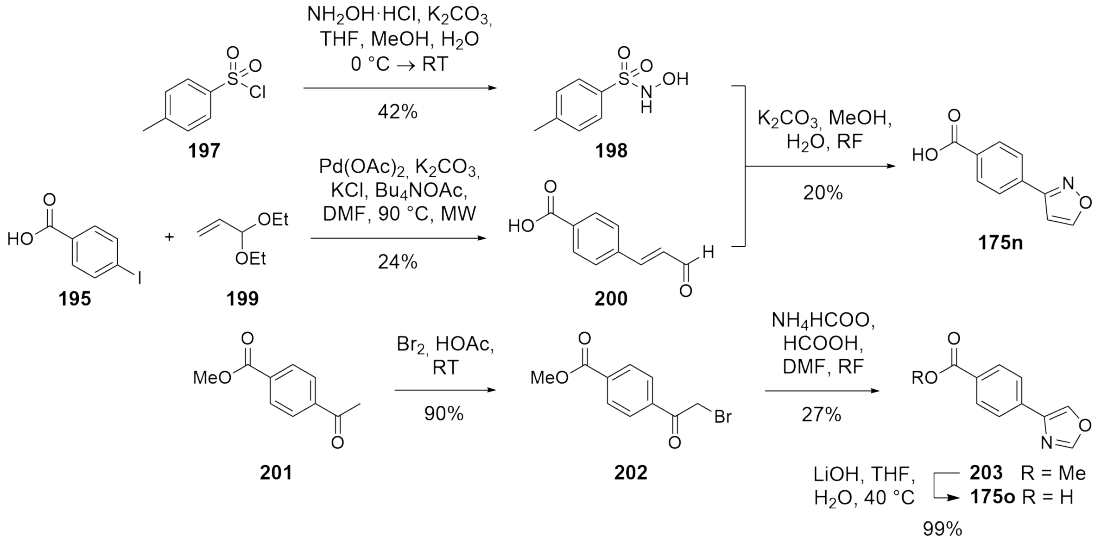
Schema 3.9: *Darstellung von 2H-Chromen-3-carbonsäuren. R^3 wird durch Tabelle 3.7 definiert.*

(**191**) zu Aldehyd **192** und Spaltung des Methylethers lieferte Salicylaldehyd **189c**. 4-Chlor-2*H*-chromen-3-carbaldehyd (**194**) wurde durch Umsetzung von 4-Chromanon (**193**) mit Phosphorylchlorid dargestellt und zu Carbonsäure **175b** oxidiert.



Schema 3.10: *Synthese 4-Heteroaryl-substituierter Benzoesäurederivate*

4-Furyl- und 4-Thienylbenzoesäuren (**175j,l,m**) waren die Produkte der Suzuki-Kupplung von 4-Iodbenzoesäure (**195**) mit den entsprechenden Boronsäuren **196a-c** (Schema 3.10). Die heteroaromatischen Systeme der 4-Arylbenzoesäuren **175n** und **175o** wurden cyclisiert (Schema 3.11). Dazu

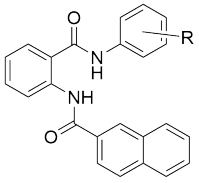


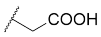
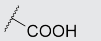
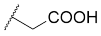
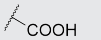
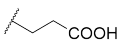
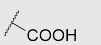
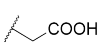
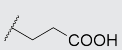
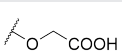
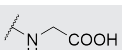
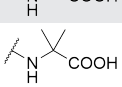
Schema 3.11: *Darstellung 4-(Is-)oxazol-substituierter Benzoesäuren*

wurde *p*-Tosylhydroxylamin (**198**) aus *p*-Tosylchlorid (**197**) hergestellt und parallel dazu 4-(Propenal-3-yl)benzoesäure (**200**) durch Heck-Reaktion von 4-Iodbenzoesäure (**195**) und Acroleindiethylacetal (**199**) synthetisiert. Die Umsetzung von **198** mit **200** lieferte 4-(Isoxazol-3-yl)benzoesäure (**175n**). 4-Acetylbenzoesäuremethylester (**201**) wurde bromiert (**202**), zu Oxazol **203** cyclisiert und der Ester **203** zu Carbonsäure **175o** hydrolysiert.

Alle Testsubstanzen wurden auf PPARs durch bereits beschriebene Gal4-Hybrid-Reportergenassays und auf FXR mit einem VL-Reportergenassay charakterisiert. In diesem Testsystem wurden HeLa Zellen transient mit vier Plasmiden transfiziert (Details siehe Patentantrag in Kapitel 16.4). Die vollständigen humanen nukleären Rezeptoren FXR und RXR wurden konstitutiv exprimiert, um eine Heterodimerisierung in Gang zu setzen. Darüber hinaus wurde die Firefly-Luciferase als Reportergen verwendet, welche unter der Kontrolle eines FXR-spezifischen RE (BSEP-Promotor) stand. Als Kontrollgen wurde die Renilla-Luciferase cotransfiziert, um Transfektionseffizienz und Toxizität zu überwachen. Die Luciferase-Aktivität nach Inkubation mit den Testsubstanzen über Nacht wurde mit dem Dual-Glo™-Kit (Promega) bestimmt und RLUs ermittelt. Als Positivkontrolle und zur Bestim-

Tabelle 3.5: *Leitstrukturoptimierung in der sauren Kopfgruppe. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid- (PPAR) und VL-Reportergenassay (FXR); *, toxisch bei 30 µM; Pos., Position; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf je 1 µM **64** (PPARα), **31** (PPARγ), **36** (PPARδ) und 3 µM **20** (FXR); tox., toxisch; Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 2.*

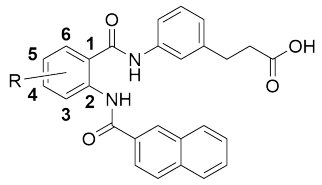


#	Pos.	R	PPARα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARδ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	FXR EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
50	3		5,2 ± 1,0 (37 ± 3%)	16 ± 1 (60 ± 3%)	4,9 ± 0,9 (34 ± 2%)	2,5 ± 0,2 (21 ± 1%)
124	2		tox.	tox.	tox.	6,8 ± 1,0 (44 ± 3%)
125	2		1,4 ± 0,1 (33 ± 1%)	1,7 ± 0,1 (74 ± 3%)	> 10*	9,2 ± 0,2 (31 ± 1%)
126	3		0,15 ± 0,01 (11 ± 1%)	1,6 ± 0,1 (71 ± 2%)	1,3 ± 0,1 (14 ± 1%)	1,5 ± 0,2 (37 ± 1%)
127	3		0,99 ± 0,19 (31 ± 2%)	2,6 ± 0,3 (81 ± 8%)	0,65 ± 0,03 (28 ± 1%)	2,6 ± 0,3 (20 ± 1%)
128	4		> 30	4,4 ± 0,9 (79 ± 9%)	> 30	1,0 ± 0,2 (23 ± 1%)
129	4		> 30	> 30	> 30	3,1 ± 0,3 (9,8 ± 0,4%)
130	4		> 30	> 30	> 30	2,1 ± 0,1 (21 ± 1%)
131	3		10 ± 1 (35 ± 2%)	19 ± 1 (47 ± 1%)	10 ± 1 (43 ± 4%)	5,1 ± 1,3 (19 ± 1%)
132	3		> 30	5,7 ± 0,1 (33 ± 1%)	3,5 ± 0,2 (83 ± 3%)	1,3 ± 0,1 (31 ± 1%)
133	3		1,7 ± 0,1 (71± 3%)	5,1 ± 0,9 (77 ± 6%)	3,6 ± 0,2 (42 ± 1%)	0,45 ± 0,01 (10 ± 1%)

mung der relativen Aktivität diente der synthetische FXR-Agonist GW4064 (**20**, 3 μM).
Zu Beginn der systematischen SAR-Untersuchungen wurde die acide Kopfgruppe variiert und der Einfluss von Position und Länge der aliphatischen Kette analysiert (Tabelle 3.5). Leitstruktur **50** zeigte eine moderate Potenz und partialagonistische Aktivität an allen drei PPAR-Subtypen und FXR ohne Selektivität gegenüber PPARα oder PPARγ. Das Verschieben der carboxylfunktionalisierten Seitenkette in 2-Position (**124**, **125**) mündete in verminderter Potenz auf PPARδ und FXR. Die Verkürzung der Kette um eine Methyleneinheit zu 3-Benzoesäure **126** erhöhte zwar die Potenz auf PPARδ und FXR, aber erzeugte eine Präferenz für PPARα mit nanomolarer Aktivität. Während 3-Phenylpropansäure **127** ebenso die Potenz auf PPARδ erhöhte und diese auf FXR erhielt, verzeichnete dieses Derivat unter den PPARs eine leichte Präferenz für PPARδ. Eine 4-Substitution (**128**-**130**) wurde von FXR hinsichtlich der Potenz gut toleriert, führte aber zu verminderter Aktivität auf PPARs, sodass sich Propionsäure **127** in 3-Position als Vorzugsgeometrie erwies. Anschließend wurde der Einfluss von polaren Heteroatomen analysiert, welche in die Seitenkette von **127** eingebracht wurden und die wässrige Löslichkeit durch Senkung der Lipophilie verbessern könnten. Phenoxyessigsäurederivat **131** führte auf allen untersuchten Rezeptoren nur zu geringen Aktivitätseinbußen, sodass ein polares Atom an dieser Stelle prinzipiell toleriert wurde. Eine Substitution mit Stickstoff (**132**) steigerte im Vergleich zu **127** die Potenz und Maximalaktivierung an FXR. Obwohl die Potenz an PPARδ leicht reduziert wurde, verbesserte *N*-Phenylglycin **132** die PPAR-Subtypselektivität, die sich in einem drastischen Potenzverlust an PPARα und deutlicher Reduktion der Aktivierungseffizienz an PPARγ äußerte. Die zusätzliche zweifache Methylierung in α-Position zur Carbonsäure (**133**) erhielt die Potenz an PPARδ unter Verlust an Aktivierungseffizienz und das günstige Selektivitätsprofil von **132** konnte in Verbindung **133** nicht beobachtet werden. Dennoch wies **133** eine Steigerung der Potenz an FXR auf.

Zur systematischen Untersuchung der SAR des Anthranilsäuregrundgerüsts wurde die Leitstruktur **50** durch das optimierte Propionsäurederivat **127** ersetzt (Tabelle 3.6). Zunächst wurde das bevorzugte Substitutionsmuster durch Einführung einer Methylgruppe ermittelt. In 3- (**134**) und 6-Position (**137**) führte dies zur Inaktivität auf FXR und einem Potenzverlust an PPARs. Das 4-Methylderivat **135** verbesserte die Potenz an PPARδ und FXR unter Erhalt der Maximalaktivierung sowie Potenz an PPARα und PPARγ, sodass unter den PPARs eine Präferenz für PPARδ resultierte. Wenngleich die Methylgruppe in 5-Position (**136**) zu Aktivitätsverlusten an FXR führte, wurde diese Geometrie von PPARδ bevorzugt. Aus diesem Grund wurden weitere Substituenten in den Positionen 4 und 5 evaluiert. Das 4-Chlor- (**138**) und polare 4-Hydroxyderivat (**139**) konnten die Potenz eines Methylrests (**135**) nicht erreichen. Eine signifikante Verbesserung des EC_{50}-Werts für PPARδ ergab sich durch Einführen einer Methoxygruppe in 4-Position (**140**) und erzielte eine Selektivität gegenüber PPARγ um den Faktor 20 bzw. 5 gegenüber PPARα. Auf FXR war eine leichte Reduktion der Potenz zu verzeichnen. Ein größerer Trifluormethoxyrest (**141**) konnte die hohe Potenz von **140** an PPARδ nicht aufrechterhalten. 4-*tert*-Butylderivat **142** stach durch seine besonders ausgeglichene Potenz an PPARδ und FXR hervor, während keine Anzeichen einer PPAR-Subtypselektivität beobachtet wurden. Unter den Derivaten mit Substitution in Position 5 war ein ähnlicher Trend zu erkennen. Ein Chloratom (**143**) oder eine Hydroxylgruppe (**144**) konnten keine Verbesserung der Potenz an PPARδ erreichen. Unterschiede im Vergleich zur 4-Position ergaben sich beim 5-Methoxy- (**145**) und 5-Trifluormethoxyderivat (**146**). Beide Substituenten begünstigten die Potenz an PPARα und die Aktivität an PPARδ profitierte vor allem durch den 5-Trifluormethoxyrest (**146**). Mit Ausnahme

Tabelle 3.6: *Leitstrukturoptimierung des Anthranilsäuregerüsts. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid- (PPAR) und VL-Reportergenassay (FXR); i.a., inaktiv bei 10 µM; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf je 1 µM* ***64*** *(PPARα),* ***31*** *(PPARγ),* ***36*** *(PPARδ) und 3 µM* ***20*** *(FXR); Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 2.*

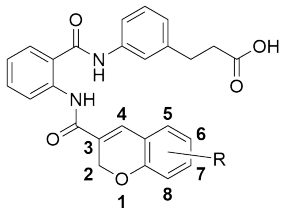


#	R	PPARα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARδ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	FXR EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
127	-	0,99 ± 0,19 (31 ± 2%)	2,6 ± 0,3 (81 ± 8%)	0,65 ± 0,03 (28 ± 1%)	2,6 ± 0,3 (20 ± 1%)
134	3-CH_3	6,2 ± 0,1 (31 ± 1%)	7,1 ± 1,3 (25 ± 3%)	2,7 ± 0,3 (30 ± 1%)	i.a.
135	4-CH_3	1,7 ± 0,2 (67 ± 3%)	1,4 ± 0,3 (88 ± 10%)	0,17 ± 0,02 (34 ± 1%)	1,5 ± 0,1 (21 ± 1%)
136	5-CH_3	0,80 ± 0,02 (25 ± 1%)	3,3 ± 0,1 (99 ± 1%)	0,21 ± 0,01 (14 ± 1%)	i.a.
137	6-CH_3	7,4 ± 0,4 (15 ± 1%)	11 ± 2 (11 ± 1%)	6,3 ± 0,9 (20 ± 1%)	i.a.
138	4-Cl	3,0 ± 0,1 (16 ± 1%)	1,4 ± 0,1 (26 ± 1%)	1,9 ± 0,2 (16 ± 1%)	i.a.
139	4-OH	5,3 ± 0,5 (54 ± 3%)	2,3 ± 0,3 (86 ± 7%)	2,4 ± 0,1 (34 ± 1%)	4,5 ± 0,1 (16 ± 1%)
140	4-OCH_3	0,30 ± 0,04 (43 ± 2%)	1,3 ± 0,1 (117 ± 3%)	0,060 ± 0,005 (32 ± 1%)	11 ± 3 (22 ± 1%)
141	4-OCF_3	1,1 ± 0,3 (31 ± 4%)	1,0 ± 0,2 (64 ± 2%)	0,38 ± 0,06 (30 ± 2%)	1,1 ± 0,1 (12 ± 1%)
142	4-*t*Bu	0,31 ± 0,08 (63 ± 8%)	0,96 ± 0,26 (64 ± 9%)	0,27 ± 0,02 (25 ± 1%)	0,30 ± 0,01 (13 ± 1%)
143	5-Cl	0,85 ± 0,18 (42 ± 2%)	5,5 ± 1,1 (112 ± 10%)	0,28 ± 0,03 (17 ± 1%)	2,6 ± 0,4 (12 ± 1%)
144	5-OH	8,9 ± 0,8 (28 ± 2%)	13 ± 1 (38 ± 2%)	10 ± 2 (24 ± 2%)	i.a.
145	5-OCH_3	0,23 ± 0,04 (53 ± 2%)	2,0 ± 0,1 (64 ± 1%)	0,36 ± 0,01 (23 ± 1%)	i.a.
146	5-OCF_3	0,21 ± 0,02 (54 ± 1%)	1,1 ± 0,2 (77 ± 7%)	0,10 ± 0,01 (19 ± 1%)	i.a.
147	4,5-Methylendioxy	0,46 ± 0,03 (25 ± 1%)	0,89 ± 0,32 (63 ± 8%)	0,44 ± 0,10 (31 ± 3%)	2,9 ± 0,6 (14 ± 1%)

des 5-Chloranalogons (**143**) waren jedoch alle 5-substituierten Verbindungen inaktiv an FXR. Die Kombination der für PPARδ günstigen 4-Methoxy- und 5-Trifluormethoxysubstituenten mittels des cyclischen 1,3-Dioxolderivats **147** zeigte keine additiven Effekte bezüglich der Potenz und Selektivität.

In der lipophilen Acylgruppe von **127** wurde der Naphthylrest durch 2*H*-Chromene ersetzt, die potentiell positive Eigenschaften mit sich brachten (Tabelle 3.7). Zum einen erlaubte deren Synthese die Möglichkeit, Substituenten systematisch einzuführen. Des Weiteren wird die weitgehend planare räumliche Anordnung von **127** teilweise aufgehoben, was die wässrige Löslichkeit gemeinsam mit

Tabelle 3.7: *Leitstrukturoptimierung des lipophilen Acylsubstituenten mit 2H-Chromenen. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid- (PPAR) und VL-Reportergenassay (FXR); i.a., inaktiv bei 10 µM; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf je 1 µM **64** (PPARα), **31** (PPARγ), **36** (PPARδ) und 3 µM **20** (FXR); Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 2.*

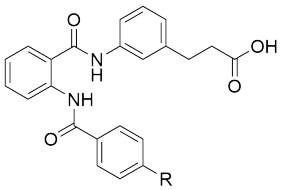


#	R	PPARα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARδ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	FXR EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
148	-	5,2 ± 0,8 (26 ± 3%)	7,7 ± 0,6 (28 ± 1%)	1,2 ± 0,1 (26 ± 1%)	4,1 ± 0,8 (14 ± 1%)
149	4-Cl	0,46 ± 0,03 (31 ± 1%)	2,3 ± 0,1 (38 ± 1%)	0,42 ± 0,01 (31 ± 1%)	11 ± 1 (16 ± 1%)
150	5-CH_3	0,83 ± 0,10 (24 ± 1%)	8,0 ± 0,8 (61 ± 6%)	0,67 ± 0,04 (27 ± 1%)	4,3 ± 0,3 (11 ± 1%)
151	6-CH_3	0,84 ± 0,10 (29 ± 1%)	5,0 ± 1,6 (155 ± 36%)	1,5 ± 0,2 (16 ± 1%)	5,4 ± 0,1 (12 ± 1%)
152	6-F	1,8 ± 0,6 (20 ± 1%)	4,6 ± 0,8 (72 ± 6%)	2,6 ± 0,8 (20 ± 3%)	i.a.
153	6-Cl	3,1 ± 0,4 (27 ± 2%)	3,0 ± 0,5 (22 ± 1%)	1,6 ± 0,5 (14 ± 2%)	i.a.
154	7-CH_3	3,4 ± 0,1 (38 ± 1%)	5,0 ± 1,6 (34 ± 6%)	1,1 ± 0,1 (30 ± 1%)	i.a.
155	8-CH_3	3,5 ± 0,2 (29 ± 1%)	3,1 ± 0,2 (40 ± 2%)	1,2 ± 0,4 (18 ± 2%)	i.a.
156	8-Cl	2,3 ± 0,1 (35 ± 1%)	2,4 ± 0,2 (32 ± 1%)	0,91 ± 0,36 (16 ± 2%)	i.a.
157	8-OCH_3	6,6 ± 1,8 (26 ± 5%)	23 ± 2 (37 ± 3%)	5,2 ± 0,2 (30 ± 1%)	2,8 ± 0,3 (14 ± 1%)
158	8-OH	> 30	7,9 ± 1,2 (27 ± 2%)	> 30	i.a.

dem Einführen des polaren Sauerstoffatoms erhöhen könnte. Das unsubstituierte Chromen **148** war auf allen vier Rezeptoren äquipotent zu Naphthalen **127** und reduzierte die Maximalaktivierung auf PPARγ. Die systematische Einführung von Halogenatomen und Methylgruppen (**149**-**156**) in den Positionen 5-8 zeigte jedoch eine flache SAR für PPARδ auf. Im Vergleich zu **148** verbesserten lediglich das 4-Chlor- (**149**) und 5-Methylderivat (**150**) die Potenz an PPARδ um den Faktor 2, wobei in beiden Fällen die leichte Präferenz gegenüber PPARα verloren wurde. Auf FXR konnte ebenso keine Optimierung erzielt werden, vielmehr führten die meisten Substituenten in den Positionen 6-8 zur gänzlichen Inaktivität im Testsystem. Eine Methoxygruppe in Position 8 (**157**) erhöhte die Potenz an FXR, reduzierte sie jedoch auf allen PPARs. Abgesehen von PPARγ wurde eine polare Hydroxylgruppe (**158**) an dieser Stelle nicht toleriert, obwohl das molekulare Docking in PPARδ eine mögliche Interaktion mit Cys_{249} nahelegte (siehe Abbildung 3.16b).

Da PPARδ/FXR-Agonisten mit 2*H*-Chromen nicht den erhofften Potenzgewinn herbeiführten, wurde nach Inspiration von einer Serie selektiver PPARδ-Agonisten[293] die SAR von 4-Arylbenzoylsubstituenten im hydrophoben Teil des Moleküls charakterisiert (Tabelle 3.8). Verglichen mit dem

Tabelle 3.8: *Leitstrukturoptimierung des lipophilen Acylsubstituenten mit Biarylen. Die Testung erfolgte im Gal4-Hybrid- (PPAR) und VL-Reportergenassay (FXR); i.a., inaktiv bei 10 µM; max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf je 1 µM* ***64*** *(PPARα),* ***31*** *(PPARγ),* ***36*** *(PPARδ) und 3 µM* ***20*** *(FXR); Alle Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert ± SEM, n ≥ 2.*



#	R	PPARα EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARγ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	PPARδ EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)	FXR EC_{50} [µM] (max. rel. Akt.)
159		> 30	1,6 ± 0,2 (68 ± 3%)	> 30	1,3 ± 0,2 (33 ± 1%)
160		1,8 ± 0,3 (22 ± 1%)	2,2 ± 0,1 (38 ± 1%)	0,20 ± 0,01 (43 ± 1%)	5,4 ± 0,1 (23 ± 1%)
161		1,5 ± 0,1 (27 ± 1%)	1,4 ± 0,2 (49 ± 4%)	0,64 ± 0,06 (35 ± 1%)	1,7 ± 0,4 (21 ± 1%)
162		1,6 ± 0,3 (31 ± 2%)	4,2 ± 0,9 (163 ± 21%)	2,4 ± 0,2 (57 ± 3%)	0,23 ± 0,01 (20 ± 1%)
163		1,7 ± 0,1 (32 ± 1%)	1,3 ± 0,2 (71 ± 4%)	1,6 ± 0,3 (59 ± 5%)	0,64 ± 0,11 (18 ± 1%)
164		8,0 ± 0,4 (11 ± 1%)	5,8 ± 0,8 (130 ± 10%)	5,6 ± 0,4 (29 ± 1%)	6,8 ± 0,6 (32 ± 1%)
165		20 ± 1 (36 ± 3%)	6,1 ± 1,0 (64 ± 5%)	12 ± 1 (52 ± 2%)	6,9 ± 0,3 (41 ± 1%)
166		> 30	5,3 ± 0,2 (70 ± 1%)	12 ± 1 (32 ± 3%)	15 ± 4 (53 ± 4%)
167		i.a.	i.a.	> 30	i.a.

Naphthalen **127** konnte Biphenyl **159** an Potenz und Aktivierungseffizienz auf FXR gewinnen, verlor jedoch merklich an Aktivität auf PPARδ. Ein 2-Furylrest (**160**) zeigte ein umgekehrtes Bild: er förderte die Potenz an PPARδ und verbesserte die Maximalaktivierung. Während **160** eine leicht reduzierte Potenz auf FXR aufwies, war es jeweils ca. zehnfach selektiv für PPARδ gegenüber den anderen beiden Subtypen. Das zum Benzen bioisostere Thiophen **161** mit dem Heteroatom in 2-Position war äquipotent zum Phenylderivat **159** bezüglich PPARγ und FXR, konnte allerdings die verlorene Potenz auf PPARα und PPARδ wiederherstellen. Der 3-Furyl- (**162**) und 3-Thienylrest (**163**) zeigten hingegen nanomolare Aktivität an FXR und höhere Maximalaktivierungen an PPARδ im Vergleich zu **127** bei in etwa gleicher Potenz. Infolgedessen sollten die von PPARδ begünstigte 2-Position des Sauerstoffatoms und die von FXR bevorzugte 3-Position in einem Molekül vereint werden. Da dies für das Chalkogen nicht unter Verlust der Aromatizität möglich ist, wurden das Isoxazol **164** und die Oxazole **165** und **166** synthetisiert. Die Einführung eines zweiten Heteroatoms führte zum Rückgang der Potenz auf allen Zielproteinen bis hin zur vollständigen Inaktivität beim Triazolderivat **167** mit drei Heteroatomen.
Weitere Molekülregionen, die noch nicht studiert wurden und Potenzial für eine Potenzsteigerung

bieten, sind die Amid- sowie die Biarylgruppe des lipophilen Acylsubstituenten. Die Amidbindungen könnten am Stickstoff alkyliert oder durch andere funktionelle Gruppen ersetzt werden. Allerdings zeigten die Vorarbeiten, welche zur Leitstruktur **50** führten, dass FXR keine dieser Modifikationen toleriert.[256,291] Außerdem könnten kleine Substituenten wie Methylreste oder Halogenatome an die Biaryle des Acylsubstituenten angebracht werden, um die SAR-Untersuchung sowohl am Benzen als auch am Heteroaromaten zu erweitern.

Zusammenfassend wurden bei der systematischen Analyse der SAR Strukturmotive gefunden, welche die Potenz auf PPARδ oder FXR verbesserten und im nächsten Schritt kombiniert werden können. Sie lassen sich besonders gut in der graphischen Darstellung der pEC_{50}-Werte identifizieren (Abbildung 3.17), die sich aus dem negativen dekadischen Logarithmus des EC_{50}-Werts ergeben. PPARδ bevorzugte besonders 4-Methyl- (**135**) und 4-Methoxygruppen (**140**) im Grundgerüst sowie 4-(2-Furyl)benzamid **160** in der lipophilen Acylgruppe. Die Potenz an FXR erfuhr insbesondere durch Glycin **132** oder 2-Methylalanin **133** als Kopfgruppe sowie dem 4-(3-Furyl)benzoylrest in der lipophilen Acylgruppe von **162** einen Gewinn. Für gesteigerte Aktivität an beiden Transkriptionsfaktoren sorgte ein 4-*tert*-Butylrest (**142**) im Anthranilsäuregerüst, welcher sich jedoch als nachteilig für die Selektivität über PPARα und PPARγ erwies. Das PPAR-Selektivitätsprofil aller dual aktiven PPARδ/FXR-Agonisten ist in Abbildung 3.18 dargestellt, wo die Quotienten der EC_{50}-Werte des jeweiligen Subtyps und PPARδ aufgetragen sind. Neben Verbindungen, die zwar eine Präferenz für PPARδ gegen einen anderen PPAR-Subtypen zeigten, aber weder die Potenz auf PPARδ noch auf FXR verbesserten (rot), kristallisierten sich vier Substanzen heraus, welche sowohl für die Potenz als auch die Selektivität vorteilhaft sind (grün). Dazu zählen das Glycin **132**, 4-Methylanthranilamid **135**, 4-Methoxyderivat **140**, sowie 4-(2-Furyl)benzamid **160**. Die vielversprechendsten Strukturmerkmale können als Nächstes in einem Molekül vereint werden, um einen dualen PPARδ/FXR-Partialagonisten zu erhalten, der zudem selektiv gegenüber den eng verwandten PPAR-Subtypen ist. Die hier beobachtete partialagonistische Natur der Wirkstoffkandidaten an PPARδ und FXR könnte eine neue Therapieoption realisieren, da klinische Erfahrungen zeigen, dass eine zu starke Aktivierung eines nukleären Rezeptors das Risiko einer metabolischen Dysbalance und dadurch erhebliche Nebenwirkungen birgt.[79,111,166]

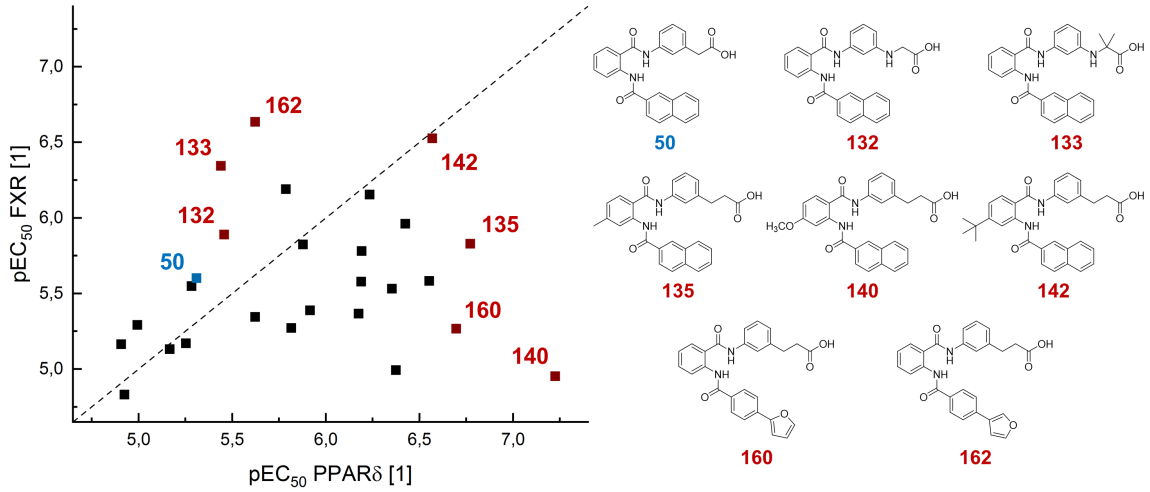


Abbildung 3.17: *Graphische Darstellung der pEC_{50}-Werte an PPARδ und FXR sowie chemische Strukturen einiger hervorgehobener dualer Modulatoren. Die Leitstruktur **50** ist blau und wichtige Verbesserungen auf einem oder beiden Zielproteinen rot markiert.*

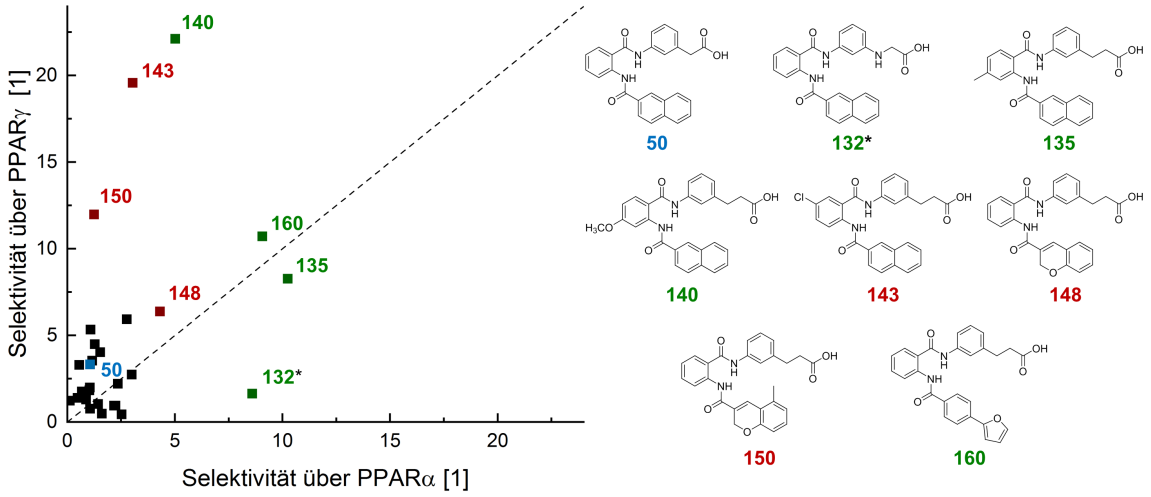


Abbildung 3.18: *PPAR-Selektivitätsprofil dual aktiver PPARδ/FXR-Agonisten sowie chemische Strukturen der Leitstruktur (**50**, blau) und ausgewählter, selektivitätsfördernder Substanzen, die keine (rot) oder eine Verbesserung (grün) der Potenz mit sich bringen. Die Selektivität ergibt sich aus dem Quotienten der EC_{50}-Werte vom jeweiligen Rezeptor und PPARδ. * EC_{50}-Wert auf PPARα konnte im gemessenen Konzentrationsbereich nicht ermittelt werden, sodass die Selektivität > 8 ist.*

Zudem muss ein nukleärer Rezeptor nicht mit maximaler Amplitude aktiviert werden, um einen therapeutischen Effekt zu gewährleisten.[294,295]
Im weiteren Verlauf dieses Forschungsprojekts sollen wichtige physikochemische und pharmakokinetische Eigenschaften der optimierten Verbindung wie Wasserlöslichkeit und metabolische Stabilität in Rattenlebermikrosomen bestimmt werden. Zudem soll die optimierte Verbindung durch geeignete *in vitro* pharmakologische Untersuchungen validiert und dafür die Aktivität an PPARδ und FXR auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Bei erfolgreichem Abschluss wird eine Pilot-Tierstudie durchgeführt, um pharmakokinetische Parameter des dualen Wirkstoffkandidaten zu bestimmen. Außerdem soll das Expressionsprofil von Genen, die durch PPARδ und FXR reguliert werden, aus dem Tiergewebe bestimmt werden. Sofern auch diese Studie von Erfolg gekrönt wird, wird im STAM™ Tiermodell von NASH evaluiert, ob sich die Hypothese bestätigt, dass FXR und PPARδ synergistisch zur Auflösung der Leberentzündung beitragen.

4 Zusammenfassung

Nukleäre Rezeptoren sind ligandengesteuerte Transkriptionsfaktoren und wichtige Stoffwechselregulatoren. Einige Mitglieder der Superfamilie von 48 humanen nukleären Rezeptoren stellen interessante Zielstrukturen zur Therapie von chronisch-entzündlichen Erkrankungen dar.[20,21] Physikalische, chemische oder mikrobiologische Noxen rufen einen körpereigenen Entzündungsprozess hervor, der nach Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands strebt.[19] Dabei reagiert das geschädigte Gewebe mit zahlreichen Vorgängen, die vaskuläre und zelluläre Reaktionen mit Immunantworten verknüpfen.[19] Bei andauernder Wirkung können Entzündungen jedoch in einen schädlichen Prozess umschlagen, sodass in solchen Fällen eine therapeutische Intervention Notwendigkeit erlangt.[19] Ziel dieser Arbeit war es, neue Liganden von nukleären Rezeptoren zu entwickeln, die nach antientzündlichem Potenzial ausgewählt wurden. Hierfür wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Im ersten wurden zugelassene niedermolekulare Arzneistoffe darauf untersucht, ob sie zusätzlich zu ihrer bekannten Hauptwirkung auch am Leber X Rezeptor (LXR) aktiv sind. LXR-agonistische Arzneistoffe würden helfen, neue Wirkstoffkandidaten zu entwickeln, die das therapeutische Potenzial von LXR bei Alzheimer und Multipler Sklerose (MS) aufklären oder erweitern können. Außerdem sollte wegen seiner fettsäuremimetischen Struktur evaluiert werden, ob das Urikosurikum Lesinurad (**47**) ein Ligand des Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptors (PPAR) γ ist und bewertet werden, ob sich dies positiv für eine entzündungshemmende Therapie der Gicht auswirkt. Ein weiterer Ansatz beschäftigte sich mit der Identifikation von Liganden nukleärer Rezeptoren mit bekannten antientzündlichen Effekten und der Leitstrukturoptimierung durch systematische Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung (SAR) hinsichtlich wichtiger Parameter wie Potenz, Maximalaktivierung und Selektivität. Dies betraf zum einen den Retinoid X Rezeptor (RXR), der als Zielstruktur zur Behandlung entzündlicher und neurodegenerativer Erkrankungen (Bsp. Alzheimer, MS) dient. Zum anderen sollten duale PPARδ/FXR-Agonisten als Wirkstoffkandidaten zur Pharmakotherapie der nichtalkoholischen Steatohepatitis (NASH) und verwandter entzündlich-metabolischer Erkrankungen entwickelt werden, da die alleinige Modulation des FXR zwar in klinischen Studien vielversprechende therapeutische Effekte auf die Lebererkrankung bewirkte, in der Effizienz aber noch nicht zufriedenstellte.[107]

Der nukleäre LXR spielt im Cholesterolhaushalt eine zentrale Rolle und ist darüber hinaus am Lipid- und Glucosestoffwechsel beteiligt.[30] In entsprechenden Tiermodellen lieferten LXR-Agonisten vielversprechende Ergebnisse bezüglich des Abbaus von β-Amyloidfibrillen bei Alzheimer und der Remyelinisierung bei MS.[50–52] Dabei demonstrierten die LXR-Liganden antiphlogistische Effekte durch Inhibition proentzündlicher Mediatoren und verdeutlichen das Potenzial LXRs bei neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen.[51,52] Wie in der Publikation „DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators“ beschrieben,[257] wurde eine Datenbank aus von der FDA zugelassenen Wirkstoffen virtuell mithilfe einer selbstorganisierenden Karte (SOM) gescreent und die Wirkstoffe ob ihres Potenzials evaluiert, LXR zu modulieren. Die als aktiv vorhergesagten RXR-Agonisten Alitretinoin (**37**) und Bexaroten (**38**) wurden dabei im Gal4-Hybrid-Reportergenassay als LXR-Modulatoren mit partialagonistischer Aktivierungseffizienz charakterisiert (EC_{50}-Werte: $1{,}1 \pm 0{,}2\,\mu M$ (LXRα) und $1{,}7 \pm 0{,}3\,\mu M$ (LXRβ) für Alitretinoin (**37**) sowie $0{,}20 \pm 0{,}02\,\mu M$ (LXRα) bzw. $0{,}43 \pm 0{,}04\,\mu M$ (LXRβ) für Bexaroten (**38**)). Während **37** und **38**

die synthetischen LXR-Vollagonisten GW3965 (**2**) und LXR-623 (**12**) partiell antagonisierten, führten sie mit dem endogenen Partialagonisten 22(*R*)-Hydroxycholesterol (**4**) zur additiven Aktivierung von LXR. Insbesondere die synergistische Wirkung mit dem endogenen Liganden **4** könnte eine klinische Relevanz haben, da Plasmaspiegel aus Zulassungsstudien der beiden Arzneistoffe in ähnlichen Konzentrationsbereichen wie die gemessenen EC_{50}-Werte lagen.[262,263] Die Aktivierung von LXR könnte damit außerdem die häufigsten Nebenwirkungen von **37** und **38** in klinischen Studien, Störungen des Cholesterol- und Fettstoffwechsels, zum Teil erklären. Die Charakterisierung von Alitretinoin (**37**) und Bexaroten (**38**) als duale LXR/RXR-Agonisten liefert darüber hinaus den Startpunkt zur Entwicklung neuer antientzündlicher Liganden des LXR und RXR.

Mit dem Urikosurikum Lesinurad (**47**) wurde ein weiterer zugelassener Arzneistoff entdeckt, der eine Nebenaktivität auf einem nukleären Rezeptor mit antientzündlichen Eigenschaften besitzt. PPARγ ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Fettgewebe, wo er die Lipidhomöostase und Adipozytendifferenzierung reguliert.[132] Motiviert durch seine Y-förmige und Fettsäuren nachahmende Struktur, die bekannten PPARγ-Liganden ähnelt,[265] wurde Lesinurad (**47**) als PPARγ-Partialagonist mit einem EC_{50}-Wert von 19 ± 1 µM in einem Gal4-Hybrid-Reportergenassay charakterisiert.[264] Unabhängig davon wurde die PPARγ-Modulation durch Lesinurad (**47**) auch in einem weniger artifiziellen Volllängen (VL)-Reportergenassay und die Bindung von **47** in PPARγ in zellfreier Umgebung mit isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) nachgewiesen. Im Unterschied zum synthetischen PPARγ-Vollagonisten Rosiglitazon (**32**) induzierte Lesinurad (**47**) nicht die Differenzierung muriner 3T3-L1 Zellen in reife Adipozyten und führte zu keiner Akkumulation von Fetttröpfchen in diesen Zellen. Die Analyse des Genexpressionsprofils der murinen Adipozyten nach Behandlung mit PPARγ-Agonisten mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) bestätigte, dass **47** im Gegensatz zu Rosiglitazon (**32**) keine adipogenen Zielgene induziert. In der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2 hingegen führte die Behandlung mit **47** zur Induktion des Angiopoetin-ähnlichen Proteins 4 (ANGPTL4, *engl.* angiopoietin-like protein 4), das an der Glucosehomöostase und dem Lipidstoffwechsel beteiligt ist und außerdem unter Verdacht steht, die Insulinsensitivität zu steigern.[275,276] Zudem wurde das als Regulator von Glucosespiegel und Fettsäureabbau fungierende Adiponektin tendenziell verstärkt exprimiert.[277] Die nähere Untersuchung des Mechanismus dieser selektiven Modulation von PPARγ-Zielgenen durch Lesinurad (**47**) auf Coaktivatorebene mit einem zeitaufgelösten Förster-Resonanzenergietransfer (TR-FRET)-Assaysystem stellte fest, dass **47** die Rekrutierung des Steroidrezeptor Coaktivators 1 (SRC-1, *engl.* steroid receptor coactivator 1) deutlich potenter vermittelt als die des cAMP Response-Element-Bindeprotein (CREB)-Bindeproteins (CBP, *engl.* CREB-binding protein), das für die Differenzierung von 3T3-L1 Adipozyten entscheidend war.[278–280] Die Interaktion mit SRC-1, das mit der Regulation des Energiehaushalts im Fettgewebe sowie der Thermogenese in Verbindung gebracht wurde,[281] sowie die Induktion von Genen, welche die Insulinsensitivität steigern könnten, legen nahe, dass vor allem Gichtpatienten mit metabolischen Komorbiditäten wie Diabetes mellitus Typ 2 (T2DM) und anderen Manifestationen des metabolischen Syndroms von einer Behandlung mit Lesinurad (**47**) profitieren könnten. Dabei lässt **47** adipogene Nebenwirkungen aus, die bei Vollagonisten wie Pioglitazon (**31**) oder Rosiglitazon (**32**) beobachtet wurden und für die Behandlung von Gicht nachteilig wären.[132] Damit könnte Lesinurad (**47**) als Startpunkt einer selektiven Optimierung von Nebenwirkungen (SOSA) dienen, welche die urikosurische Wirkung durch Inhibition des Harnsäuretransporters (URAT) 1 und organischen Anionentransporters (OAT) 4 reduzieren und einen potenten selektiven PPARγ-Modulator (sPPARγM) hervorbringen könnte, sodass die antientzündlichen Effekte in den Vordergrund rücken.

RXR ist ein weiterer Vertreter der nukleären Rezeptoren, dessen Aktivierung Entzündungsprozessen entgegenwirken kann.[25] Als universeller Heterodimerpartner nimmt er eine besondere Rolle unter den nukleären Rezeptoren ein und ist an vielen physiologischen Vorgängen beteiligt.[25] Synthetische Agonisten zeigten, dass die Aktivierung von RXR bei entzündlichen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder MS ein nutzbringender Therapieansatz sein könnte.[6,7] Jedoch verhindern die mangelnde Selektivität, Toxizität und nachteilige physikochemische Eigenschaften bisheriger RXR-Liganden die Erforschung des therapeutischen Potenzials von RXR bei inflammatorischen Prozessen.[209,226,233,257,282] Die Publikation „Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype“ beschäftigte sich mit der Identifikation eines neuen Ligandgerüsts von RXR-Agonisten, welches diese Probleme vermeiden soll.[283] Mithilfe eines Pharmakophormodells, das auf dem Bindemodus von Bexaroten (**38**) in RXRα beruht, wurde eine fokussierte Substanzbibliothek von kommerziell erhältlichen Fettsäuremimetika gescreent und dabei die Leitstrukturen **48** und **49** identifiziert (Abbildung 4.1). Diese wiesen eine moderate Potenz im ein- bis niedrig zweistelligen mikromolaren Bereich in Gal4-Hybrid-Reportergenassays auf. Die SAR wurde in jedem Molekülteil der Leitstrukturen, die sich in eine saure Kopfgruppe, eine Linkereinheit und einen lipophilen Phenoxysubstituenten unterteilen lassen, systematisch analysiert. Hierfür wurde eine vierstufige Syntheseroute etabliert und die biologische Aktivität der Zielverbindungen im Reportergenassay evaluiert. In der sauren Kopfgruppe erwies sich sowohl die Position der Carboxylgruppe am aromatischen Rest wie auch die Kettenlänge von Verbindung **48** als bereits optimal. Auch in der Linkergruppe konnte keine Verbesserung der Potenz erzielt werden. Im lipophilen Teil des Moleküls gelang es durch einen Phenylrest mit lipophilen Substituenten in 2- und 4-Position, die Potenz an RXR zu steigern. Eine Phenylgruppe in 2-Position (**89**) führte zu einem nanomolaren RXR-Agonisten, ließ sich aber nicht mit zusätzlichen Substituenten in 4-Position kombinieren. In Bezug auf die Maximalaktivierung begünstigt die optimierte Substanz **89** RXRγ, wo es nahezu vollagonistische Effekte zeigte. Die Untersuchung des vorhergesagten Bindemodus von Biphenylderivat **89** in der RXRα-Ligandbindedomäne lieferte eine mögliche Erklärung für die höhere Aktivierungseffizienz im Vergleich zu **48** und **49**. Biphenyl **89** nahm eine kleine unbesetzte Untertasche ein und könnte dadurch die von Helix 12 vermittelte Coaktivatorrekrutierung fördern. Die ausgiebige Charakterisierung *in vitro* zeigte, dass **89** unter zwölf eng verwandten nukleären Rezeptoren selektiv ist und RAR nicht aktiviert. Die optimierte Verbindung konnte in VL-Reportergenassays sowohl LXR/RXR- als auch PPAR/RXR-Heterodimere stimulieren sowie in HepG2 Zellen die Expression von Genen induzieren, die von RXR-Heterodimeren reguliert werden. Im Vergleich zum klassischen Rexinoid

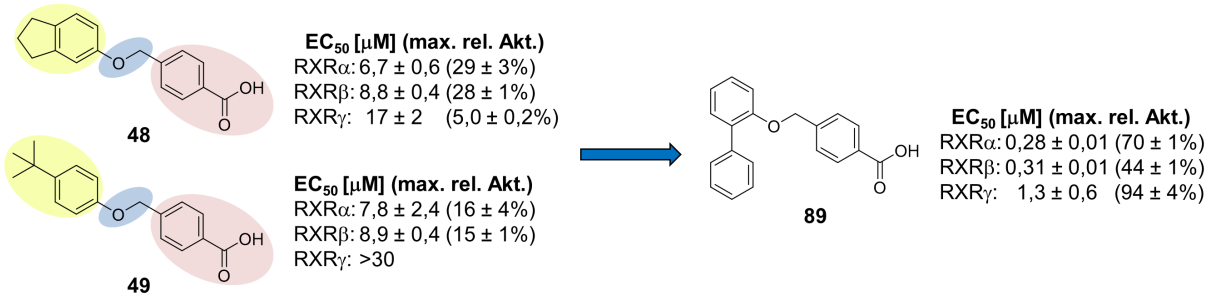


Abbildung 4.1: *Die Optimierung der Leitstrukturen **48** und **49** durch systematisches Erkunden der SAR der aciden Kopfgruppe (rot), des Linkers (blau) und des lipophilen Phenoxysubstituenten (gelb) lieferte den potenten RXR-Agonisten **89** mit RXRγ-präferentieller Maximalaktivierung. max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf 1 µM **38**.*

Bexaroten (**38**) war **89** besser wasserlöslich (**89**: 1,3 µg/mL; **38**: 0,31 µg/mL) und weniger lipophil (experimenteller logP **89**: 2,0; **38**: 5,2) bei reduzierter Toxizität. Damit könnte das neue Ligandgerüst die Nachteile bisheriger RXR-Agonisten überwinden. Das geringe Molekulargewicht (M = 304 g/mol) und die modulare Struktur bieten Raum für weitere Optimierungen. Vor allem das RXRγ-präferentielle Profil von **89** verkörpert das Potenzial, einen Durchbruch bei der RXR-Subtypselektivität zu erzielen. Da RXRγ der einzige Subtyp ist, der vorwiegend im Gehirn exprimiert wird,[25] könnte **89** zur Entwicklung von RXRγ-selektiven Agonisten beitragen, welche hauptsächlich im Gehirn wirken und das therapeutische Potenzial von RXR bei Entzündungsvorgängen und neurodegenerativen Erkrankungen aufklären könnten.

NASH ist eine weitere entzündliche Erkrankung, die durch die Modulation nukleärer Rezeptoren therapiert werden könnte. Die Vorstufe von NASH ist die nichtalkoholische Fettleber (NAFLD), eine reversible Lebersteatose, die durch mangelnde Bewegung und unausgewogene Ernährung hervorgerufen wird.[106] Durch oxidativen Stress kann sich die Leber infolge der NAFLD-Vorerkrankung entzünden und die resultierende NASH ohne Behandlung zu einer irreversiblen Zirrhose oder gar einem Leberzellkarzinom fortschreiten.[106] Obeticholsäure (**1**) ist ein FXR-Agonist, der mit seiner antifibrotischen, antientzündlichen, lipidsenkenden und die Insulinsensitivität erhöhenden Wirkung den therapeutischen Nutzen einer FXR-Aktivierung belegt.[100,288] Dies führte in klinischen Studien bei NASH zu einer verbesserten Leberhistologie, aber die therapeutische Wirksamkeit konnte noch nicht ausreichend belegt werden.[107] Zur Steigerung der therapeutischen Effizienz bei NASH stellt die Kombination von FXR mit einer weiteren Zielstruktur wie PPARδ einen möglichen Lösungsansatz dar. PPARδ fungiert als Hauptregulator der Fettsäureoxidation im Skelettmuskel.[146] Klinische Daten des dualen PPARα/δ-Agonisten Elafibranor (**26**) zeigten substantielle Verbesserungen der NASH-Histologie einschließlich der Auflösung der Steatohepatitis.[131] Anders als FXR, der hauptsächlich in der Leber wirkt, senkte die Aktivierung von PPARδ hepatische Triglyceridspiegel durch periphere Effekte.[147] Diese kommen durch erhöhte Fettsäureoxidation und Thermogenese in Fettgewebe und Skelettmuskel zustande, sodass der Gesamtenergieverbrauch ansteigt.[147] Um zu untersuchen, ob FXR und PPARδ über komplementäre Mechanismen zur Behandlung von NASH verfügen, sollte eine Klasse selektiver, dualer PPARδ/FXR-Agonisten entwickelt werden. Frühere Untersuchungen des Arbeitskreises brachten Leitstruktur **50** hervor, welche moderat an FXR und allen drei PPAR-Subtypen

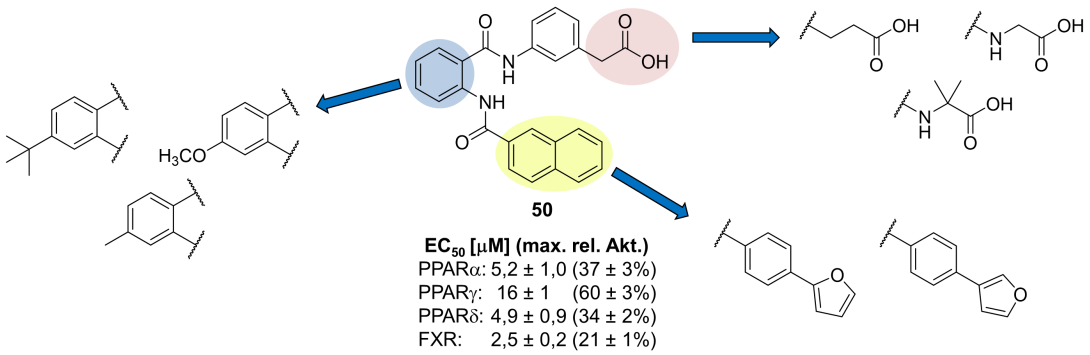


Abbildung 4.2: *Systematische SAR-Untersuchungen in der sauren Kopfgruppe (rot), dem Anthranilsäuregrundgerüst (blau) sowie dem lipophilen Acylsubstituenten (gelb) von Leitstruktur **50** führten zur Identifikation von strukturellen Motiven, welche die Potenz auf PPARδ und FXR und die Selektivität gegenüber PPARα und PPARγ erhöhten. max. rel. Akt., maximale relative Aktivierung in Bezug auf je 1 µM GW7647 (**64**, PPARα), Pioglitazon (**31**, PPARγ), L-165,041 (**36**, PPARδ) und 3 µM GW4064 (**20**, FXR).*

mit partialagonistischer Wirkung aktiv ist (Abbildung 4.2).[256] Ausgehend von dieser wurden weitere duale PPARδ/FXR-Agonisten nach einem fünfstufigem Syntheseschema entwickelt. Die Aktivität aller erhaltenen Derivate wurde auf PPARs im Gal4-Hybrid- sowie auf FXR im VL-Reportergenassay evaluiert. Im ersten Schritt der SAR-Untersuchungen wurde die Länge und Position der aliphatischen Seitenkette mit Carboxylfunktion optimiert. Dabei konnte 3-Propionsäurederivat **127** die Potenz auf PPARδ verbessern. Die Substitution der Propionsäure von **127** durch Glycin **132** erhöhte nicht nur die Maximalaktivierung auf PPARδ und Potenz auf FXR, sondern steigerte auch die Selektivität gegenüber PPARα und PPARγ. Die zusätzliche zweifache Methylierung von **132** in α-Position zur Carbonsäure (**133**) konnte dieses Selektivitätsprofil nicht erhalten, erwies sich jedoch günstig für die Potenz an FXR. Nach Wahl von **127** als verbesserte Leitstruktur für die weitere strukturelle Optimierung wurde das Substitutionsmuster am zentralen Anthranilsäuregerüst analysiert. An dieser Stelle ergab die Einführung von 4- und 5-Substituenten hochpotente PPARδ-Agonisten, während FXR nur Substituenten in 4-Position tolerierte. Mit einem EC_{50}-Wert von $0{,}060 \pm 0{,}005\,\mu M$ war 4-Methoxyderivat **140** an PPARδ die potenteste Verbindung dieser Serie. Neben der Methylgruppe (**135**) wurde auch die *tert*-Butylgruppe (**142**) als Strukturmotiv identifiziert, das die Potenz auf beiden Zielstrukturen verbesserte, wobei **142** ausgeglichene, nanomolare EC_{50}-Werte an allen PPARs und FXR erzielte. Das Ersetzen des Naphthylrests im lipophilen Teil des Moleküls durch 4-Arylbenzene ergab mit dem 2- (**160**) und 3-Furylderivat **162** eine vorteilhafte Maximalaktivierung auf PPARδ. Während die 2-Furylgruppe in **160** besonders die Potenz auf PPARδ steigerte, zeigte sich das 3-Furylderivat **162** umgekehrt besonders potent auf FXR. Insgesamt wurden in den SAR-Untersuchungen zahlreiche Motive gefunden, welche die Potenz und Selektivität des dualen PPARδ/FXR-Partialagonisten **50** verbesserten. Diese können in folgenden Experimenten in einem Molekül vereint werden, dessen pharmakologische Eigenschaften anschließend umfassend *in vitro* charakterisiert werden sollen. Zudem sind bei erfolgreichem Abschluss erste Tierstudien geplant, um die therapeutische Effizienz des Konzepts des dualen PPARδ/FXR-Partialagonismus bei NASH zu belegen.

In dieser Arbeit konnten Alitretinoin (**37**) und Bexaroten (**38**) als LXR-Partialagonisten sowie Lesinurad (**47**) als sPPARγM charakterisiert werden. Die zugelassenen Wirkstoffe können Leitstrukturen zur Entwicklung neuer LXR- oder dualer LXR/RXR-Agonisten beziehungsweise sPPARγMs mit antientzündlichem Potenzial bieten. Die Aktivierung von PPARγ könnte sich dabei vorteilhaft auf die Behandlung von Gicht auswirken, insbesondere bei Anwesenheit von metabolischen Komorbiditäten. Darüber hinaus wurde ein fortschrittliches RXR-Ligandgerüst identifiziert und durch Strukturoptimierung der nanomolare RXR-Partialagonist **89** entwickelt. Mit seinem RXRγ-präferentiellen Profil liefert er den Grundstein zur Entwicklung subtypselektiver RXR-Liganden, die helfen könnten, das therapeutische Potenzial von RXR bei entzündlichen und neurodegenerativen Erkrankungen zu erschließen. Zudem wurde eine Serie von dualen PPARδ/FXR-Agonisten erfolgreich entwickelt und in systematischen SAR-Untersuchungen der unterschiedlichen Molekülregionen Strukturmotive identifiziert, welche die Potenz auf den beiden Zielstrukturen sowie die Selektivität gegenüber PPARα und PPARγ erhöhen. Diese Untersuchungen liefern den Ausgangspunkt zur Kombination der Strukturmotive zu einem selektiven, potenten, dualen PPARδ/FXR-Liganden, der den Synergismus der beiden Zielstrukturen beweisen und als neuer Wirkstoffkandidat zur Behandlung von NASH hervorgehen könnte.

5 English Summary

Nuclear receptors are ligand-activated transcription factors that arouse the pharmaceutical interest as drug targets for inflammation and other indications. Inflammation is caused by physical, chemical, or microbiological noxae.[19] Following stimulation with such, the affected tissue reacts with numerous processes linking vascular and cellular responses which aim to recover the original state.[19] If long-lasting, though, inflammations can turn into detrimental processes demanding therapeutic intervention.[19] Hence, the aim of this thesis was the identification of novel nuclear receptor ligands as anti-inflammatory drug candidates.

Liver X receptors (LXRs) are target proteins with antiphlogistic potential against inflammatory and neurodegenerative diseases.[51,52] For the identification of novel LXR ligands, a database consisting of approved drugs was screened for interaction potential with LXR by means of a self-organizing map (SOM).[257] Subsequent *in vitro* characterization confirmed the retinoid X receptor (RXR) agonists alitretinoin (**37**) and bexarotene (**38**) as potent, dual LXRα/LXRβ agonists with moderate activation efficacy. While **37** and **38** partially antagonized synthetic full LXR agonists, they activated LXR in an additive manner with endogenous partial agonist 22(*R*)-hydroxycholesterol (**4**). The characterization of alitretinoin (**37**) and bexarotene (**38**) as dual LXR/RXR agonists does not only partially account for side-effects observed in clinical trials but could also offer the starting point for the development of novel anti-inflammatory LXR and dual LXR/RXR ligands.[262,263]

The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ is a nuclear receptor showing insulin-sensitizing and anti-inflammatory effects.[132] Based on its Y-shaped and fatty acid mimetic structure, the uricosuric agent lesinurad (**47**) could be characterized as partial PPARγ agonist *in vitro*.[264] In contrast to full PPAR agonists such as pioglitazone (**31**) or rosiglitazone (**32**), **47** did not induce the differentiation of murine 3T3-L1 cells into mature adipocytes but enhanced the expression of genes in the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 which could increase insulin sensitivity and fatty acid degradation. Consequently, lesinurad (**47**) proved to be a selective PPARγ modulator (sPPARγM) without adipogenic side-effects. This could affect its application in pharmacotherapy of gout. Particularly, patients with comorbidities such as type 2 diabetes mellitus or other diseases associated with the metabolic syndrome could benefit from **47** treatment. Future studies need to clarify the extent to which PPARγ is involved in the resolution of inflammation in gout.

Synthetic RXR agonists have a promising potential in the treatment of inflammatory neurodegenerative diseases which is hampered by unfavorable properties of these rexinoids.[226] The pharmacophore-based screening of a focused compound library of fatty acid mimetics identified a progressive RXR ligand scaffold. An appropriate synthetic strategy was established to optimize the lead structures in systematic structure-activity relationship (SAR) studies.[283] *In vitro* experiments, such as reporter gene assay systems and the quantification of target gene expression, proved the partial RXR-agonistic activity of the developed nanomolar compound **89**. Exhibiting high selectivity, improved aqueous solubility, and reduced lipophilicity and toxicity, **89** might avoid current RXR agonists' issues. Its RXRγ preference in terms of activation efficacy could point the way toward the development of subtype-selective ligands.

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is an inflammation of the liver that can emerge from a steatosis.[106] The multifactorial nature of NASH requires a high therapeutic efficiency which could be achieved by dual modulation of the farnesoid X receptor (FXR) and PPARδ. Both nuclear receptors have anti-inflammatory properties with different modes of action which could prove beneficial for NASH.[107,131] To validate this approach with synergistic potential, dual PPARδ/FXR agonists should be developed from a lead structure with moderate potency identified in the working groups' previous studies.[256] For this purpose, a five-step synthetic procedure for the preparation of derivatives was elaborated and the derivatives' activity on the target receptors was evaluated *in vitro*. Systematic SAR studies resulted in the characterization of structural motifs boosting the potency and activation efficacy on PPARδ and FXR. Furthermore, modifications could be identified granting selectivity over PPARα and PPARγ.[289,290] The combination of these beneficial groups and substituents could yield new drug candidates for the treatment of NASH.

Altogether, this work successfully identified numerous drugs and drug candidates as nuclear receptor ligands with anti-inflammatory potential. Alitretinoin (**37**) and bexarotene (**38**) could serve as lead structures for the development of novel selective LXR or dual LXR/RXR agonists. Lesinurad's (**47**) partial PPARγ-agonistic activity could trigger progress on gout therapy with metabolic comorbidities. Moreover, partial RXR and dual PPARδ/FXR agonist series were synthesized in the course of this work which might facilitate novel therapeutic options for neurodegenerative diseases or NASH.

6 Literatur

(1) Ottow, E.; Weinmann, H., *Nuclear Receptors as Drug Targets: A Historical Perspective of Modern Drug Discovery*; John Wiley & Sons, Ltd, S. 1–23.

(2) Evans, R. M.; Mangelsdorf, D. J. Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* **2014**, *157*, 255–266.

(3) Shi, Y. Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 440–445.

(4) Markham, A.; Keam, S. J. Obeticholic Acid: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76*, 1221–1226.

(5) Desai, J.; Steiger, S.; Anders, H.-J. Molecular Pathophysiology of Gout. *Trends in Molecular Medicine* **2017**, *23*, 756–768.

(6) Cramer, P. E.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Lee, C. Y. D.; Karlo, J. C.; Zinn, A. E.; Casali, B. T.; Restivo, J. L.; Goebel, W. D.; James, M. J.; Brunden, K. R.; Wilson, D. A.; Landreth, G. E. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **2012**, *335*, 1503–6.

(7) Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Oumesmar, B. N.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Evercooren, A. B.-V.; Chambon, P.; Ffrench-Constant, C.; Franklin, R. J. M. Retinoid X receptor γ signaling accelerates CNS remyelination. *Nature Neuroscience* **2011**, *14*, 45–53.

(8) Gronemeyer, H.; Gustafsson, J.-Å.; Laudet, V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nature Reviews Drug Discovery* **2004**, *3*, 950–964.

(9) Aranda, A.; Pascual, A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews* **2001**, *81*, 1269–1304.

(10) Treuter, E.; Venteclef, N. Transcriptional control of metabolic and inflammatory pathways by nuclear receptor SUMOylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **2011**, *1812*, 909–918.

(11) Van der Vaart, A.; Lorkowski, A.; Ma, N.; M. Gray, G. Computer Simulations of the Retinoid X Receptor: Conformational Dynamics and Allosteric Networks. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 731–741.

(12) Zhang, H.; Chen, L.; Chen, J.; Jiang, H.; Shen, X. Structural basis for retinoic x receptor repression on the tetramer. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 24593–24598.

(13) Egea, P. F.; Mitschler, A.; Moras, D. Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Molecular Endocrinology* **2002**, *16*, 987–97.

(14) Bourguet, W.; Germain, P.; Gronemeyer, H. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences* **2000**, *21*, 381–388.

(15) Moras, D.; Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **1998**, *10*, 384–391.

(16) Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schütz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P.; Evans, R. M. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell* **1995**, *83*, 835–839.

(17) Brélivet, Y.; Rochel, N.; Moras, D. Structural analysis of nuclear receptors: From isolated domains to integral proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2012**, *348*, 466–473.

(18) Nuclear Receptors Nomenclature Committee A Unified Nomenclature System for the Nuclear Receptor Superfamily. *Cell* **1999**, *97*, 161–163.

(19) Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Menzel, S.; Ruth, P., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart: 2013.

(20) Glass, C. K.; Ogawa, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* **2006**, *6*, 44–55.

(21) Huang, W.; Glass, C. K. Nuclear Receptors and Inflammation Control: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2010**, *30*, 1542–1549.

(22) Bensinger, S. J.; Tontonoz, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* **2008**, *454*, 470–477.

(23) Wang, K.; Wan, Y.-J. Y. Nuclear Receptors and Inflammatory Diseases. *Experimental Biology and Medicine* **2008**, *233*, 496–506.

(24) Rodríguez-Calvo, R.; Tajes, M.; Vázquez-Carrera, M. The NR4A subfamily of nuclear receptors: potential new therapeutic targets for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **2017**, *21*, 291–304.

(25) Germain, P.; Chambon, P.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Lazar, M. A.; Leid, M.; De Lera, A. R.; Lotan, R.; Mangelsdorf, D. J.; Gronemeyer, H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 760–72.

(26) Ijpenberg, A.; Tan, N. S.; Gelman, L.; Kersten, S.; Seydoux, J.; Xu, J.; Metzger, D.; Canaple, L.; Chambon, P.; Wahli, W.; Desvergne, B. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *The EMBO Journal* **2004**, *23*, 2083–2091.

(27) Yamada, S.; Kakuta, H. Retinoid X receptor ligands: a patent review (2007 – 2013). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2014**, *24*, 443–452.

(28) Apfel, R.; Benbrook, D.; Lernhardt, E.; Ortiz, M. A.; Salbert, G.; Pfahl, M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Molecular and Cellular Biology* **1994**, *14*, 7025–35.

(29) Shinar, D. M.; Endo, N.; Rutledge, S. J.; Vogel, R.; Rodan, G. A.; Schmidt, A. NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. *Gene* **1994**, *147*, 273–276.

(30) Hong, C.; Tontonoz, P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, *13*, 433–444.

(31) Baranowski, M. Biological role of liver X receptors. *Journal of Physiology and Pharmacology* **2008**, *59 Suppl 7*, 31–55.

(32) Schulman, I. G. Liver X receptors link lipid metabolism and inflammation. *FEBS Letters* **2017**, *591*, 2978–2991.

(33) Korach-André, M.; Gustafsson, J.-Å. Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomolecular Concepts* **2015**, *6*, 177–190.

(34) Bischoff, E. D.; Daige, C. L.; Petrowski, M.; Dedman, H.; Pattison, J.; Juliano, J.; Li, A. C.; Schulman, I. G. Non-redundant roles for LXRα and LXRβ in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Journal of Lipid Research* **2010**, *51*, 900–6.

(35) Janowski, B. A.; Willy, P. J.; Devi, T. R.; Falck, J. R.; Mangelsdorf, D. J. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXRα. *Nature* **1996**, *383*, 728–731.

(36) Repa, J. J.; Turley, S. D.; Lobaccaro, J. A.; Medina, J.; Li, L.; Lustig, K.; Shan, B.; Heyman, R. A.; Dietschy, J. M.; Mangelsdorf, D. J. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* **2000**, *289*, 1524–9.

(37) Yu, L.; York, J.; von Bergmann, K.; Lutjohann, D.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 15565–70.

(38) Wang, N.; Tall, A. R. Regulation and Mechanisms of ATP-Binding Cassette Transporter A1-Mediated Cellular Cholesterol Efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2003**, *23*, 1178–1184.

(39) Zanotti, I.; Pedrelli, M.; Potì, F.; Stomeo, G.; Gomaraschi, M.; Calabresi, L.; Bernini, F. Macrophage, But Not Systemic, Apolipoprotein E Is Necessary for Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2011**, *31*, 74–80.

(40) Zelcer, N.; Hong, C.; Boyadjian, R.; Tontonoz, P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* **2009**, *325*, 100–4.

(41) Repa, J. J.; Berge, K. E.; Pomajzl, C.; Richardson, J. A.; Hobbs, H.; Mangelsdorf, D. J. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors α and β. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 18793–800.

(42) Peet, D. J.; Turley, S. D.; Ma, W.; Janowski, B. A.; Lobaccaro, J.-M. A.; Hammer, R. E.; Mangelsdorf, D. J. Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXRα. *Cell* **1998**, *93*, 693–704.

(43) Repa, J. J.; Liang, G.; Ou, J.; Bashmakov, Y.; Lobaccaro, J. M.; Shimomura, I.; Shan, B.; Brown, M. S.; Goldstein, J. L.; Mangelsdorf, D. J. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRα and LXRβ. *Genes & Development* **2000**, *14*, 2819–30.

(44) Joseph, S. B.; Laffitte, B. A.; Patel, P. H.; Watson, M. A.; Matsukuma, K. E.; Walczak, R.; Collins, J. L.; Osborne, T. F.; Tontonoz, P. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 11019–25.

(45) Laffitte, B. A.; Chao, L. C.; Li, J.; Walczak, R.; Hummasti, S.; Joseph, S. B.; Castrillo, A.; Wilpitz, D. C.; Mangelsdorf, D. J.; Collins, J. L.; Saez, E.; Tontonoz, P. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *PNAS* **2003**, *100*, 5419–24.

(46) Beaven, S. W.; Matveyenko, A.; Wroblewski, K.; Chao, L.; Wilpitz, D.; Hsu, T. W.; Lentz, J.; Drew, B.; Hevener, A. L.; Tontonoz, P. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metabolism* **2013**, *18*, 106–17.

(47) Joseph, S. B. *et al*. Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *PNAS* **2002**, *99*, 7604–9.

(48) Saunders, A. M.; Strittmatter, W. J.; Schmechel, D.; George-Hyslop, P. H.; Pericak-Vance, M. A.; Joo, S. H.; Rosi, B. L.; Gusella, J. F.; Crapper-MacLachlan, D. R.; Alberts, M. J.; Hulette, C.; Crain, B.; Goldgaber, D.; Roses, A. D. Association of apolipoprotein E allele ϵ 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* **1993**, *43*, 1467–72.

(49) Chawla, A.; Boisvert, W. A.; Lee, C.-H.; Laffitte, B. A.; Barak, Y.; Joseph, S. B.; Liao, D.; Nagy, L.; Edwards, P. A.; Curtiss, L. K.; Evans, R. M.; Tontonoz, P. A PPARγ-LXR-ABCA1 Pathway in Macrophages Is Involved in Cholesterol Efflux and Atherogenesis. *Molecular Cell* **2001**, *7*, 161–171.

(50) Jiang, Q. *et al*. ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβ. *Neuron* **2008**, *58*, 681–693.

(51) Bogie, J. F. J.; Timmermans, S.; Huynh-Thu, V. A.; Irrthum, A.; Smeets, H. J. M.; Gustafsson, J.-Å.; Steffensen, K. R.; Mulder, M.; Stinissen, P.; Hellings, N.; Hendriks, J. J. A. Myelin-Derived Lipids Modulate Macrophage Activity by Liver X Receptor Activation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44998.

(52) Meffre, D.; Shackleford, G.; Hichor, M.; Gorgievski, V.; Tzavara, E. T.; Trousson, A.; Ghoumari, A. M.; Deboux, C.; Nait Oumesmar, B.; Liere, P.; Schumacher, M.; Baulieu, E.-E.; Charbonnier, F.; Grenier, J.; Massaad, C. Liver X receptors α and β promote myelination and remyelination in the cerebellum. *PNAS* **2015**, *112*, 7587–92.

(53) Joseph, S. B.; Castrillo, A.; Laffitte, B. A.; Mangelsdorf, D. J.; Tontonoz, P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nature Medicine* **2003**, *9*, 213–219.

(54) Castrillo, A.; Joseph, S. B.; Marathe, C.; Mangelsdorf, D. J.; Tontonoz, P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 10443–9.

(55) Castrillo, A.; Joseph, S. B.; Vaidya, S. A.; Haberland, M.; Fogelman, A. M.; Cheng, G.; Tontonoz, P. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Molecular Cell* **2003**, *12*, 805–16.

(56) Joseph, S. B.; Bradley, M. N.; Castrillo, A.; Bruhn, K. W.; Mak, P. A.; Pei, L.; Hogenesch, J.; O'connell, R. M.; Cheng, G.; Saez, E.; Miller, J. F.; Tontonoz, P. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell* **2004**, *119*, 299–309.

(57) Janowski, B. A.; Grogan, M. J.; Jones, S. A.; Wisely, G. B.; Kliewer, S. A.; Corey, E. J.; Mangelsdorf, D. J. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ. *PNAS* **1999**, *96*, 266–271.

(58) Lehmann, J. M.; Kliewer, S. A.; Moore, L. B.; Smith-Oliver, T. A.; Oliver, B. B.; Su, J. L.; Sundseth, S. S.; Winegar, D. A.; Blanchard, D. E.; Spencer, T. A.; Willson, T. M. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 3137–40.

(59) Yang, C.; McDonald, J. G.; Patel, A.; Zhang, Y.; Umetani, M.; Xu, F.; Westover, E. J.; Covey, D. F.; Mangelsdorf, D. J.; Cohen, J. C.; Hobbs, H. H. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 27816–26.

(60) Schultz, J. R.; Tu, H.; Luk, A.; Repa, J. J.; Medina, J. C.; Li, L.; Schwendner, S.; Wang, S.; Thoolen, M.; Mangelsdorf, D. J.; Lustig, K. D.; Shan, B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development* **2000**, *14*, 2831–8.

(61) Houck, K. A.; Borchert, K. M.; Hepler, C. D.; Thomas, J. S.; Bramlett, K. S.; Michael, L. F.; Burris, T. P. T0901317 is a dual LXR/FXR agonist. *Molecular Genetics and Metabolism* **2004**, *83*, 184–187.

(62) Mitro, N.; Vargas, L.; Romeo, R.; Koder, A.; Saez, E. T0901317 is a potent PXR ligand: Implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Letters* **2007**, *581*, 1721–1726.

(63) Kumar, N.; Solt, L. A.; Conkright, J. J.; Wang, Y.; Istrate, M. A.; Busby, S. A.; Garcia-Ordonez, R. D.; Burris, T. P.; Griffin, P. R. The Benzenesulfoamide T0901317 [N-(2,2,2-Trifluoroethyl)-N-[4-[2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide] Is a Novel Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor- / Inverse Agonist. *Molecular Pharmacology* **2010**, *77*, 228–236.

(64) Collins, J. L. *et al*. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1963–6.

(65) Katz, A.; Udata, C.; Ott, E.; Hickey, L.; Burczynski, M. E.; Burghart, P.; Vesterqvist, O.; Meng, X. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Single Doses of LXR-623, a Novel Liver X-Receptor Agonist, in Healthy Participants. *Journal of Clinical Pharmacology* **2009**, *49*, 643–649.

(66) Stachel, S. J. *et al*. Identification and in Vivo Evaluation of Liver X Receptor β-Selective Agonists for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 3489–3498.

(67) Nomura, S.; Endo-Umeda, K.; Makishima, M.; Hashimoto, Y.; Ishikawa, M. Development of Tetrachlorophthalimides as Liver X Receptor β (LXRβ)-Selective Agonists. *ChemMedChem* **2016**, *11*, 2347–2360.

(68) Zuercher, W. J.; Buckholz, R. G.; Campobasso, N.; Collins, J. L.; Galardi, C. M.; Gampe, R. T.; Hyatt, S. M.; Merrihew, S. L.; Moore, J. T.; Oplinger, J. A.; Reid, P. R.; Spearing, P. K.; Stanley, T. B.; Stewart, E. L.; Willson, T. M. Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 3412–3416.

(69) Griffett, K.; Solt, L. A.; El-Gendy, B. E.-D. M.; Kamenecka, T. M.; Burris, T. P. A Liver-Selective LXR Inverse Agonist That Suppresses Hepatic Steatosis. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8*, 559–567.

(70) Griffett, K.; Welch, R. D.; Flaveny, C. A.; Kolar, G. R.; Neuschwander-Tetri, B. A.; Burris, T. P. The LXR inverse agonist SR9238 suppresses fibrosis in a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular Metabolism* **2015**, *4*, 353–357.

(71) Seol, W.; Choi, H. S.; Moore, D. D. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Molecular Endocrinology* **1995**, *9*, 72–85.

(72) 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.; Evans, R. M.; Weinberger, C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* **1995**, *81*, 687–693.

(73) Makishima, M.; Okamoto, A. Y.; Repa, J. J.; Tu, H.; Learned, R. M.; Luk, A.; Hull, M. V.; Lustig, K. D.; Mangelsdorf, D. J.; Shan, B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **1999**, *284*, 1362–5.

(74) 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*, 1365–1368.

(75) Fiorucci, S.; Rizzo, G.; Donini, A.; Distrutti, E.; Santucci, L. Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends in Molecular Medicine* **2007**, *13*, 298–309.

(76) Huber, R. M.; Murphy, K.; Miao, B.; Link, J. R.; Cunningham, M. R.; Rupar, M. J.; Gunyuzlu, P. L.; Haws, T. F.; Kassam, A.; Powell, F.; Hollis, G. F.; Young, P. R.; Mukherjee, R.; Burn, T. C. Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* **2002**, *290*, 35–43.

(77) Zhang, Y.; Kast-Woelbern, H. R.; Edwards, P. A. Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 104–10.

(78) Pellicciari, R.; Costantino, G.; Fiorucci, S. Farnesoid X Receptor: From Structure to Potential Clinical Applications. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5383–5403.

(79) Fiorucci, S.; Mencarelli, A.; Distrutti, E.; Zampella, A. Farnesoid X receptor: from medicinal chemistry to clinical applications. *Future Medicinal Chemistry* **2012**, *4*, 877–891.

(80) Brendel, C.; Schoonjans, K.; Botrugno, O. A.; Treuter, E.; Auwerx, J. The Small Heterodimer Partner Interacts with the Liver X Receptor α and Represses Its Transcriptional Activity. *Molecular Endocrinology* **2002**, *16*, 2065–2076.

(81) Lu, T. T.; Makishima, M.; Repa, J. J.; Schoonjans, K.; Kerr, T. A.; Auwerx, J.; Mangelsdorf, D. J. Molecular Basis for Feedback Regulation of Bile Acid Synthesis by Nuclear Receptors. *Molecular Cell* **2000**, *6*, 507–515.

(82) Wang, L.; Lee, Y.-K.; Bundman, D.; Han, Y.; Thevananther, S.; Kim, C.-S.; Chua, S. S.; Wei, P.; Heyman, R. A.; Karin, M.; Moore, D. D. Redundant Pathways for Negative Feedback Regulation of Bile Acid Production. *Developmental Cell* **2002**, *2*, 721–731.

(83) Inagaki, T.; Choi, M.; Moschetta, A.; Peng, L.; Cummins, C. L.; McDonald, J. G.; Luo, G.; Jones, S. A.; Goodwin, B.; Richardson, J. A.; Gerard, R. D.; Repa, J. J.; Mangelsdorf, D. J.; Kliewer, S. A. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism* **2005**, *2*, 217–225.

(84) Pircher, P. C.; Kitto, J. L.; Petrowski, M. L.; Tangirala, R. K.; Bischoff, E. D.; Schulman, I. G.; Westin, S. K. Farnesoid X receptor regulates bile acid-amino acid conjugation. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 27703–11.

(85) Modica, S.; Gadaleta, R. M.; Moschetta, A. Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nuclear Receptor Signaling* **2010**, *8*, e005.

(86) Kast, H. R.; Goodwin, B.; Tarr, P. T.; Jones, S. A.; Anisfeld, A. M.; Stoltz, C. M.; Tontonoz, P.; Kliewer, S.; Willson, T. M.; Edwards, P. A. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 2908–15.

(87) 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. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 28857–65.

(88) Ballatori, N.; Christian, W. V.; Lee, J. Y.; Dawson, P. A.; Soroka, C. J.; Boyer, J. L.; Madejczyk, M. S.; Li, N. OSTα-OSTβ: A major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* **2005**, *42*, 1270–1279.

(89) Denson, L. A.; Sturm, E.; Echevarria, W.; Zimmerman, T. L.; Makishima, M.; Mangelsdorf, D. J.; Karpen, S. J. The Orphan Nuclear Receptor, shp, Mediates Bile Acid-Induced Inhibition of the Rat Bile Acid Transporter, ntcp. *Gastroenterology* **2001**, *121*, 140–147.

(90) Neimark, E.; Chen, F.; Li, X.; Shneider, B. L. Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* **2004**, *40*, 149–156.

(91) Grober, J.; Zaghini, I.; Fujii, H.; Jones, S. A.; Kliewer, S. A.; Willson, T. M.; Ono, T.; Besnard, P. Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 29749–54.

(92) 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. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 2563–70.

(93) 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. *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *113*, 1408–18.

(94) Kast, H. R.; Nguyen, C. M.; Sinal, C. J.; Jones, S. A.; Laffitte, B. A.; Reue, K.; Gonzalez, F. J.; Willson, T. M.; Edwards, P. A. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Molecular Endocrinology* **2001**, *15*, 1720–8.

(95) Sirvent, A.; Claudel, T.; Martin, G.; Brozek, J.; Kosykh, V.; Darteil, R.; Hum, D. W.; Fruchart, J.-C.; Staels, B. The farnesoid X receptor induces very low density lipoprotein receptor gene expression. *FEBS Letters* **2004**, *566*, 173–177.

(96) 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 α gene via activation of the farnesoid X receptor. *Molecular Endocrinology* **2003**, *17*, 259–72.

(97) 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. *PNAS* **2006**, *103*, 1006–11.

(98) Ma, K.; Saha, P. K.; Chan, L.; Moore, D. D. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *Journal of Clinical Investigation* **2006**, *116*, 1102–1109.

(99) 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.; Kuipers, F.; Staels, B. The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 11039–49.

(100) Wang, Y.-D.; Chen, W.-D.; Wang, M.; Yu, D.; Forman, B. M.; Huang, W. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor κB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* **2008**, *48*, 1632–1643.

(101) Gadaleta, R. M.; van Erpecum, K. J.; Oldenburg, B.; Willemsen, E. C. L.; Renooij, W.; Murzilli, S.; Klomp, L. W. J.; Siersema, P. D.; Schipper, M. E. I.; Danese, S.; Penna, G.; Laverny, G.; Adorini, L.; Moschetta, A.; van Mil, S. W. C. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* **2011**, *60*, 463–72.

(102) Kim, M. S.; Shigenaga, J.; Moser, A.; Feingold, K.; Grunfeld, C. Repression of farnesoid X receptor during the acute phase response. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 8988–95.

(103) Lindor, K. D. Farnesoid X receptor agonists for primary biliary cirrhosis. *Current Opinion in Gastroenterology* **2011**, *27*, 285–288.

(104) Hirschfield, G. M. *et al*. Efficacy of Obeticholic Acid in Patients With Primary Biliary Cirrhosis and Inadequate Response to Ursodeoxycholic Acid. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 751–761.e8.

(105) Kowdley, K. V. *et al*. A randomized trial of obeticholic acid monotherapy in patients with primary biliary cholangitis. *Hepatology* **2018**, *67*, 1890–1902.

(106) Sayiner, M.; Lam, B.; Golabi, P.; Younossi, Z. M. Advances and challenges in the management of advanced fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* **2018**, *11*, 175628481881150.

(107) Neuschwander-Tetri, B. A. *et al*. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* **2015**, *385*, 956–965.

(108) Watanabe, M.; Horai, Y.; Houten, S. M.; Morimoto, K.; Sugizaki, T.; Arita, E.; Mataki, C.; Sato, H.; Tanigawara, Y.; Schoonjans, K.; Itoh, H.; Auwerx, J. Lowering Bile Acid Pool Size with a Synthetic Farnesoid X Receptor (FXR) Agonist Induces Obesity and Diabetes through Reduced Energy Expenditure. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 26913–26920.

(109) Hanniman, E. A.; Lambert, G.; McCarthy, T. C.; Sinal, C. J. Loss of functional farnesoid X receptor increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Lipid Research* **2005**, *46*, 2595–604.

(110) Shaik, F. B.; Prasad, D. V. R.; Narala, V. R. Role of farnesoid X receptor in inflammation and resolution. *Inflammation Research* **2015**, *64*, 9–20.

(111) Merk, D.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M. Medicinal chemistry of farnesoid X receptor ligands: from agonists and antagonists to modulators. *Future Medicinal Chemistry* **2012**, *4*, 1015–1036.

(112) 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 2971–2974.

(113) 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. *Molecular Endocrinology* **2014**, *28*, 659–73.

(114) Maruyama, T.; Miyamoto, Y.; Nakamura, T.; Tamai, Y.; Okada, H.; Sugiyama, E.; Nakamura, T.; Itadani, H.; Tanaka, K. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *298*, 714–719.

(115) Duboc, H.; Taché, Y.; Hofmann, A. F. The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Digestive and Liver Disease* **2014**, *46*, 302–312.

(116) Gege, C.; Kinzel, O.; Steeneck, C.; Schulz, A.; Kremoser, C. Knocking on FXR's door: the "hammerhead"-structure series of FXR agonists - amphiphilic isoxazoles with potent in vitro and in vivo activities. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2014**, *14*, 2143–58.

(117) Sepe, V.; Distrutti, E.; Fiorucci, S.; Zampella, A. Farnesoid X receptor modulators 2014-present: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2018**, *28*, 351–364.

(118) Tully, D. C. *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). *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 9960–9973.

(119) Pellicciari, R.; Fiorucci, S.; Camaioni, E.; Clerici, C.; Costantino, G.; Maloney, P. R.; Morelli, A.; Parks, D. J.; Willson, T. M. 6α-ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 3569–72.

(120) Pellicciari, R.; Costantino, G.; Camaioni, E.; Sadeghpour, B. M.; Entrena, A.; Willson, T. M.; Fiorucci, S.; Clerici, C.; Gioiello, A. Bile Acid Derivatives as Ligands of the Farnesoid X Receptor. Synthesis, Evaluation, and Structure-Activity Relationship of a Series of Body and Side Chain Modified Analogues of Chenodeoxycholic Acid. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 4559–4569.

(121) Mi, L.-Z.; Devarakonda, S.; Harp, J. M.; Han, Q.; Pellicciari, R.; Willson, T. M.; Khorasanizadeh, S.; Rastinejad, F. Structural Basis for Bile Acid Binding and Activation of the Nuclear Receptor FXR. *Molecular Cell* **2003**, *11*, 1093–1100.

(122) 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.; Rosenfeld, J. M.; Alvarez, J. G. A.; Noel, J. P.; Nicolaou, K. C.; Evans, R. M. A Chemical, Genetic, and Structural Analysis of the Nuclear Bile Acid Receptor FXR. *Molecular Cell* **2003**, *11*, 1079–1092.

(123) Fang, S. *et al*. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. *Nature Medicine* **2015**, *21*, 159–165.

(124) Massafra, V.; Pellicciari, R.; Gioiello, A.; van Mil, S. W. Progress and challenges of selective Farnesoid X Receptor modulation. *Pharmacology & Therapeutics* **2018**, *191*, 162–177.

(125) Issemann, I.; Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **1990**, *347*, 645–650.

(126) Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel, F.; Helftenbein, G.; Wahli, W. Control of the peroxisomal β-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. *Cell* **1992**, *68*, 879–87.

(127) Kliewer, S. A.; Forman, B. M.; Blumberg, B.; Ong, E. S.; Borgmeyer, U.; Mangelsdorf, D. J.; Umesono, K.; Evans, R. M. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *PNAS* **1994**, *91*, 7355–9.

(128) Michalik, L. *et al*. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 726–41.

(129) Desvergne, B.; Wahli, W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews* **1999**, *20*, 649–688.

(130) Mukherjee, R.; Jow, L.; Croston, G. E.; Paterniti, J. R. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARγ2 versus PPARγ1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 8071–6.

(131) Ratziu, V. *et al*. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-α and -δ, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **2016**, *150*, 1147–1159.e5.

(132) Lehrke, M.; Lazar, M. A. The Many Faces of PPARγ. *Cell* **2005**, *123*, 993–999.

(133) Evans, R. M.; Barish, G. D.; Wang, Y.-X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine* **2004**, *10*, 355–361.

(134) Tontonoz, P.; Hu, E.; Spiegelman, B. M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPARγ2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **1994**, *79*, 1147–56.

(135) Barak, Y.; Nelson, M. C.; Ong, E. S.; Jones, Y. Z.; Ruiz-Lozano, P.; Chien, K. R.; Koder, A.; Evans, R. M. PPARγ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell* **1999**, *4*, 585–95.

(136) Imai, T.; Takakuwa, R.; Marchand, S.; Dentz, E.; Bornert, J.-M.; Messaddeq, N.; Wendling, O.; Mark, M.; Desvergne, B.; Wahli, W.; Chambon, P.; Metzger, D. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *PNAS* **2004**, *101*, 4543–7.

(137) Schoonjans, K.; Peinado-Onsurbe, J.; Lefebvre, A. M.; Heyman, R. A.; Briggs, M.; Deeb, S.; Staels, B.; Auwerx, J. PPARα and PPARγ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *The EMBO Journal* **1996**, *15*, 5336–48.

(138) Frohnert, B. I.; Hui, T. Y.; Bernlohr, D. A. Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 3970–7.

(139) Motojima, K.; Passilly, P.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J.; Latruffe, N. Expression of Putative Fatty Acid Transporter Genes Are Regulated by Peroxisome Proliferator-activated Receptor α and γ Activators in a Tissue- and Inducer-specific Manner. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 16710–16714.

(140) Tontonoz, P.; Hu, E.; Devine, J.; Beale, E. G.; Spiegelman, B. M. PPARγ2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Molecular and Cellular Biology* **1995**, *15*, 351–7.

(141) Tontonoz, P.; Hu, E.; Graves, R. A.; Budavari, A. I.; Spiegelman, B. M. mPPARγ2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development* **1994**, *8*, 1224–34.

(142) Ribon, V.; Printen, J. A.; Hoffman, N. G.; Kay, B. K.; Saltiel, A. R. A novel, multifuntional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Biology* **1998**, *18*, 872–9.

(143) Kim, H.; Haluzik, M.; Gavrilova, O.; Yakar, S.; Portas, J.; Sun, H.; Pajvani, U. B.; Scherer, P. E.; LeRoith, D. Thiazolidinediones improve insulin sensitivity in adipose tissue and reduce the hyperlipidaemia without affecting the hyperglycaemia in a transgenic model of type 2 diabetes. *Diabetologia* **2004**, *47*, 2215–2225.

(144) Monsalve, F. A.; Pyarasani, R. D.; Delgado-Lopez, F.; Moore-Carrasco, R. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Targets for the Treatment of Metabolic Diseases. *Mediators of Inflammation* **2013**, *2013*, 1–18.

(145) Yamauchi, T. *et al*. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature Medicine* **2001**, *7*, 941–6.

(146) Tanaka, T. *et al*. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor induces fatty acid oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *PNAS* **2003**, *100*, 15924–15929.

(147) Wang, Y.-X.; Lee, C.-H.; Tiep, S.; Yu, R. T.; Ham, J.; Kang, H.; Evans, R. M. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* **2003**, *113*, 159–70.

(148) Leibowitz, M. D. *et al*. Activation of PPARδ alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Letters* **2000**, *473*, 333–6.

(149) Oliver, W. R.; Shenk, J. L.; Snaith, M. R.; Russell, C. S.; Plunket, K. D.; Bodkin, N. L.; Lewis, M. C.; Winegar, D. A.; Sznaidman, M. L.; Lambert, M. H.; Xu, H. E.; Sternbach, D. D.; Kliewer, S. A.; Hansen, B. C.; Willson, T. M. A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *PNAS* **2001**, *98*, 5306–11.

(150) Dressel, U.; Allen, T. L.; Pippal, J. B.; Rohde, P. R.; Lau, P.; Muscat, G. E. O. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Molecular Endocrinology* **2003**, *17*, 2477–93.

(151) Fan, W.; Waizenegger, W.; Lin, C. S.; Sorrentino, V.; He, M.-X.; Wall, C. E.; Li, H.; Liddle, C.; Yu, R. T.; Atkins, A. R.; Auwerx, J.; Downes, M.; Evans, R. M. PPARδ Promotes Running Endurance by Preserving Glucose. *Cell Metabolism* **2017**, *25*, 1186–1193.e4.

(152) Wang, Y.-X.; Zhang, C.-L.; Yu, R. T.; Cho, H. K.; Nelson, M. C.; Bayuga-Ocampo, C. R.; Ham, J.; Kang, H.; Evans, R. M. Regulation of Muscle Fiber Type and Running Endurance by PPARδ. *PLoS Biology* **2004**, *2*, e294.

(153) Luquet, S.; Lopez-Soriano, J.; Holst, D.; Fredenrich, A.; Melki, J.; Rassoulzadegan, M.; Grimaldi, P. A. Peroxisome proliferator-activated receptor δ controls muscle development and oxidative capability. *The FASEB Journal* **2003**, *17*, 2299–301.

(154) Laganà, A. S.; Vitale, S. G.; Nigro, A.; Sofo, V.; Salmeri, F. M.; Rossetti, P.; Rapisarda, A. M. C.; La Vignera, S.; Condorelli, R. A.; Rizzo, G.; Buscema, M. Pleiotropic Actions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) in Dysregulated Metabolic Homeostasis, Inflammation and Cancer: Current Evidence and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, 999.

(155) Jiang, C.; Ting, A. T.; Seed, B. PPAR-γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* **1998**, *391*, 82–86.

(156) Hofmann, C.; Lorenz, K.; Braithwaite, S. S.; Colca, J. R.; Palazuk, B. J.; Hotamisligil, G. S.; Spiegelman, B. M. Altered gene expression for tumor necrosis factor-α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology* **1994**, *134*, 264–70.

(157) Ahmadian, M.; Suh, J. M.; Hah, N.; Liddle, C.; Atkins, A. R.; Downes, M.; Evans, R. M. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine* **2013**, *99*, 557–566.

(158) Nagy, L.; Tontonoz, P.; Alvarez, J. G.; Chen, H.; Evans, R. M. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARγ. *Cell* **1998**, *93*, 229–40.

(159) Marx, N.; Sukhova, G.; Murphy, C.; Libby, P.; Plutzky, J. Macrophages in human atheroma contain PPARγ: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor γ (PPARγ) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARγ activation in mononuclear phagocytes in vitro. *The American Journal of Pathology* **1998**, *153*, 17–23.

(160) Tanaka, T. *et al*. Down regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ expression by inflammatory cytokines and its reversal by thiazolidinediones. *Diabetologia* **1999**, *42*, 702–10.

(161) Li, A. C.; Brown, K. K.; Silvestre, M. J.; Willson, T. M.; Palinski, W.; Glass, C. K. Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* **2000**, *106*, 523–31.

(162) Mukundan, L.; Odegaard, J. I.; Morel, C. R.; Heredia, J. E.; Mwangi, J. W.; Ricardo-Gonzalez, R. R.; Goh, Y. P. S.; Eagle, A. R.; Dunn, S. E.; Awakuni, J. U. H.; Nguyen, K. D.; Steinman, L.; Michie, S. A.; Chawla, A. PPAR-δ senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nature Medicine* **2009**, *15*, 1266–1272.

(163) Kang, K.; Reilly, S. M.; Karabacak, V.; Gangl, M. R.; Fitzgerald, K.; Hatano, B.; Lee, C.-H. Adipocyte-Derived Th2 Cytokines and Myeloid PPARδ Regulate Macrophage Polarization and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism* **2008**, *7*, 485–495.

(164) Lee, C.-H.; Chawla, A.; Urbiztondo, N.; Liao, D.; Boisvert, W. A.; Evans, R. M.; Curtiss, L. K. Transcriptional repression of atherogenic inflammation: modulation by PPARδ. *Science* **2003**, *302*, 453–7.

(165) Bojic, L. A.; Telford, D. E.; Fullerton, M. D.; Ford, R. J.; Sutherland, B. G.; Edwards, J. Y.; Sawyez, C. G.; Gros, R.; Kemp, B. E.; Steinberg, G. R.; Huff, M. W. PPARδ activation attenuates hepatic steatosis in Ldlr-/- mice by enhanced fat oxidation, reduced lipogenesis, and improved insulin sensitivity. *Journal of Lipid Research* **2014**, *55*, 1254–66.

(166) Kung, J.; Henry, R. R. Thiazolidinedione safety. *Expert Opinion on Drug Safety* **2012**, *11*, 565–579.

(167) Zhang, F.; Lavan, B. E.; Gregoire, F. M. Selective Modulators of PPARγ Activity: Molecular Aspects Related to Obesity and Side-Effects. *PPAR Research* **2007**, *2007*, 32696.

(168) Derosa, G.; Sahebkar, A.; Maffioli, P. The role of various peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands in clinical practice. *Journal of Cellular Physiology* **2018**, *233*, 153–161.

(169) Risérus, U. *et al*. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men. *Diabetes* **2008**, *57*, 332–9.

(170) Sprecher, D. L.; Massien, C.; Pearce, G.; Billin, A. N.; Perlstein, I.; Willson, T. M.; Hassall, D. G.; Ancellin, N.; Patterson, S. D.; Lobe, D. C.; Johnson, T. G. Triglyceride: High-Density Lipoprotein Cholesterol Effects in Healthy Subjects Administered a Peroxisome Proliferator Activated Receptor δ Agonist. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **2007**, *27*, 359–365.

(171) Gupta, R. A.; Wang, D.; Katkuri, S.; Wang, H.; Dey, S. K.; DuBois, R. N. Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator–activated receptor-δ accelerates intestinal adenoma growth. *Nature Medicine* **2004**, *10*, 245–247.

(172) Jones, D. *et al*. Seladelpar (MBX-8025), a selective PPAR-δ agonist, in patients with primary biliary cholangitis with an inadequate response to ursodeoxycholic acid: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2, proof-of-concept study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **2017**, *2*, 716–726.

(173) Forman, B. M.; Chen, J.; Evans, R. M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ. *PNAS* **1997**, *94*, 4312–7.

(174) Kliewer, S. A.; Sundseth, S. S.; Jones, S. A.; Brown, P. J.; Wisely, G. B.; Koble, C. S.; Devchand, P.; Wahli, W.; Willson, T. M.; Lenhard, J. M.; Lehmann, J. M. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ. *PNAS* **1997**, *94*, 4318–23.

(175) Keller, H.; Dreyer, C.; Medin, J.; Mahfoudi, A.; Ozato, K.; Wahli, W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *PNAS* **1993**, *90*, 2160–4.

(176) Forman, B. M.; Tontonoz, P.; Chen, J.; Brun, R. P.; Spiegelman, B. M.; Evans, R. M. 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPARγ. *Cell* **1995**, *83*, 803–12.

(177) Shureiqi, I.; Jiang, W.; Zuo, X.; Wu, Y.; Stimmel, J. B.; Leesnitzer, L. M.; Morris, J. S.; Fan, H.-Z.; Fischer, S. M.; Lippman, S. M. The 15-lipoxygenase-1 product 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid down-regulates PPAR-δ to induce apoptosis in colorectal cancer cells. *PNAS* **2003**, *100*, 9968–9973.

(178) Sauer, S. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, *36*, 688–704.

(179) Gregoire, F. M.; Zhang, F.; Clarke, H. J.; Gustafson, T. A.; Sears, D. D.; Favelyukis, S.; Lenhard, J.; Rentzeperis, D.; Clemens, L. E.; Mu, Y.; Lavan, B. E. MBX-102/JNJ39659100, a Novel Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Ligand with Weak Transactivation Activity Retains Antidiabetic Properties in the Absence of Weight Gain and Edema. *Molecular Endocrinology* **2009**, *23*, 975–988.

(180) Poiley, J.; Steinberg, A. S.; Choi, Y.-J.; Davis, C. S.; Martin, R. L.; McWherter, C. A.; Boudes, P. F.; Arhalofenate Flare Study Investigators A Randomized, Double-Blind, Active- and Placebo-Controlled Efficacy and Safety Study of Arhalofenate for Reducing Flare in Patients With Gout. *Arthritis & Rheumatology* **2016**, *68*, 2027–2034.

(181) Hong, F.; Xu, P.; Zhai, Y. The Opportunities and Challenges of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Ligands in Clinical Drug Discovery and Development. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 2189.

(182) Taygerly, J. P. *et al*. Discovery of INT131: a selective PPARγ modulator that enhances insulin sensitivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 979–92.

(183) Brust, R.; Shang, J.; Fuhrmann, J.; Mosure, S. A.; Bass, J.; Cano, A.; Heidari, Z.; Chrisman, I. M.; Nemetchek, M. D.; Blayo, A.-L.; Griffin, P. R.; Kamenecka, T. M.; Hughes, T. S.; Kojetin, D. J. A structural mechanism for directing corepressor-selective inverse agonism of PPARγ. *Nature Communications* **2018**, *9*, 4687.

(184) Sznaidman, M. L.; Haffner, C. D.; Maloney, P. R.; Fivush, A.; Chao, E.; Goreham, D.; Sierra, M. L.; LeGrumelec, C.; Xu, H. E.; Montana, V. G.; Lambert, M. H.; Willson, T. M.; Oliver, W. R.; Sternbach, D. D. Novel selective small molecule agonists for peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPARδ)–synthesis and biological activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 1517–21.

(185) Basséne, C. E.; Suzenet, F.; Hennuyer, N.; Staels, B.; Caignard, D.-H.; Dacquet, C.; Renard, P.; Guillaumet, G. Studies towards the conception of new selective PPARβ/δ ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 4528–32.

(186) Sternbach, D. D. in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*; Academic Press: 2003; Bd. 38, S. 71–80.

(187) Haczeyni, F.; Wang, H.; Barn, V.; Mridha, A. R.; Yeh, M. M.; Haigh, W. G.; Ioannou, G. N.; Choi, Y.-J.; McWherter, C. A.; Teoh, N. C.-H.; Farrell, G. C. The selective peroxisome proliferator-activated receptor-δ agonist seladelpar reverses nonalcoholic steatohepatitis pathology by abrogating lipotoxicity in diabetic obese mice. *Hepatology Communications* **2017**, *1*, 663–674.

(188) Mangelsdorf, D. J.; Ong, E. S.; Dyck, J. A.; Evans, R. M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* **1990**, *345*, 224–229.

(189) Mangelsdorf, D. J.; Borgmeyer, U.; Heyman, R. A.; Zhou, J. Y.; Ong, E. S.; Oro, A. E.; Kakizuka, A.; Evans, R. M. Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid. *Genes & Development* **1992**, *6*, 329–44.

(190) Brocard, J.; Kastner, P.; Chambon, P. Two novel RXR α isoforms from mouse testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *229*, 211–8.

(191) Nagata, T.; Kanno, Y.; Ozato, K.; Taketo, M. The mouse Rxrb gene encoding RXRβ: genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters. *Gene* **1994**, *142*, 183–9.

(192) Fleischhauer, K.; Park, J. H.; DiSanto, J. P.; Marks, M.; Ozato, K.; Yang, S. Y. Isolation of a full-length cDNA clone encoding a N-terminally variant form of the human retinoid X receptor β. *Nucleic Acids Research* **1992**, *20*, 1801.

(193) Liu, Q.; Linney, E. The mouse retinoid-X receptor-γ gene: genomic organization and evidence for functional isoforms. *Molecular Endocrinology* **1993**, *7*, 651–658.

(194) Dollé, P.; Fraulob, V.; Kastner, P.; Chambon, P. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mechanisms of Development* **1994**, *45*, 91–104.

(195) Forman, B. M.; Umesono, K.; Chen, J.; Evans, R. M. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **1995**, *81*, 541–50.

(196) Perlmann, T.; Jansson, L. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes & Development* **1995**, *9*, 769–82.

(197) Mangelsdorf, D. J.; Umesono, K.; Kliewer, S. A.; Borgmeyer, U.; Ong, E. S.; Evans, R. M. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* **1991**, *66*, 555–61.

(198) Mader, S.; Chen, J. Y.; Chen, Z.; White, J.; Chambon, P.; Gronemeyer, H. The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificites of the DNA binding domains. *The EMBO Journal* **1993**, *12*, 5029–41.

(199) Zhang, X.-k.; Lehmann, J.; Hoffmann, B.; Dawson, M. I.; Cameron, J.; Graupner, G.; Hermann, T.; Tran, P.; Pfahl, M. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature* **1992**, *358*, 587–591.

(200) Vivat-Hannah, V.; Bourguet, W.; Gottardis, M.; Gronemeyer, H. Separation of retinoid X receptor homo- and heterodimerization functions. *Molecular and Cellular Biology* **2003**, *23*, 7678–88.

(201) Shulman, A. I.; Larson, C.; Mangelsdorf, D. J.; Ranganathan, R. Structural determinants of allosteric ligand activation in RXR heterodimers. *Cell* **2004**, *116*, 417–29.

(202) Germain, P.; Chambon, P.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Lazar, M. A.; Leid, M.; De Lera, A. R.; Lotan, R.; Mangelsdorf, D. J.; Gronemeyer, H. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 712–25.

(203) Kastner, P.; Grondona, J. M.; Mark, M.; Gansmuller, A.; LeMeur, M.; Decimo, D.; Vonesch, J. L.; Dollé, P.; Chambon, P. Genetic analysis of RXR α developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **1994**, *78*, 987–1003.

(204) Kastner, P.; Mark, M.; Leid, M.; Gansmuller, A.; Chin, W.; Grondona, J. M.; Décimo, D.; Krezel, W.; Dierich, A.; Chambon, P. Abnormal spermatogenesis in RXR β mutant mice. *Genes & Development* **1996**, *10*, 80–92.

(205) Krezel, W.; Dupé, V.; Mark, M.; Dierich, A.; Kastner, P.; Chambon, P. RXRγ null mice are apparently normal and compound RXR$\alpha^{+/-}$/RXR$\beta^{-/-}$/RXR$\gamma^{-/-}$ mutant mice are viable. *PNAS* **1996**, *93*, 9010–4.

(206) Brown, N. S.; Smart, A.; Sharma, V.; Brinkmeier, M. L.; Greenlee, L.; Camper, S. A.; Jensen, D. R.; Eckel, R. H.; Krezel, W.; Chambon, P.; Haugen, B. R. Thyroid hormone resistance and increased metabolic rate in the RXR-γ-deficient mouse. *Journal of Clinical Investigation* **2000**, *106*, 73–9.

(207) Willson, T. M.; Kliewer, S. A. Pxr, car and drug metabolism. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 259–266.

(208) Carlberg, C.; Campbell, M. J. Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids* **2013**, *78*, 127–136.

(209) Vaz, B.; R de Lera, Á. Advances in drug design with RXR modulators. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2012**, *7*, 1003–1016.

(210) Fitz, N. F.; Cronican, A. A.; Lefterov, I.; Koldamova, R. Comment on "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models". *Science* **2013**, *340*, 924–924.

(211) Price, A. R.; Xu, G.; Siemienski, Z. B.; Smithson, L. A.; Borchelt, D. R.; Golde, T. E.; Felsenstein, K. M. Comment on "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models". *Science* **2013**, *340*, 924–924.

(212) Tesseur, I.; Lo, A. C.; Roberfroid, A.; Dietvorst, S.; Van Broeck, B.; Borgers, M.; Gijsen, H.; Moechars, D.; Mercken, M.; Kemp, J.; D'Hooge, R.; De Strooper, B. Comment on "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models". *Science* **2013**, *340*, 924–924.

(213) Veeraraghavalu, K.; Zhang, C.; Miller, S.; Hefendehl, J. K.; Rajapaksha, T. W.; Ulrich, J.; Jucker, M.; Holtzman, D. M.; Tanzi, R. E.; Vassar, R.; Sisodia, S. S. Comment on "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models". *Science* **2013**, *340*, 924–924.

(214) Landreth, G. E.; Cramer, P. E.; Lakner, M. M.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Brunden, K. R.; Wilson, D. A. Response to Comments on "ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models". *Science* **2013**, *340*, 924–924.

(215) Xu, J.; Storer, P. D.; Chavis, J. A.; Racke, M. K.; Drew, P. D. Agonists for the peroxisome proliferator-activated receptor-α and the retinoid X receptor inhibit inflammatory responses of microglia. *Journal of Neuroscience Research* **2005**, *81*, 403–411.

(216) Xu, J.; Drew, P. D. 9-Cis-retinoic acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes. *Journal of Neuroimmunology* **2006**, *171*, 135–44.

(217) Zhang-Gandhi, C. X.; Drew, P. D. Liver X receptor and retinoid X receptor agonists inhibit inflammatory responses of microglia and astrocytes. *Journal of Neuroimmunology* **2007**, *183*, 50–9.

(218) Ning, R.; Zhu, J.; Chai, D.; Xu, C.; Xie, H.; Lin, X.; Zeng, J.; Lin, J. RXR agonists inhibit high glucose-induced upregulation of inflammation by suppressing activation of the NADPH oxidase-nuclear factor-κB pathway in human endothelial cells. *Genetics and Molecular Research* **2013**, *12*, 6692–6707.

(219) Lagu, B.; Pio, B.; Lebedev, R.; Yang, M.; Pelton, P. D. RXR-LXR heterodimer modulators for the potential treatment of dyslipidemia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 3497–503.

(220) Lagu, B.; Lebedev, R.; Pio, B.; Yang, M.; Pelton, P. D. Dihydro-[1*H*]-quinolin-2-ones as retinoid X receptor (RXR) agonists for potential treatment of dyslipidemia. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 3491–6.

(221) Claudel, T.; Leibowitz, M. D.; Fiévet, C.; Tailleux, A.; Wagner, B.; Repa, J. J.; Torpier, G.; Lobaccaro, J. M.; Paterniti, J. R.; Mangelsdorf, D. J.; Heyman, R. A.; Auwerx, J. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *PNAS* **2001**, *98*, 2610–5.

(222) Fujii, U.; Miyahara, N.; Taniguchi, A.; Oda, N.; Morichika, D.; Murakami, E.; Nakayama, H.; Waseda, K.; Kataoka, M.; Kakuta, H.; Tanimoto, M.; Kanehiro, A. Effect of a retinoid X receptor partial agonist on airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Respiratory Research* **2017**, *18*, 23.

(223) Onuki, M. *et al*. A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. *International Immunology* **2019**, *in press*, DOI: 10.1093/intimm/dxy089.

(224) Bodsworth, N. J.; Bloch, M.; Bower, M.; Donnell, D.; Yocum, R.; The International Panretin® Gel KS Study Group Phase III Vehicle-Controlled, Multi-Centered Study of Topical Alitretinoin Gel 0.1% in Cutaneous AIDS-Related Kaposi's Sarcoma. *American Journal of Clinical Dermatology* **2001**, *2*, 77–87.

(225) Hurst, R. E. Bexarotene ligand pharmaceuticals. *Current Opinion in Investigational Drugs* **2000**, *1*, 514–23.

(226) T. Liby, K.; B. Sporn, M. Rexinoids for Prevention and Treatment of Cancer: Opportunities and Challenges. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 721–730.

(227) Uray, I. P.; Dmitrovsky, E.; Brown, P. H. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic. *Seminars in Oncology* **2016**, *43*, 49–64.

(228) Standeven, A. M.; Thacher, S. M.; Yuan, Y.-D.; Escobar, M.; Vuligonda, V.; Beard, R. L.; Chandraratna, R. A. Retinoid X receptor agonist elevation of serum triglycerides in rats by potentiation of retinoic acid receptor agonist induction or by action as single agents. *Biochemical Pharmacology* **2001**, *62*, 1501–1509.

(229) Macchia, P. E.; Jiang, P.; Yuan, Y.-D.; Chandarardna, R. A. S.; Weiss, R. E.; Chassande, O.; Samarut, J.; Refetoff, S.; Burant, C. F. RXR receptor agonist suppression of thyroid function: central effects in the absence of thyroid hormone receptor. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **2002**, *283*, E326–E331.

(230) Liu, S.; Ogilvie, K. M.; Klausing, K.; Lawson, M. A.; Jolley, D.; Li, D.; Bilakovics, J.; Pascual, B.; Hein, N.; Urcan, M.; Leibowitz, M. D. Mechanism of selective retinoid X receptor agonist-induced hypothyroidism in the rat. *Endocrinology* **2002**, *143*, 2880–5.

(231) Sherman, S. I.; Gopal, J.; Haugen, B. R.; Chiu, A. C.; Whaley, K.; Nowlakha, P.; Duvic, M. Central hypothyroidism associated with retinoid X receptor-selective ligands. *The New England Journal of Medicine* **1999**, *340*, 1075–9.

(232) Kapetanovic, I. M.; Horn, T. L.; Johnson, W. D.; Cwik, M. J.; Detrisac, C. J.; McCormick, D. L. Murine Oncogenicity and Pharmacokinetics Studies of 9-*cis*-UAB30, an RXR Agonist, for Breast Cancer Chemoprevention. *International Journal of Toxicology* **2010**, *29*, 157–164.

(233) Eshagh, K.; Romero, L. S.; So, J. K.; Zhao, X. F. Late-Onset Bexarotene-Induced CD4 Lymphopenia in a Cutaneous T-cell Lymphoma Patient. *Cutis* **2017**, *99*.

(234) Ohsawa, F. *et al*. Mechanism of retinoid X receptor partial agonistic action of 1-(3,5,5,8,8-pentamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthyl)-1H-benzotriazole-5-carboxylic acid and structural development to increase potency. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 1865–77.

(235) Kakuta, H. *et al*. RXR Partial Agonist CBt-PMN Exerts Therapeutic Effects on Type 2 Diabetes without the Side Effects of RXR Full Agonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2012**, *3*, 427–32.

(236) Michellys, P. Y. *et al*. Novel (2E,4E,6Z)-7-(2-alkoxy-3,5-dialkylbenzene)-3-methylocta-2,4,6-trienoic acid retinoid X receptor modulators are active in models of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 2683–96.

(237) Merk, D. Chances and challenges of retinoid X receptor γ targeting for regenerative multiple sclerosis treatment. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, *7*, 2411–2413.

(238) Takamatsu, K.; Takano, A.; Yakushiji, N.; Morishita, K.-i.; Matsuura, N.; Makishima, M.; Ali, H. I.; Akaho, E.; Tai, A.; Sasaki, K.; Kakuta, H. Reduction of lipophilicity at the lipophilic domain of RXR agonists enables production of subtype preference: RXRα-preferential agonist possessing a sulfonamide moiety. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 454–60.

(239) Takamatsu, K.; Takano, A.; Yakushiji, N.; Morohashi, K.; Morishita, K.-i.; Matsuura, N.; Makishima, M.; Tai, A.; Sasaki, K.; Kakuta, H. The First Potent Subtype-Selective Retinoid X Receptor (RXR) Agonist Possessing a 3-Isopropoxy-4-isopropylphenylamino Moiety, NEt-3IP (RXRα/β-dual agonist). *ChemMedChem* **2008**, *3*, 780–787.

(240) Merk, D.; Grisoni, F.; Friedrich, L.; Gelzinyte, E.; Schneider, G. Computer-Assisted Discovery of Retinoid X Receptor Modulating Natural Products and Isofunctional Mimetics. *Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *61*, 5442–5447.

(241) Wolf, G. Is 9-cis-retinoic acid the endogenous ligand for the retinoic acid-X receptor? *Nutrition Reviews* **2006**, *64*, 532–8.

(242) De Urquiza, A. M.; Liu, S.; Sjöberg, M.; Zetterström, R. H.; Griffiths, W.; Sjövall, J.; Perlmann, T. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* **2000**, *290*, 2140–4.

(243) Lemotte, P. K.; Keidel, S.; Apfel, C. M. Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *European Journal of Biochemistry* **1996**, *236*, 328–33.

(244) Lehmann, J. M.; Jong, L.; Fanjul, A.; Cameron, J. F.; Lu, X. P.; Haefner, P.; Dawson, M. I.; Pfahl, M. Retinoids selective for retinoid X receptor response pathways. *Science* **1992**, *258*, 1944–6.

(245) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Badea, B. A.; White, S. K.; Mais, D. E.; Berger, E.; Suto, C. M.; Goldman, M. E.; Heyman, R. A. Synthesis and structure-activity relationships of novel retinoid X receptor-selective retinoids. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 2930–41.

(246) Cummings, J. L.; Zhong, K.; Kinney, J. W.; Heaney, C.; Moll-Tudla, J.; Joshi, A.; Pontecorvo, M.; Devous, M.; Tang, A.; Bena, J. Double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial of bexarotene in moderate Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy* **2016**, *8*, 4.

(247) Boehm, M. F.; Zhang, L.; Zhi, L.; McClurg, M. R.; Berger, E.; Wagoner, M.; Mais, D. E.; Suto, C. M.; Davies, J. A.; Heyman, R. A. Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 3146–55.

(248) Watanabe, M.; Kakuta, H. Retinoid X Receptor Antagonists. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19*, 2354.

(249) Ebisawa, M.; Umemiya, H.; Ohta, K.; Fukasawa, H.; Kawachi, E.; Christoffel, G.; Gronemeyer, H.; Tsuji, M.; Hashimoto, Y.; Shudo, K.; Kagechika, H. Retinoid X receptor-antagonistic diazepinylbenzoic acids. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1999**, *47*, 1778–86.

(250) Egea, P. F.; Mitschler, A.; Rochel, N.; Ruff, M.; Chambon, P.; Moras, D. Crystal structure of the human RXRα ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 2592–601.

(251) Nahoum, V.; Perez, E.; Germain, P.; Rodriguez-Barrios, F.; Manzo, F.; Kammerer, S.; Lemaire, G.; Hirsch, O.; Royer, C. A.; Gronemeyer, H.; de Lera, A. R.; Bourguet, W. Modulators of the structural dynamics of the retinoid X receptor to reveal receptor function. *PNAS* **2007**, *104*, 17323–17328.

(252) Hunter, P. The inflammation theory of disease. The growing realization that chronic inflammation is crucial in many diseases opens new avenues for treatment. *EMBO Reports* **2012**, *13*, 968–70.

(253) Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* **2006**, *444*, 860–867.

(254) U. Kiltz, R. Alten, M. Fleck, K. Krüger, B. Manger, U. Müller-Ladner, H. Nüsslein, M. Reuss-Borst, A. Schwarting, H. Schulze-Koops, A. Tausche, J. Braun S2e-Leitlinie Gichtarthritis. `https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/060-005l_S2e_Gichtarthritis_2016-08.pdf` (besucht am 08. 02. 2019).

(255) Schmidt, J. *et al*. A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase To Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 7703–7724.

(256) 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 499–514.

(257) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank screening revealed alitretinoin and bexarotene as liver X receptor modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 1193–1198.

(258) Law, V. *et al*. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, D1091–D1097.

(259) Bento, A. P.; Gaulton, A.; Hersey, A.; Bellis, L. J.; Chambers, J.; Davies, M.; Krüger, F. A.; Light, Y.; Mak, L.; McGlinchey, S.; Nowotka, M.; Papadatos, G.; Santos, R.; Overington, J. P. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Research* **2014**, *42*, D1083–D1090.

(260) Schneider, G.; Neidhart, W.; Giller, T.; Schmid, G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38*, 2894–2896.

(261) Achenbach, J.; Tiikkainen, P.; Franke, L.; Proschak, E. Computational tools for polypharmacology and repurposing. *Future Medicinal Chemistry* **2011**, *3*, 961–968.

(262) Ruzicka, T. *et al*. Efficacy and safety of oral alitretinoin (9-cis retinoic acid) in patients with severe chronic hand eczema refractory to topical corticosteroids: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *British Journal of Dermatology* **2008**, *158*, 808–817.

(263) Fritz, H.; Kennedy, D.; Fergusson, D.; Fernandes, R.; Doucette, S.; Cooley, K.; Seely, A.; Sagar, S.; Wong, R.; Seely, D. Vitamin A and Retinoid Derivatives for Lung Cancer: A Systematic Review and Meta Analysis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e21107.

(264) Heitel, P.; Gellrich, L.; Heering, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Urate transporter inhibitor lesinurad is a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator (sPPARγM) in vitro. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 13554.

(265) Proschak, E.; Heitel, P.; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 5235–5266.

(266) Artis, D. R. *et al*. Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. *PNAS* **2009**, *106*, 262–7.

(267) Miner, J. N.; Tan, P. K.; Hyndman, D.; Liu, S.; Iverson, C.; Nanavati, P.; Hagerty, D. T.; Manhard, K.; Shen, Z.; Girardet, J.-L.; Yeh, L.-T.; Terkeltaub, R.; Quart, B. Lesinurad, a novel, oral compound for gout, acts to decrease serum uric acid through inhibition of urate transporters in the kidney. *Arthritis Research & Therapy* **2016**, *18*, 214.

(268) Gillen, M.; Yang, C.; Wilson, D.; Valdez, S.; Lee, C.; Kerr, B.; Shen, Z. Evaluation of Pharmacokinetic Interactions Between Lesinurad, a New Selective Urate Reabsorption Inhibitor, and CYP Enzyme Substrates Sildenafil, Amlodipine, Tolbutamide, and Repaglinide. *Clinical Pharmacology in Drug Development* **2017**, *6*, 363–376.

(269) Willson, T. M.; Brown, P. J.; Sternbach, D. D.; Henke, B. R. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 527–50.

(270) Pap, A.; Cuaranta-Monroy, I.; Peloquin, M.; Nagy, L.; Pap, A.; Cuaranta-Monroy, I.; Peloquin, M.; Nagy, L. Is the Mouse a Good Model of Human PPARγ-Related Metabolic Diseases? *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17*, 1236.

(271) AstraZeneca Prescribing information for ZURAMPIC. `https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207988lbl.pdf` (besucht am 08. 02. 2019).

(272) Shen, Z.; Yeh, L. T.; Wallach, K.; Zhu, N.; Kerr, B.; Gillen, M. In Vitro and In Vivo Interaction Studies Between Lesinurad, a Selective Urate Reabsorption Inhibitor, and Major Liver or Kidney Transporters. *Clinical Drug Investigation* **2016**, *36*, 443–452.

(273) Jones, G.; Panova, E.; Day, R. Guideline development for the management of gout: role of combination therapy with a focus on lesinurad. *Drug Design, Development and Therapy* **2017**, *Volume 11*, 3077–3081.

(274) Pascart, T.; Lioté, F. Gout: state of the art after a decade of developments. *Rheumatology* **2019**, *58*, 27–44.

(275) Wang, Y.; Liu, L.-M.; Wei, L.; Ye, W.-W.; Meng, X.-Y.; Chen, F.; Xiao, Q.; Chen, J.-Y.; Zhou, Y. Angiopoietin-like protein 4 improves glucose tolerance and insulin resistance but induces liver steatosis in high-fat-diet mice. *Molecular Medicine Reports* **2016**, *14*, 3293–300.

(276) Köster, A.; Chao, Y. B.; Mosior, M.; Ford, A.; Gonzalez-DeWhitt, P. A.; Hale, J. E.; Li, D.; Qiu, Y.; Fraser, C. C.; Yang, D. D.; Heuer, J. G.; Jaskunas, S. R.; Eacho, P. Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* **2005**, *146*, 4943–50.

(277) Kern, P. A.; Di Gregorio, G. B.; Lu, T.; Rassouli, N.; Ranganathan, G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-α expression. *Diabetes* **2003**, *52*, 1779–85.

(278) Yu, S.; Reddy, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2007**, *1771*, 936–951.

(279) Mizukami, J.; Taniguchi, T. The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR γ and CBP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1997**, *240*, 61–4.

(280) Takahashi, N.; Kawada, T.; Yamamoto, T.; Goto, T.; Taimatsu, A.; Aoki, N.; Kawasaki, H.; Taira, K.; Yokoyama, K. K.; Kamei, Y.; Fushiki, T. Overexpression and Ribozyme-mediated Targeting of Transcriptional Coactivators CREB-binding Protein and p300 Revealed Their Indispensable Roles in Adipocyte Differentiation through the Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 16906–16912.

(281) Picard, F.; Géhin, M.; Annicotte, J.-. S.; Rocchi, S.; Champy, M.-F.; O'Malley, B. W.; Chambon, P.; Auwerx, J. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **2002**, *111*, 931–41.

(282) Dominguez, M.; Alvarez, S.; R. de Lera, A. Natural and Structure-based RXR Ligand Scaffolds and Their Functions. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2017**, *17*, 631–662.

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

(284) Macalino, S. J. Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Archives of Pharmacal Research* **2015**, *38*, 1686–1701.

(285) Boerma, L. J.; Xia, G.; Qui, C.; Cox, B. D.; Chalmers, M. J.; Smith, C. D.; Lobo-Ruppert, S.; Griffin, P. R.; Muccio, D. D.; Renfrow, M. B. Defining the communication between agonist and coactivator binding in the retinoid X receptor α ligand binding domain. *Journal of Biological Chemistry* **2014**, *289*, 814–26.

(286) Kawata, K.; Morishita, K.-i.; Nakayama, M.; Yamada, S.; Kobayashi, T.; Furusawa, Y.; Arimoto-Kobayashi, S.; Oohashi, T.; Makishima, M.; Naitou, H.; Ishitsubo, E.; Tokiwa, H.; Tai, A.; Kakuta, H. RXR partial agonist produced by side chain repositioning of alkoxy RXR full agonist retains antitype 2 diabetes activity without the adverse effects. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 912–26.

(287) Epple, R. *et al*. 3,4,5-Trisubstituted Isoxazoles as Novel Pparδ Agonists. Part 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 5488.

(288) Mudaliar, S.; Henry, R. R.; Sanyal, A. J.; Morrow, L.; Marschall, H.; 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.e1.

(289) Merk, D.; Heitel, P.; Faudone, G.; Schmidt, J.; Schubert-Zsilavecz, M. Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses. DE 10 2017 122 062.3, filed September 22, 2017.

(290) Merk, D.; Heitel, P.; Faudone, G.; Schmidt, J.; Schubert-Zsilavecz, M. Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses. PCT/EP2018/075797, filed September 24, 2018.

(291) 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). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2014**, *22*, 2447–2460.

(292) 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. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57*, 8035–8055.

(293) Wu, C.-C.; Baiga, T. J.; Downes, M.; La Clair, J. J.; Atkins, A. R.; Richard, S. B.; Fan, W.; Stockley-Noel, T. A.; Bowman, M. E.; Noel, J. P.; Evans, R. M. Structural basis for specific ligation of the peroxisome proliferator-activated receptor δ. *PNAS* **2017**, *114*, E2563–E2570.

(294) Pirat, C.; Farce, A.; Lebègue, N.; Renault, N.; Furman, C.; Millet, R.; Yous, S.; Speca, S.; Berthelot, P.; Desreumaux, P.; Chavatte, P. Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Development of Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 4027–4061.

(295) Richter, H. G. F.; Benson, G. M.; Blum, D.; Chaput, E.; Feng, S.; Gardes, C.; Grether, U.; Hartman, P.; Kuhn, B.; Martin, R. E.; Plancher, J.-M.; Rudolph, M. G.; Schuler, F.; Taylor, S.; Bleicher, K. H. Discovery of novel and orally active FXR agonists for the potential treatment of dyslipidemia & diabetes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 191–4.

7 Abkürzungsverzeichnis

A Adenin
ABC *engl.* ATP binding cassette
AF Aktivierungsfunktion
AIBN Azobis(*iso*butyronitril)
AK Arbeitskreis
Akt. Aktivierung
AMP Adenosinmonophosphat
ANGPTL4 Angiopoetin-ähnliches Protein 4 (*engl.* angiopoietin-like protein 4)
AP1 Aktivator-Protein 1 (*engl.* activator protein 1)
APO Apolipoprotein
Arg Arginin
ASBT apikaler natriumabhängiger Gallensäurentransporter (*engl.* apical sodium-dependent bile acid transporter)
ATP Adenosintriphosphat
BAAT Gallensäure-CoA:Aminosäure-*N*-Acyltransferase (*engl.* bile acid-CoA:amino acid *N*-acyltransferase)
BACS Gallensäure-CoA-Synthase (*engl.* bile acid coenzyme A synthetase)
BSEP *engl.* bile salt export pump
Bsp. Beispiel
bzw. beziehungsweise
C Cytosin
ca. circa
cAMP zyklisches AMP (*engl.* cyclic AMP)
CAP c-Cbl-assoziiertes Protein (*engl.* c-Cbl-associated protein)
CAR konstitutiver Androstanrezeptor (*engl.* constitutive androstane receptor)
CATS2D *engl.* chemically advanced template search 2 descriptor
CBP CREB-Bindeprotein (*engl.* CREB-binding protein)
CD36 Fettsäuretranslokase (*engl.* cluster of differentiation 36)
CDCA Chenodesoxycholsäure (*engl.* chenodeoxycholic acid)
cDNA komplementäre DNA (*engl.* complementary DNA)
CED chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CMV Cytomegalievirus
CoA Coenzym A
COUP-TFI *engl.* chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I
COX Cyclooxigenase
CPT Carnitin Palmitoyltransferase (*engl.* carnitine palmitoyltransferase)
CREB cAMP Response-Element-Bindeprotein (*engl.* cAMP response element-binding protein)
CYP Cytochrom P450
Cys Cystein
DAX1 *engl.* dosis-sensitive sex reversal-andrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome-1)
DBD DNA-Bindedomäne
DCA Desoxycholsäure (*engl.* deoxycholic acid)
DCE 1,2-Dichlorethan
DCM Dichlormethan
DMAP 4-(Dimethylamino)pyridin
DMF *N*,*N*-Dimethylformamid
DMSO Dimethylsulfoxid
DNA Desoxyribonukleinsäure (*engl.* deoxyribonucleic acid)
DPMA Deutsches Patent- und Markenamt
Dr. Doktor
EA Essigsäureethylester, Ethylacetat
EC_{50} halbmaximale effektive Konzentration (*engl.* effective concentration)
EDC 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EMA Europäische Arzneimittel-Agentur (*engl.* European Medicines Agency)
engl. englisch
EtOH Ethanol

FABP4 Fettsäuren-bindendes Protein 4 (*engl.* fatty acid binding protein 4)
FAS Fettsäuresynthase (*engl.* fatty acid synthase)
FATP Fettsäuretransportprotein (*engl.* fatty acid transport protein)
FDA Arzneimittelbehörde der USA (*engl.* food and drug administration)
FF-MAS *engl.* follicular fluid meiosis-activating sterol
FGF Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*engl.* fibroblast growth factor)
FGFR FGF-Rezeptor
FI Fluoreszenzintensität
FIRST Frankfurt International Research School for Translational Biomedicine
FRET Förster-Resonanzenergietransfer
FXR Farnesoid X Rezeptor
G Guanin
G6Pase Glucose-6-Phosphatase
GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP grün fluoreszierendes Protein
GLUT4 Glucosetransporter Typ 4
GPCR G-Protein-gekoppelter Rezeptor (*engl.* G protein-coupled receptor)
GR Glucocorticoidrezeptor
h human
HDL Lipoprotein hoher Dichte (*engl.* high-density lipoprotein)
His Histidin
HOAc Essigsäure
HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*engl.* high performance liquid chromatography)
i.a. inaktiv
IBABP ileales Gallensäuren-Bindeprotein (*engl.* ileal bile acid binding protein)
IC_{50} halbmaximale inhibitorische Konzentration (*engl.* inhibitory concentration)
ID Identifikator
IDOL *engl.* inducible degrader of the LDL receptor
IL Interleukin
iNOS induzierbare NOS
IP Interferon γ-induzierbares Protein (*engl.* interferon-γ-inducible protein)
ITC isotherme Titrationskalorimetrie (*engl.* isothermal titration calorimetry)
L Leucin
LBD Ligandbindedomäne
LCA Lithocholsäure (*engl.* lithocholic acid)
LCAD langkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase (*engl.* long chain acyl-CoA dehydrogenase)
LDL Lipoprotein niederer Dichte (*engl.* low-density lipoprotein)
LDLR LDL-Rezeptor
Leu Leucin
LPL Lipoproteinlipase
LPS Lipopolysaccharide
LRH1 Leberrezeptor Homolog 1 (*engl.* liver receptor homolog 1)
LXR Leber X Rezeptor
max. maximal
MCP Monozyten-chemotaktisches Protein (*engl.* monocyte chemoattractant protein)
MeOH Methanol
MMP Matrix-Metalloprotease
mRNA Boten-RNA (*engl.* messenger RNA)
MRP *engl.* multidrug resistance-related protein
MS Multiple Sklerose
MW Mikrowelle
NAFLD nichtalkoholische Fettleber (*engl.* non-alcoholic fatty liver disease)
NASH nichtalkoholische Steatohepatitis
NBS *N*-Bromsuccinimid
NCOA1 nukleärer Rezeptor Coaktivator 1 (*engl.* nuclear receptor coactivator 1)
NF-κB nukleärer Faktor κB (*engl.* nuclear factor κB)
NGFIB Nervenwachstumsfaktor IB (*engl.* nerve growth factor IB)

NonO *engl.* non-POU domain-containing octamer-binding protein

NOR1 Neuronen-abgeleiteter Waisenrezeptor 1 (*engl.* neuron-derived orphan receptor 1)

NOS Stickstoffmonoxidsynthase

NR nukleärer Rezeptor

NTCP Na^+/Taurocholat Cotransporter (*engl.* Na^+/taurocholate cotransporting peptide)

NURR1 Nur-verwandter Faktor 1 (*engl.* Nur-related factor 1)

OAT4 organischer Anionentransporter 4

OCA Obeticholsäure (*engl.* obeticholic acid)

OST *engl.* organic solute transporter

PBC primär biliäre Cholangitis

PCR Polymerase-Kettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction)

PCT Vertrag über die Internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (*engl.* patent cooperation treaty)

PDB Protein Data Bank

PDK Pyruvatdehydrogenase-Kinase

PEPCK Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase

PGC-1α PPARγ Coaktivator-1α (*engl.* PPARγ coactivator-1α)

PPAR Peroxisomen Proliferator-aktivierter Rezeptor

Prof. Professor

PXR Pregnan X Rezeptor

qRT-PCR quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*engl.* quantitative real-time polymerase chain reaction)

RA Retinsäure (*engl.* retinoic acid)

RAR Retinsäurerezeptor (*engl.* retinoic acid receptor)

RE Response-Element

rel. relativ

RF Rückfluss

RLU relative Lichteinheit (*engl.* relative light unit)

RNA Ribonukleinsäure (*engl.* ribonucleic acid)

ROR RAR-verwandter Waisenrezeptor (*engl.* RAR-related orphan receptor)

RT Raumtemperatur

RXR Retinoid X Rezeptor

SAR Struktur-Wirkungsbeziehung (*engl.* structure-activity relationship)

SEM Standardfehler des arithmetischen Mittels (*engl.* standard error of the mean)

Ser Serin

SHP *engl.* short heterodimeric partner

SI unterstützende Angaben (*engl.* supporting information)

SOM selbstorganisierende Karte (*engl.* self-organizing map)

SOSA selektive Optimierung von Nebenwirkungen (*engl.* selective optimization of side-activities)

sPPARγM selektiver PPARγ-Modulator

SRC-1 Steroidrezeptor Coaktivator 1 (*engl.* steroid receptor coactivator 1)

SREBP1C *engl.* sterol-regulatory element binding protein 1C

SUMO kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator (*engl.* small ubiquitin-related modifier)

T Thymin

T2DM Diabetes mellitus Typ 2

TFA Trifluoressigsäure (*engl.* trifluoroacetic acid)

THF Tetrahydrofuran

TLR Toll-ähnlicher Rezeptor (*engl.* toll-like receptor)

TNFα Tumornekrosefaktor α

tox. toxisch

TR Thyroidhormonrezeptor

TR-FRET zeitaufgelöster FRET (*engl.* time-resolved FRET)

TRIP Translational Research Innovation - Pharma

Tyr Tyrosin

UCP	Thermogenin (*engl.* uncoupling protein)
URAT1	Harnsäuretransporter 1 (*engl.* uric acid transporter 1)
VDR	Vitamin D Rezeptor
VL	Volllänge
VLDL	Lipoprotein sehr niedriger Dichte (*engl.* very-low-density lipoprotein)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

Bemerkungen:
Sofern gebräuchlich sind deutsche Übersetzungen der englischen Abkürzungen angegeben. SI-Einheiten sind nicht aufgeführt.

8 Abbildungsverzeichnis

1.1 Aufbau von nukleären Rezeptoren . . . 10
1.2 Strukturelle Basis des Funktionsprinzips nukleärer Rezeptoren . . . 10
1.3 Molekularer Mechanismus eines nukleären Rezeptors . . . 11
1.4 LXR als Regulator des reversen Cholesteroltransports . . . 15
1.5 Endogene LXR-Agonisten . . . 18
1.6 Synthetische LXR-Modulatoren . . . 18
1.7 FXR als Regulator der Gallensäurehomöostase . . . 20
1.8 Natürliche FXR-Agonisten . . . 23
1.9 Synthetische FXR-Modulatoren . . . 23
1.10 Physiologische Rolle der PPARs . . . 25
1.11 Natürliche PPARγ- und PPARδ-Agonisten . . . 28
1.12 Synthetische PPARγ-Modulatoren . . . 29
1.13 Synthetische PPARδ-Modulatoren . . . 30
1.14 RXR als Regulator vieler physiologischer Prozesse . . . 31
1.15 Natürliche RXR-Agonisten . . . 34
1.16 Synthetische RXR-Agonisten . . . 34
1.17 RXR-Antagonisten . . . 35

2.1 Chemische Struktur von Lesinurad . . . 37
2.2 Leitstrukturen zur Optimierung von RXR-Agonisten . . . 38
2.3 Leitstruktur zur Entwicklung dualer PPARδ/FXR-Agonisten . . . 39

3.1 Visualisierte selbstorganisierende Karte . . . 41
3.2 Schematischer Aufbau des Gal4-Hybrid-Reportergenassays . . . 42
3.3 *In vitro* DrugBank-Screening nach LXR-Aktivität . . . 42
3.4 Dosis-Wirkungsbeziehung von 9-*cis*-Retinsäure und Bexaroten . . . 43
3.5 Kompetition von 9-*cis*-Retinsäure und Bexaroten mit literaturbekannten LXR-Agonisten 44
3.6 Struktur und Docking Lesinurads in PPARγ . . . 45
3.7 *In vitro* Screening von Lesinurad auf nukleären Rezeptoren . . . 46
3.8 PPARγ-Volllängen-Reportergenassay . . . 47
3.9 Lesinurad fördert keine Fettakkumulation in 3T3-L1 Adipozyten . . . 48
3.10 Expression PPARγ-regulierter Gene nach Inkubation mit Lesinurad . . . 48
3.11 Lesinurad-vermittelte Coaktivatorrekrutierung . . . 49
3.12 Struktur der RXR-Leitstrukturen und Docking in der RXRα-LBD . . . 52
3.13 Selektivitätsprofil von RXR-Leitstruktur und optimierter Verbindung . . . 58
3.14 Verbindung **89** vermittelte die Aktivierung permissiver RXR-Heterodimere . . . 58
3.15 Effekte von **89** auf die Expression von RXR-Zielgenen . . . 59
3.16 Leitstruktur zur Entwicklung dualer PPARδ/FXR-Agonisten . . . 60
3.17 Graphische Darstellung der pEC_{50}-Werte an PPARδ und FXR . . . 70
3.18 PPAR-Selektivitätsprofil dual aktiver PPARδ/FXR-Agonisten . . . 71

4.1 Optimierung der RXR-Leitstrukturen . . . 75

4.2 Systematische SAR-Untersuchungen von Leitstruktur **50** 76

9 Schemenverzeichnis

3.1 Synthese von RXR-Agonisten nach Route A 53
3.2 Synthese von RXR-Agonisten nach Route B 53
3.3 Synthese von RXR-Agonisten nach Route C 54
3.4 Synthese von dualen PPARδ/FXR-Modulatoren nach Route A 61
3.5 Synthese von dualen PPARδ/FXR-Modulatoren nach Route B 62
3.6 Synthese von Baustein **169c** 62
3.7 Synthese 4-substituierter 2-Nitrobenzoesäuren 63
3.8 Reduktion von Methoxyverbindungen zu Hydroxyderivaten 63
3.9 Darstellung von 2*H*-Chromen-3-carbonsäuren 64
3.10 Synthese 4-Heteroaryl-substituierter Benzoesäurederivate 64
3.11 Darstellung 4-(Is-)oxazol-substituierter Benzoesäuren 64

10 Tabellenverzeichnis

1.1 Weitere nukleäre Rezeptoren mit Beteiligung an entzündlichen Prozessen 13

3.1 RXR-Leitstrukturoptimierung in der sauren Kopfgruppe 54
3.2 RXR-Leitstrukturoptimierung in der Linkereinheit 55
3.3 RXR-Leitstrukturoptimierung in der Phenoxygruppe 56
3.4 Kombination struktureller Motive von RXR-Agonisten mit verbesserter Potenz 57
3.5 PPARδ/FXR-Leitstrukturoptimierung in der sauren Kopfgruppe 65
3.6 PPARδ/FXR-Leitstrukturoptimierung des Anthranilsäuregerüsts 67
3.7 PPARδ/FXR-Leitstrukturoptimierung des lipophilen Acylsubstituenten mit 2*H*-Chromenen 68
3.8 PPARδ/FXR-Leitstrukturoptimierung des lipophilen Acylsubstituenten mit Biarylen . 69

A.1 Humane nukleäre Rezeptoren 277

11 Publikationsliste

Dieser Arbeit zugrunde liegende Publikationen

- **Heitel, P.**; Gellrich, L.; Kalinowsky, L.; Heering, J.; Kaiser, A.; Ohrndorf, J.; Proschak, E.; Merk, D. Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *10*, 203–208.

  Eigener Beitrag: *in vitro* Screening der virtuellen Hits im Reportergenassay, Synthese der RXR-Liganden und deren Charakterisierung in Reportergenassays sowie Durchführung der Zielgen-Quantifizierung, der Toxizitätsassays und Verfassen des Manuskriptes.

  L.G. führte die isotherme Titrationskalorimetrie durch. L.K. und E.P. führten die *in silico* Studien durch. J.H. klonierte die RXR-Gal4-Plasmide. A.K. und J.O. maßen die Reinheit der Zielverbindungen, bestimmten die Löslichkeit und die Lipophilie. D.M. leitete das Projekt.

- **Heitel, P.**; Gellrich, L.; Heering, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulator (sPPARγM) in Vitro *Scientific Reports* **2018**, *8*, 13554.

  Eigener Beitrag: *in vitro* Charakterisierung von Lesinurad mit Reportergenassays, Präparation von cDNA-Proben aus humanen HepG2 Zellen, Quantifizierung der Zielgenexpression aus humanen und murinen Zellen mit qRT-PCR, Auswertung aller Daten und Erstellen der Abbildungen.

  J.H. führte den Coaktivator-Rekrutierungsassay durch. L.G. führte die isotherme Titrationskalorimetrie durch. T.G. und A.K. differenzierten murine Adipozyten und stellten daraus cDNA-Proben her. E.P. und D.M. führten die *in silico* Studien und die Strukturanalyse durch. D.M. und P.H. erstellten die Abbildungen. M.S.Z. und D.M. entwarfen das Projekt. D.M. leitete das Projekt, interpretierte die Daten und verfasste das Manuskript.

- Merk, D.; **Heitel, P.**; Faudone, G.; Schmidt, J.; Schubert-Zsilavecz, M. Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses. PCT/EP2018/075797, filed September 24, 2018.

  Eigener Beitrag: Synthese des überwiegenden Anteils der dualen Agonisten sowie Charakterisierung aller Liganden im Reportergenassay, Betreuung der Masterarbeit von G.F. zur Synthese der verbleibenden dualen Wirkstoffe.

  G.F. synthetisierte die Verbindungen **134**-**140** und **142**-**147**. J.S. und P.H. testeten alle Zielverbindungen im FXR-Volllängenassay. M.S.Z. und D.M. entwarfen und leiteten das Projekt.

- Merk, D.; **Heitel, P.**; Faudone, G.; Schmidt, J.; Schubert-Zsilavecz, M. Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses. DE 10 2017 122 062.3, filed September 22, 2017.

  Eigener Beitrag: Synthese des überwiegenden Anteils der dualen Agonisten sowie Charakterisierung aller Liganden im Reportergenassay, Betreuung der Masterarbeit von G.F. zur Synthese der verbleibenden dualen Wirkstoffe.

G.F. synthetisierte die Verbindungen **134**-**140** und **142**-**147**. J.S. und P.H. testeten alle Zielverbindungen im FXR-Volllängenassay. M.S.Z. und D.M. entwarfen und leiteten das Projekt.

- **Heitel, P.**; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017**, *27*, 1193–1198.

  Eigener Beitrag: Durchführung des *in vitro* Screenings, der Reportergenassays und Verfassen des Manuskriptes.

  J.A., D.Mo. und E.P. führten die *in silico* Studien durch. D.Me. leitete das Projekt.

Weitere Publikationen

- Schierle, S.; Flauaus, C.; **Heitel, P.**; Willems, S.; Schmidt, J.; Kaiser, A.; Weizel, L.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Geisslinger, G.; Steinhilber, D.; Wurglics, M.; Rovati, G.; Schmidtko, A.; Proschak, E.; Merk, D. Boosting Anti-Inflammatory Potency of Zafirlukast by Designed Polypharmacology *Journal of Medicinal Chemistry*, **2018**, *61*, 5758–5764.

  Eigener Beitrag: Quantifizierung der Zielgene durch qRT-PCR.

- Flesch, D.; Cheung, S.; 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. Nonacidic Farnesoid X Receptor Modulators *Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *60*, 7199–7205.

  Eigener Beitrag: Durchführung der Reportergenassays für das Selektivitätsscreening.

- Proschak, E.; **Heitel, P.**; Kalinowsky, L.; Merk, D. Opportunities and Challenges for Fatty Acid Mimetics in Drug Discovery *Journal of Medicinal Chemistry*, **2017**, *60*, 5235–5266.

  Eigener Beitrag: Verfassen des Kapitels „Case Study: Medicinal Chemistry of Cysteinyl Leukotriene Receptor 1 (CysLT1) Antagonists“.

Weitere Publikationen (vor Beginn der Dissertation)

- Yilmazer, N.D.; **Heitel, P.**; Schwalbe, T.; Korth, M. Benchmark of Electronic Structure Methods for Protein–Ligand Interactions Based on High-Level Reference Data *Journal of Theoretical & Computational Chemistry*, **2015**, *14*, 1540001.

Sonstige Publikationen

- **Heitel, P.**, Merk, D. Gemeinsam effektiver – wenn zwei Liganden in eine Bindetasche binden *Pharmakon*, **2016**, *4*, 300–301.

- Cheung, S.Y.; Hanke, T.; **Heitel, P.**; Merk, D.; Schubert-Zsilavecz, M. Neue Antibiotika: Innovationen gegen Resistenzen *Pharmazeutische Zeitung*, **2015**, *46*.
- **Heitel, P.**; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Medicinal Chemistry and Pharmacology of Female Sexual Hormones *Pharmakon*, **2015**, *3*, 461–472.
- **Heitel, P.**; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Ebola: Die Infektion stoppen *Pharmazeutische Zeitung*, **2015**, *30*.

12 Kooperationspartner

Sofern nicht anders durch Quellenangabe oder Danksagung angegeben, wurde die vorgelegte Arbeit von mir unter der Aufsicht meiner Betreuer während meines Promotionsstudiums erstellt. Alle Beiträge von Kollegen sind explizit in dieser Dissertation gekennzeichnet. Nachfolgend aufgelistetes Material wurde im Zusammenhang einer kollaborativen Forschung erhalten:

Identifikation von Alitretinoin und Bexaroten als LXR-Liganden

- Abbildung 3.1: Visualisierte selbstorganisierende Karte, Dr. Janosch Achenbach, Dr. Daniel Moser und Prof. Dr. Ewgenij Proschak, AK Prof. Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, Programmierung der SOM, Virtuelles Screening der DrugBank und Visualisierung der SOM.

Charakterisierung von Lesinurad als selektiver PPARγ-Modulator

- Abbildung 3.6b: Docking Lesinurads in PPARγ, Dr. Daniel Merk und Prof. Dr. Ewgenij Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, Molekulares Docking von Lesinurad in die PPARγ-LBD und Erstellen des Bildausschnitts.
- Abbildung 3.9: Lesinurad fördert keine Fettakkumulation in 3T3-L1 Adipozyten, Tamara Göbel und Dr. Astrid Kahnt, AK Prof. Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, Kultur, Differenzierung und Anfärbung der 3T3-L1 Zellen, sowie die Isolation der mRNA und Transkription in cDNA.
- Abbildung 3.11: Lesinurad-vermittelte Coaktivatorrekrutierung, Dr. Jan Heering, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Frankfurt, Entwicklung des Rekrutierungsassays, Durchführung und Auswertung, eigener Anteil: Erstellung der Abbildung, Berechnung der EC_{50}-Werte.
- ITC-Experimente: Durchführung und Auswertung durch Leonie Gellrich, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt; rekombinante PPARγ-LBD bereitgestellt durch Dr. Jan Heering, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Frankfurt.

Entwicklung einer neuen Strukturklasse von RXR-Agonisten

- Abbildung 3.12b,c: Molekulares Docking von RXR-Agonisten in hRXRα, Lena Kalinowsky, AK Prof. Proschak, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, Molekulares Docking der Verbindungen **48**, **88** und **89** in die RXRα-LBD und Erstellen der Bildschirmfotos.
- ITC-Experimente: Durchführung und Auswertung durch Leonie Gellrich, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt; rekombinante RXRα-LBD bereitgestellt durch Dr. Jan Heering, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Frankfurt.
- Klonierung der Plasmide pFA-CMV-RXRα-Gal4, pFA-CMV-RXRβ-Gal4 und pFA-CMV-RXRγ-Gal4: Dr. Jan Heering, Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie IME, Frankfurt.

- Reinheitsanalysen mittels HPLC, Bestimmung der Lipophilie und Löslichkeit: Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt.

Duale Liganden von PPARδ und FXR zur Behandlung von NASH

- Synthese der Testsubstanzen **134**-**140**, **142**-**147**: Giuseppe Faudone, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt, eigener Beitrag: Betreuung der Masterarbeit, Syntheseplanung und Auswertung der Analytik.
- Reinheitsanalysen mittels HPLC, Bestimmung der metabolischen Stabilität und Löslichkeit: Astrid Kaiser und Julia Ohrndorf, AK Prof. Schubert-Zsilavecz, Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt.

Die folgenden Teile der Dissertation wurden zuvor veröffentlicht:

- Abbildung 3.16b: Leitstruktur zur Entwicklung dualer PPARδ/FXR-Agonisten, bearbeitet nach [256], Genehmigung durch Elsevier erteilt.
- Die Rechte zum Nachdruck aller Originalpublikationen wurden eingeholt: [257], [264] keine Erlaubnis notwendig; [283] Copyright 2019 American Chemical Society.

13 Curriculum Vitae

Der Inhalt dieser Seite wurde aus Datenschutzgründen entfernt.

14 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

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

Frankfurt am Main, den .....

Pascal Heitel

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation über die

Entwicklung antientzündlicher Liganden nukleärer Rezeptoren

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

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

Frankfurt am Main, den .....

Pascal Heitel

15 Danksagung

Das Verfassen einer Dissertation ist eine große Aufgabe, die ohne die Hilfe besonderer Menschen nicht hätte bewältigt werden können. Deshalb möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen an

- meinen Doktorvater **Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavecz**, der mich in seinem Arbeitskreis aufgenommen und als Betreuer meine Dissertation ermöglicht hat. Vielen Dank für die Unterstützung in fachlicher wie auch menschlicher Hinsicht und die Erfahrungen, welche ich in spannenden wissenschaftlichen Projekten, Tagungen und Arbeitskreisseminaren in Aigen sammeln durfte. Außerdem danke ich ihm für inspirierende Diskussionen und Hilfestellungen bei wissenschaftlichen Problemen.
- meinen Co-Betreuer **Prof. Dr. Dieter Steinhilber**, für seine fachliche Unterstützung sowie die großzügige Bereitstellung von Geräten und Materialien. Darüber hinaus danke ich allen seinen Mitarbeitern für die tolle Zusammenarbeit und gute Stimmung im Institut.
- alle **Gutachter**, für die sorgfältige Bewertung meiner Arbeit.
- **Dr. Daniel Merk**, dem mein besonderer Dank für die Betreuung meiner Promotion gilt. Vielen Dank für die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und Tipps in kniffligen Situationen. Ihm habe ich nicht nur das Erlernen biochemischer Methoden zu verdanken, sondern auch die Förderung meiner wissenschaftlichen Karriere.
- **Prof. Dr. Ewgenij Proschak** und seinen Mitarbeitern, für die tolle Zusammenarbeit bei *in silico* Methoden und den Austausch von Geräten & Materialien.
- meine lieben Kollegen. **Astrid Kaiser** und **Julia Ohrndorf** danke ich für die Testung der Reinheit, Löslichkeit, metabolischer Stabilität und logP-Bestimmungen. Vielen Dank für zahlreiche grüne Stempel! Bei **Dr. Mario Wurglics** bedanke ich mich für die Regelung vieler organisatorischer Dinge, Unterstützung der Lehre, Kontrolle der Analytik sowie für sein allzeit offenes Ohr bei Problemen.
- meine Korrektoren **Katrin Häfner**, **Doris Heitel**, **Moritz Helmstädter** und **Julius Pollinger**, für das sorgfältige Aufdecken meiner Fehler, was die Dissertation aufgewertet hat.
- all meine **Kollegen**, für die super Stimmung und gegenseitige Hilfe. Vielen Dank für die Aufmunterung, wenn es mal nicht genau nach Plan lief und die tolle Atmosphäre bei der Arbeit und danach! Danke an Dr. Jurema Schmidt, Sun-Yee Cheung, Leonie Gellrich, Simone Schierle, Julius Pollinger, Moritz Helmstädter und Giuseppe Faudone. Mein besonderer Dank gilt Moritz Helmstädter für die Zeit auf dem Rad und im Schwimmbad, um Stress ab- und Muskeln aufzubauen!
- meine **Familie und Freundin**, für den bedingungslosen Rückhalt. Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die es mir ermöglicht haben, zu studieren und nun zu promovieren.
- alle, die ich auf dieser Liste nicht erwähnt habe.

Frankfurt am Main, Februar 2019 *Pascal Heitel*

16 Nachdrucke der Publikationen

16.1 DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators

Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017**, *27*, 1193–1198.

Reprinted with permission from Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2017**, *27*, 1193–1198. Copyright (2017) Elsevier Ltd. All rights reserved.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27 (2017) 1193–1198

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

DrugBank screening revealed alitretinoin and bexarotene as liver X receptor modulators

Pascal Heitel, Janosch Achenbach, Daniel Moser, Ewgenij Proschak, Daniel Merk *

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

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 December 2016
Revised 20 January 2017
Accepted 23 January 2017
Available online 25 January 2017

Keywords:
Nuclear receptors
Liver X receptor
Alitretinoin
Bexarotene
SOSA

ABSTRACT

In silico screening of DrugBank database to detect liver X receptor (LXR) agonism of marketed drugs using a self-organizing map and successive LXR-Gal4 hybrid reporter gene assay evaluation *in vitro* discovered alitretinoin and bexarotene as partial liver X receptor agonists. Dose-response curves demonstrated that plasma concentrations observed in clinical trials are sufficient for LXR activation and thus could account for LXR-mediated side-effects such as hypercholesterolemia and hyperlipidemia. The discovered drugs are the first reported dual LXR/RXR agonists and can serve as lead structures for LXR and dual LXR/RXR modulator development.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Liver X receptor (LXR) is a ligand-activated transcription factor and member of the nuclear receptor superfamily. It exists in two isoforms[1–4] with LXRα mainly expressed in liver, intestine, kidney, and adipose tissue and LXRβ occurring ubiquitously.[5,6] Like many other nuclear receptors, LXR often forms permissive heterodimers with retinoid X receptor (RXR) that can be activated by agonists of either partner.[5,7,8] Endogenous LXR ligands (Scheme 1) are oxysterols such as 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**), 24(*S*)-hydroxycholesterol (**2**), and 24(*S*),25-epoxycholesterol (**3**)[8–10] according to the receptors' crucial role in cholesterol homeostasis. Furthermore, several synthetic dual LXRα/β agonists such as T0901317 (**4**),[11] GW3965 (**5**),[12] and WAY252623 (**6**)[13] have been developed.

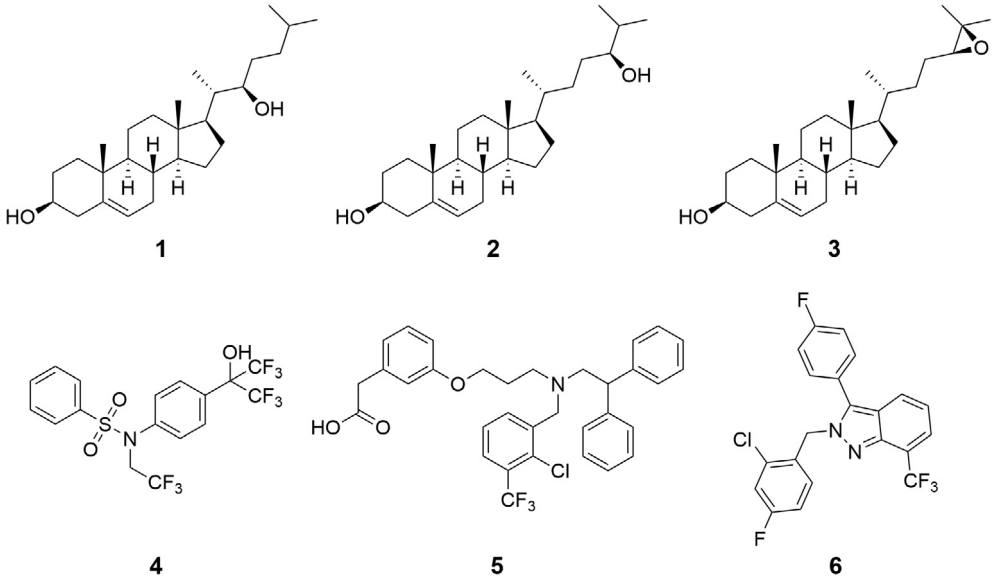
Upon activation, LXR induces the transcription of several genes involved in cholesterol and lipid transport and metabolism but also affects glucose homeostasis, inflammatory processes and cell proliferation.[14] LXRα knockout in mice has demonstrated that the receptor is crucial for cholesterol balance.[15] Mediated in part via induction of ATP-binding cassette transporter ABCA1, LXR induces reverse cholesterol transport from peripheral cells into liver through high-density lipoprotein (HDL) and decreases intestinal cholesterol absorption.[16] For this desirable activity, LXR evolves as a target for treating cholesterol dysbalance in metabolic syndrome and related disorders. In addition to its role in cholesterol and lipid metabolism, LXR is also involved in glucose homeostasis.[17] Treatment of mice with GW3965 (**5**) suppressed gluconeogenesis in the liver and enhanced glucose utilization. In a murine model of diet-induced obesity and insulin resistance, GW3965 (**5**) enhanced glucose tolerance. However, mice lacking LXRα revealed diminished levels of proteins associated with lipogenesis such as fatty acid synthase, stearyl-CoA desaturase-1, and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) in the liver underlining the involvement of LXR in lipid balance.[15] Moreover, LXR activation by T0901317 (**4**) induced expression of major fatty acid biosynthetic genes.[11] Accordingly, undesirable effects such as hyperlipidemia and liver steatosis emerged in preclinical studies of synthetic LXR agonists T0901317 (**4**) and GW3965 (**5**).[11,18] These findings suggest that unwanted effects of marketed drugs related to cholesterol and lipid metabolism could possibly be mediated by LXR activation.

Our attempt to discover such effects was driven by two reasons: first, understanding of drug-related side-effects is of utmost importance and second, known drugs with LXR modulatory activity might be a starting point for selective optimization of side activities (SOSA),[19] leading to novel LXR modulating agents.

Several studies have reported that machine learning is an effective method to predict the off-target activities of drugs and diverse techniques have been used for this purpose, their advantages and challenges have been excessively reviewed.[20] Among others, self-organizing maps (SOMs) provide an attractive possibility for target identification.[21] SOMs are classified as unsupervised neuronal networks and were first reported by Kohonen.[22] A special feature of SOMs is the projection of multidimensional data to a two-dimensional grid which is suitable for visual inspection by the user. In principle, target prediction by SOMs is based on the assumption

* Corresponding author.
E-mail address: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de (D. Merk).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.066
0960-894X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Scheme 1. Physiological (**1**–**3**) and synthetic (**4**–**6**) liver X receptor agonists. 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**), 24(*S*)-hydroxycholesterol (**2**), 24(*S*),25-epoxycholesterol (**3**), T0901317 (**4**), GW3965 (**5**) and WAY252623 (**6**).

that similar molecules exhibit similar biological activities.[23] Based on one data set containing the structures of drugs, and another data set containing compounds that interact with the target of interest (known actives), both represented by multidimensional descriptor, a SOM provides a two-dimensional, neighborhood-preserving projection of these datasets. The visual inspection of the projected data, also referred to as the map, allows the identification of drugs that are projected in direct neighborhood of known actives as potential ligands for the target of interest.

In order to identify drugs that might interact with LXR, we generated a SOM from two datasets. The first dataset contained 1280 FDA-approved drugs with MW < 600 Da extracted from DrugBank[24] (version 4.0, http://www.drugbank.ca/). The second dataset comprised 458 LXR agonists with EC_{50} values below 10 μM collected from ChemblDB.[25] Prior to descriptor calculation, all compounds were prepared by addition of explicit hydrogens, deprotonation of strong acids and protonation of strong bases performed by the so-called 'wash' function of the Molecular Operating Environment (MOE, www.chemcomp.com, Chemical Computing Group Inc., Montreal, Canada) provided as KNIME (Konstanz Information Miner, www.knime.org) node. Subsequently, the topological pharmacophore-based CATS2D descriptor was calculated from all active compounds.[26] Briefly, by CATS2D a potential pharmacophore feature (hydrogen-bond donor or acceptor, positively or negatively charged, lipophilic or aromatic) is assigned to each atom of the molecule. Then, the shortest topological distances ranging from 1 to 10 bonds between each pair of such features are counted and saved in a 210-dimensional vector. The CATS2D descriptor was calculated using the MOE implementation of the original CATS2D algorithm provided as a KNIME node. We then used our in-house KNIME node implementation of a SOM to project the 210-dimensional feature space of the CATS2D descriptor on a two-dimensional neuronal network, where a neuron is connected to four other neurons to form a toroid neuron grid with a fixed rectangular topology. Each neuron is initialized with a random weight vector of the same dimension as the input data described by the CATS vector. The background dataset of DrugBank compounds was merged with the LXR agonist dataset and used as combined training set for the SOM. The SOM was initialized with 100 neurons (10 × 10). The training consisted of two steps, a competitive and an adaptive step, which were repeated over 100 iterations, so-called 'training epochs'. For the competitive step, we randomly chose an input vector, presented it to the network and determined the 'winner neuron' defined as the neuron whose weight vector displayed the lowest distance to the input vector. For the adaptive step, we updated the weight vectors of all neurons; each weight vector was moved toward the input vector, whereby the movement range was defined by a neighborhood function and the map topology. Training quality was evaluated by the mean quantization error (MQE) tendency during the training progress. The SOM neuron adaptation reached a MQE steady state after about 30 epochs indicating sufficient training iterations. Projection view of the SOM indicates a clear clustering of LXR agonists in certain regions (Fig. 1). After the training, the map was visually inspected (Fig. 1 and Table 1), and drugs located on neurons populated with known LXR ligands were selected for *in vitro* investigation (Fig. 2A).

Drugs **7**–**17** were then evaluated in a Gal4-hybrid reporter gene assay in HEK293 cells transiently transfected with three assay plasmids. The reporter construct coded for a constitutively expressed (CMV promoter) fusion protein consisting of the LXR ligand binding domain (LBD) and the Gal4 DNA binding domain (DBD). A firefly luciferase under the control of a Gal4 response element served as reporter. For transfection efficiency and toxicity control, a constitutively expressed (SV40 promoter) renilla luciferase was co-transfected. In this assay setting, only the LXR ligand binding domain is present and thus true LXR ligands can be distinguished from agents that activate the LXR-RXR heterodimer via RXR. Amongst the candidate hits from the virtual screening, only 9-*cis*-retinoic acid (**13**, 9-*cis*-RA, alitretinoin, trade names: Toctino®, Panretin®) could be confirmed *in vitro* as LXR agonist with low intrinsic activation efficacy.

Rescreening of the DrugBank using the MOE similarity tool (MOE 2015.10) with typed graph distance fingerprints (FP:TGD) at a Tanimoto cutoff of 0.95 with the initial hit **13** as template retrieved bexarotene (**18**), tretinoin (**19**) and isotretinoin (**20**) as potential hits. This rescreening method was selected because the MOE typed graph distances similarity search strongly resembles the CATS2D descriptor used in the SOM. The three additional hits were also characterized in the Gal4-hybrid reporter gene assay and bexarotene (**18**, trade name: Targretin®) exhibited partial LXR agonism, as well. In the initial SOM, bexarotene (**18**) was located on neuron 55 which contained no known LXR ligands but

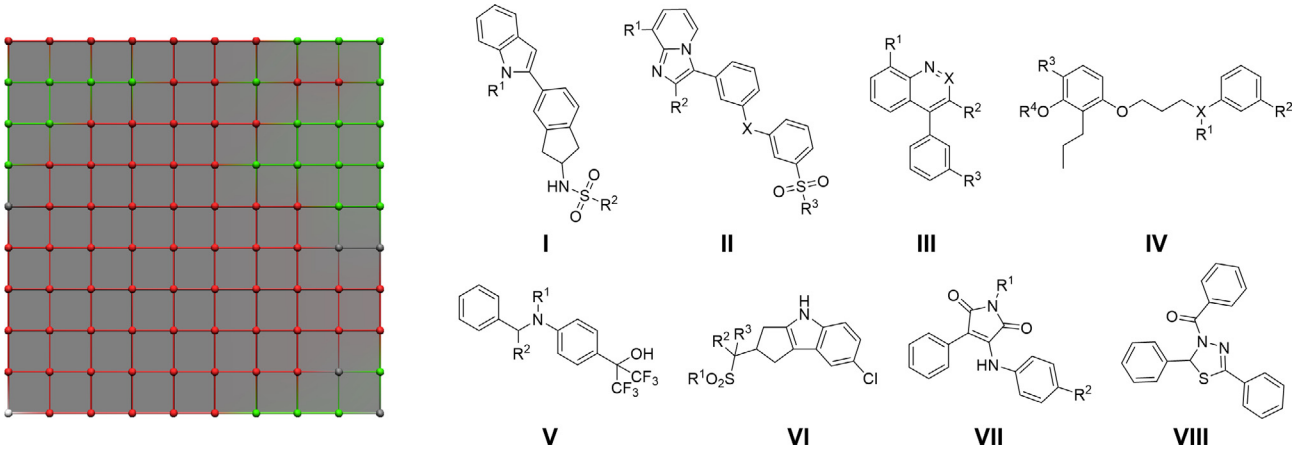
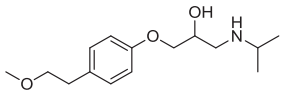
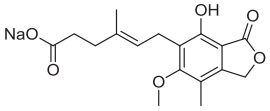
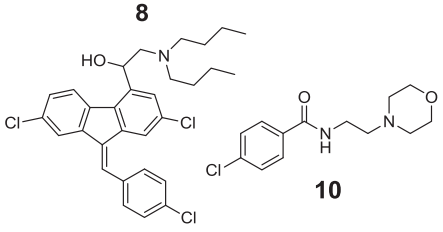
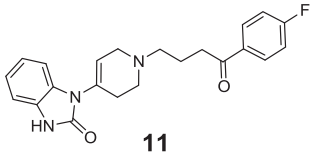
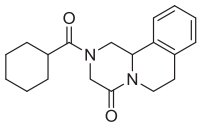
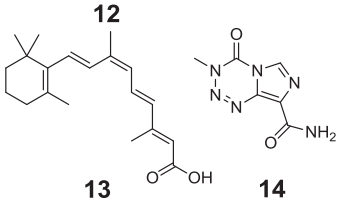


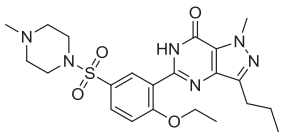
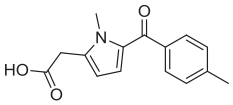
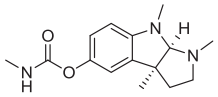
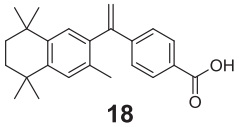
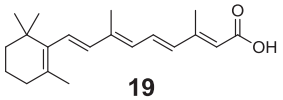
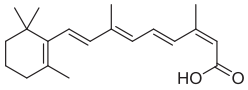
Fig. 1. Visualized neuronal map and known LXRβ ligand scaffolds which were located on the same neurons as DrugBank molecules. Red color indicates neurons populated with majority of approved drugs, while green neurons are indicating an activity island populated with LXR agonists. Please note that due to toroidal topology green neurons are connected to one contiguous cluster, not three distinct clusters.

Table 1
DrugBank hits obtained after visual inspection of the neuronal map and the respective scaffolds corresponding to LXR ligands which were assigned to the same neuron as well as rescreening hits.

Neuron	DrugBank Hits	Structures	Associated LXR ligand scaffolds (number of matches)
60	Metoprolol	 7	I[27,28] (6), III[29] (3), V[30] (2)
70	Mycophenolate	 8	I-VIII[27–35] (3,2,10,4,6,1,1,2)
71	Lumefantrine, Moclobemide	 9 10	III[29] (4), IV[32] (I)
77	Droperidol	 11	III-V[29,30,32] (3,1,2), VII[34] (1)
79	Praziquantel	 12	I[27,28] (1), VI[33] (1)
80	Alitretinoin, Temozolomide	 13 14	II-V[29–32] (2,2,1,5)

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Neuron	DrugBank Hits	Structures	Associated LXR ligand scaffolds (number of matches)
81	Sildenafil	 **15**	I[27,28] (2), III[29] (6), IV[32] (1), V[30] (2), VII[34] (2), VIII[35] (2)
83	Tolmetin	 **16**	I[27,28] (1), III-VI[29–33] (4,5,5,2)
86	Physostigmine	 **17**	I[27,28] (5), III-VIII[29,30,32–35] (3,5,5,5,1,1)
Hits found in the rescreening	Bexarotene, Tretinoin, Isotretinoin	 **18**  **19**  **20**	–

directly neighbored neuron 66 which was populated only by LXR ligands from the training data. Therefore, **18** was missed in the SOM screening although it displays high similarity to known LXR ligands.

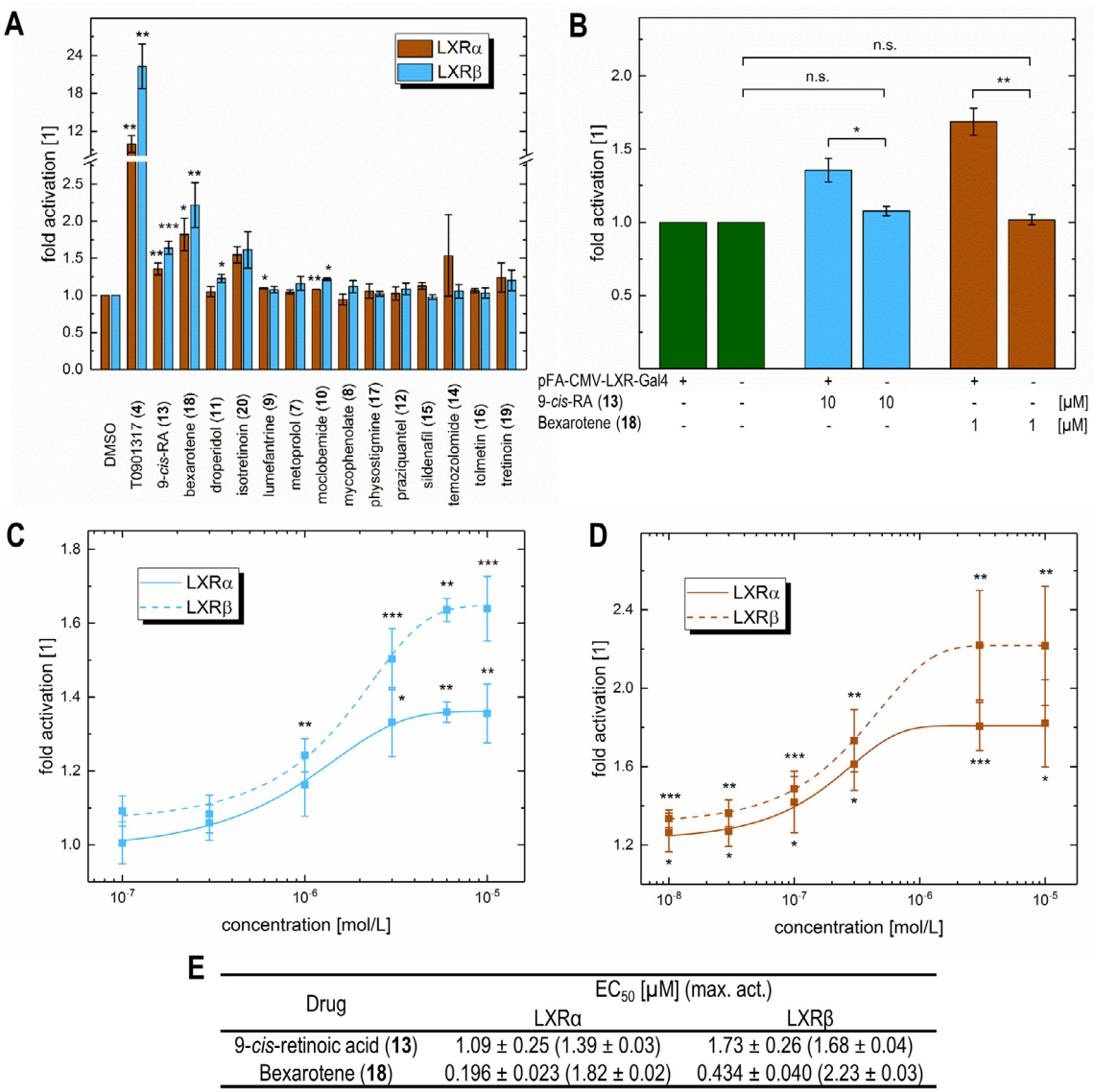
To exclude a false positive or amplified signal by any unspecific cellular mechanism in the transactivation assay that was not mediated by the LXR-Gal4 fusion receptor, we first repeated the experiment without transfecting the pFA-CMV-LXRα-Gal4 plasmid constitutively expressing the LXRα-Gal4 fusion protein (Fig. 2B). Under these conditions, neither of the agonists **13** and **18** caused reporter transactivation confirming that the effect was mediated by the LXR fusion receptor.

Closer evaluation of both 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) with dose-response curves in the reporter gene assay revealed partial agonistic activity without subtype selectivity for LXRα or LXRβ (Fig. 2C). 9-*cis*-RA (**13**) exerted LXR activation with EC_{50} values of 1.09 (LXRα) and 1.73 μM (LXRβ) while bexarotene (**18**) possessed higher potency with EC_{50} values of 0.196 and 0.434 μM on LXRα and LXRβ, respectively (Fig. 2D).

Subsequently, we studied a potential competitive behavior of 9-*cis*-RA (**13**) or bexarotene (**18**) with known LXR agonists in the reporter gene assay (Fig. 3). 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) were co-incubated with LXR agonists GW3965 (**5**) and WAY252623 (**6**) at concentrations above the EC_{80} for each compound (dose–response curves for each compound can be found in the SI). 9-*cis*-RA (**13**) at 10 μM and bexarotene (**18**) at 1 μM remarkably antagonized LXRα activation by **5** and **6** at 3 or 10 μM each confirming the partial LXR agonistic nature of **13** and **18** which act as partial antagonists in presence of full agonists such as **5** and **6** (Fig. 3A). In contrast, when co-incubated with the endogenous partial LXR agonist 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**)[8] at 10 or 20 μM (Fig. 3B), 9-*cis*-RA (**13**) at 10 μM and bexarotene (**18**) at 1 μM caused additive activation of LXRα and this synergistic LXRα activation by 9-*cis*-RA (**13**) and 22(*R*)-OH-Chol (**1**) was not compromised by the RXR antagonist HX531 (**21**, Fig. 3C).[36]

In conclusion, our results characterize 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) as LXR modulators. In LXR-specific Gal4 hybrid reporter gene assays, we demonstrated that both drugs are partial agonists on both subtypes LXRα and LXRβ. Importantly, the hybrid reporter gene assays are independent from LXR's heterodimer partner RXR since reporter gene expression only relies on a monomeric LXR-Gal4 fusion receptor. Consequently, no transactivation signal was detectable for **13** or **18** when the plasmid coding for the LXR-Gal4 fusion protein was not co-transfected with the reporter gene DNA thus excluding unspecific as well as RXR-dependent reporter gene transactivation. 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) exerted partial LXR antagonistic behavior in presence of synthetic full LXR agonists GW3965 (**5**) and WAY252623 (**6**) whereas synergistic partial agonism was observed in combination with the endogenous partial LXR agonist 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**). These additive effects were not mediated via RXR since addition of RXR antagonist HX531 (**21**) did not disturb the additive reporter transactivation caused by 9-*cis*-RA (**13**) and 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**). Hence, 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) differently modulate LXR activation depending on the presence of other LXR ligands and their synergistic effect on cholesterol-mediated LXR activation might have physiological relevance.

9-*cis*-RA (**13**) has been approved for oral treatment of chronic hand eczema in several countries. However, a phase III trial with 1032 patients receiving 9-*cis*-RA (**13**) orally (30 mg once daily over 24 weeks) reported a maximal plasma concentration of 243.2 ng/mL (0.81 μM) accompanied by increased serum cholesterol (14%



E

Drug	EC_{50} [μM] (max. act.) LXRα	LXRβ
9-*cis*-retinoic acid (**13**)	1.09 ± 0.25 (1.39 ± 0.03)	1.73 ± 0.26 (1.68 ± 0.04)
Bexarotene (**18**)	0.196 ± 0.023 (1.82 ± 0.02)	0.434 ± 0.040 (2.23 ± 0.03)

Fig. 2. (A) LXR-Gal4 hybrid transactivation assay DrugBank screening of approved drugs using literature agonist T0901317 (**4**) as positive control revealed alitretinoin (9-*cis*-retinoic acid, 9-*cis*-RA, **13**) as partial LXR agonist. All compounds were tested with a concentration of 10 μM. Results are expressed as mean ± SEM, n ⩾ 2; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant. (B) Fold reporter transactivation of 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) in HEK293 cells transfected with firefly luciferase reporter and renilla luciferase control plasmids. If not co-transfected with the pFA-CMV-LXR-Gal4 plasmid coding for the fusion LXRα-Gal4 receptor, no transactivation occured, thus excluding unspecific and RXR-mediated effects arising from contribution to activation. Results are expressed as mean ± SEM, n = 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant. (C + D) Dose-response relationship of 9-*cis*-RA (**13**, C) and bexarotene (**18**, D; LXRα (solid lines) and LXRβ (dashed lines)). Results are expressed as mean ± SEM, n ⩾ 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant. (E) Summarized results of the LXR-Gal4 hybrid reporter gene assays (C) and (D).

of the participants) and triglyceride levels (8%)[37] indicating impaired cholesterol and lipid homeostasis, which might be accountable to LXR activation. Clinical trials with bexarotene (**18**), which has gained approval for second-line treatment of cutaneous T-cell lymphoma in Europe and the US and is used off-label for lung carcinoma have revealed even more significant adverse effects on lipid homeostasis.[38] A phase II-III trial enrolling 94 patients had to reduce the initial dose of 650 mg/m^2/d bexarotene (**18**) in 43% of all participants due to hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. At the lower 300 mg/m^2/d dose, hyperlipidemia was still reported as most common adverse event (82%) followed by hypercholesterolemia (30%). The maximal plasma concentration of 1182 ng/mL for bexarotene (**18**, 300 mg/m^2/d) corresponding to 3.39 μM has been determined in the trials. According to our results for both bexarotene (**18**) and 9-*cis*-RA (**13**), these values are sufficient to cause endogenous LXR activation particularly in the presence of the endogenous ligand **1**. Thereby, the higher plasma levels and the higher LXR potency of bexarotene (**18**) are in congruence with the higher frequency of disturbed cholesterol homeostasis under bexarotene (**18**) treatment. As both 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) are known RXR agonists, clinically detected adverse effects probably derive to a large extent from permissive LXR-RXR heterodimer activation via the latter. However, simultaneous activation of both heterodimer partners induced by the respective ligands enhances the transactivation response in a synergistic manner.[39,40] As a consequence, single agents that are able to activate both heterodimer partners exhibit stronger effects than compounds selective for one receptor. Comparison of clinical trial outcomes with our *in vitro* assay data strongly support that 9-*cis*-RA (**13**) as well as bexarotene (**18**) are dual LXR/RXR agonists and thus are likely to cause hypercholesteremia and hyperlipidemia as LXR-mediated side-effects.

In conclusion, out of eleven drug molecules as potential LXR *in silico* screening hits, 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**) were iden-

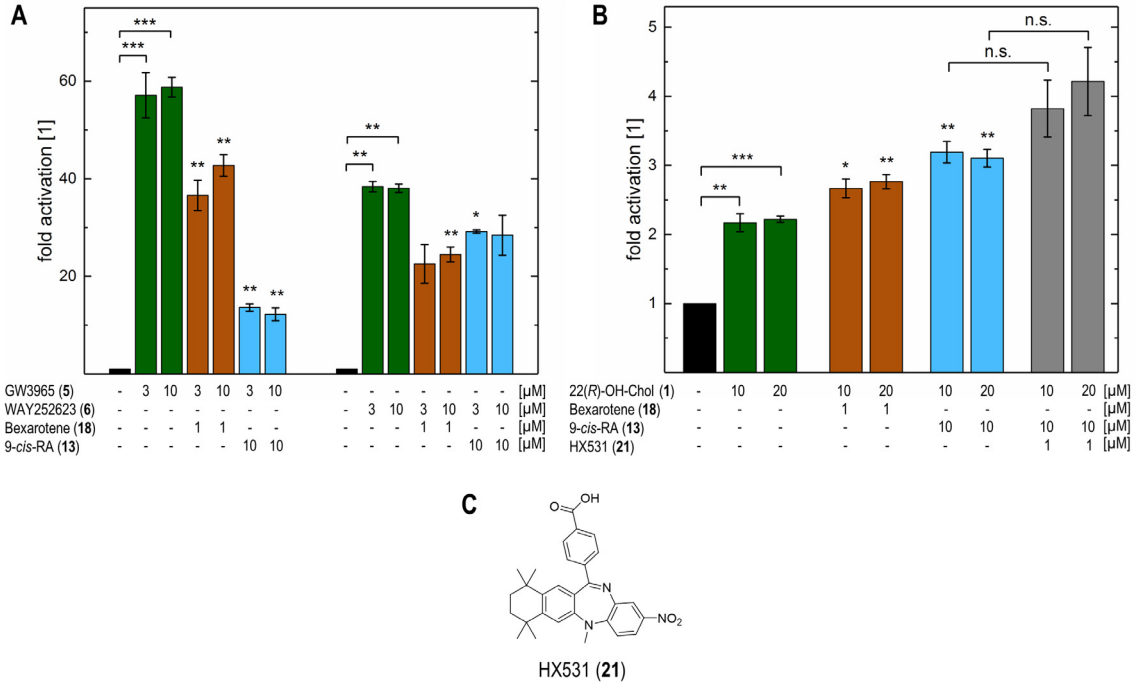


Fig. 3. (A-B) Competition of literature-known LXR agonists with 9-*cis*-RA (**13**) and bexarotene (**18**). Whereas the drugs show competitive behavior with full agonists GW3965 (**5**) and WAY252623 (**6**, Fig. 3A), additive activation occurs in the presence of endogenous partial agonist 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**, Fig. 3B). Results are expressed as mean ± SEM, n ⩾ 2; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant. Addition of RXR antagonist HX531 (**21**, Fig. 3B) as a control experiment to exclude RXR-mediated effects on luciferase transactivation. Synergistic LXRα activation mediated by 9-*cis*-RA (**13**) and 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**) interplay does not significantly alter upon addition of **21**. Results are expressed as mean ± SEM, n ⩾ 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant). (C) Structure of HX531 (**21**).

tified as partial LXR agonists on both subtypes with considerable potency. The resulting simultaneous activation of both heterodimer partners in the LXR-RXR dimer might cause synergistic activity which could account for side-effects observed in respective clinical trials for both drugs. 9-*cis*-RA (**13**) and particularly bexarotene (**18**) can serve as starting points for the selective optimization of their side activity (SOSA) to develop novel LXR and dual LXR/RXR modulators.

Acknowledgment

Financial support by the Else-Kroener-Fresenius-Foundation funding the graduate school 'Translational Research Innovation – Pharma' (TRIP) is gratefully acknowledged. This research was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; Heisenberg-Stipendium PR 1405/3-1; Sachbeihilfe PR 1405/2-2; SFB 1039 Teilprojekt A07).

A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.01.066.

References

1. Shinar DM, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Rodan GA, Schmidt A. *Gene*. 1994;147:273–276.
2. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. *Genes Dev*. 1995;9:1033–1045.
3. Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikström AC, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:2096–2100.
4. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. *Mol Cell Biol*. 1994;14:7025–7035.
5. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:459–481.
6. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, et al. *Diabetes*. 1997;46:1319–1327.
7. Boehm MF, Zhang L, Zhi L, et al. *J Med Chem*. 1995;38:3146–3155.
8. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. *Nature*. 1996;383:728–731.
9. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:266–271.
10. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, et al. *J Biol Chem*. 1997;272:3137–3140.
11. Schultz JR, Tu H, Luk A, et al. *Genes Dev*. 2000;14:2831–2838.
12. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, et al. *J Med Chem*. 2002;45:1963–1966.
13. Wrobel J, Steffan R, Bowen SM, et al. *J Med Chem*. 2008;51:7161–7168.
14. Ducheix S, Lobaccaro JMA, Martin PG, Guillou H. *Chem Phys Lipids*. 2011;164:500–514.
15. Peet DJ, Turley SD, Ma W, et al. *Cell*. 1998;93:693–704.
16. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, et al. *Science*. 2000;289:1524–1529.
17. Laffitte BA, Chao LC, Li J, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:5419–5424.
18. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, et al. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:7604–7609.
19. Wermuth CG. *Drug Discov Today*. 2006;11:160–164.
20. Achenbach J, Tiikkainen P, Franke L, Proschak E. *Future Med Chem*. 2011;3:961–968.
21. Schneider P, Tanrikulu Y, Schneider G. *Curr Med Chem*. 2009;16:258–266.
22. Kohonen T. *Biol Cybern*. 1982;43:59–69.
23. Johnson MA, Maggiora GM. American Chemical Society. Meeting 196th: 1988: Los Angeles, C. *Concepts and applications of molecular similarity*. Wiley; 1990.
24. Law V, Knox C, Djoumbou Y, et al. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D1091–D1097.
25. Bento AP, Gaulton A, Hersey A, et al. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D1083–D1090.
26. Schneider G, Neidhart W, Giller T, Schmid G. *Angew Chemie Int Ed*. 1999;38:2894–2896.
27. Bakir F, Kher S, Pannala M, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:3473–3479.
28. Kher S, Lake K, Sircar I, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17:4442–4446.
29. Hu B, Unwalla R, Collini M, et al. *Bioorg Med Chem*. 2009;17:3519–3527.
30. Panday N, Benz J, Blum-Kaelin D, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:5231–5237.
31. Singhaus RR, Bernotas RC, Steffan R, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20:521–525.
32. Szewczyk JW, Huang S, Chin J, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16:3055–3060.
33. Ratni H, Blum-Kaelin D, Dehmlow H, et al. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:1654–1657.
34. Jaye MC, Krawiec JA, Campobasso N, et al. *J Med Chem*. 2005;48:5419–5422.
35. Molteni V, Li X, Nabakka J, et al. *J Med Chem*. 2007;50:4255–4259.
36. Ebisawa M, Umemiya H, Ohta K, et al. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1999;47:1778–1786.
37. Ruzicka T, Lynde CW, Jemec GBE, et al. *Br J Dermatol*. 2008;158:808–817.
38. Fritz H, Kennedy D, Fergusson D, et al. *PLoS One*. 2011;6:e21107.
39. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. *Nature*. 1992;358:771–774.
40. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:2160–2164.

DrugBank screening revealed alitretinoin and bexarotene as liver X receptor modulators

Pascal Heitel[a], Janosch Achenbach[a], Daniel Moser[a], Ewgenij Proschak[a], and Daniel Merk[a]*

[a]*Institute of Pharmaceutical Chemistry, Goethe-University Frankfurt, Max-von-Laue-Strasse 9, 60438 Frankfurt am Main, Germany*

* merk@pharmchem.uni-frankfurt.de

Supplementary Data

S1: Test compounds.

22(*R*)-Hydroxycholesterol (**1**, CAS: 17954-98-2, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA), T0901317 (**4**, CAS: 293754-55-9, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), GW3965 hydrochloride (**5**, CAS: 405911-17-3, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), WAY252623 (**6**, CAS: 875787-07-8, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), metoprolol tartrate (**7**, CAS: 56392-17-7, Synopharm, Barsbuettel, Germany), mycophenolic acid (**8**, CAS: 24280-93-1, Fluorochem, Hadfield, UK), lumefantrine (**9**, CAS: 82186-77-4, TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium), moclobemide (**10**, CAS: 71320-77-9, Biotrend, Wangen, Switzerland), droperidol (**11**, CAS: 548-73-2, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), praziquantel (**12**, CAS: 55268-74-1, TCI Europe, Zwijndrecht, Belgium), alitretinoin (**13**, CAS: 5300-03-8, Cayman Chemical, Ann Arbor, USA), temozolomide (**14**, CAS: 85622-93-1, J&K Scientific, Pforzheim, Germany), sildenafil citrate (**15**, CAS: 171599-83-0, Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), tolmetin sodium salt dihydrate (**16**, CAS: 64490-92-2, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), physostigmine (**17**, CAS: 57-47-6, Alfa Aesar, Karlsruhe, Germany), bexarotene (**18**, CAS: 153559-49-0, LKT Laboratories, St. Paul, USA), and HX531 (**19**, CAS: 188844-34-0, Tocris Bioscience, Bristol, UK) were purchased. All compounds had a purity ≥ 98% according to the manufacturer and were used for in vitro test systems without further purification.

S2: Hybrid LXR-Gal4 Reporter Gene Assay

Cell culture: 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_2.

Plasmids: The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-hLXRα-LBD[1] and pFA-CMV-hLXRβ-LBD[1] 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.

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_2. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ($2.5 \cdot 10^4$ 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-LXRα-LBD or pFA-CMV-LXRβ-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, 0.1% DMSO alone as untreated control or 0.1% DMSO and 1 µM T0901317 as positive 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 achieved 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 reference agonist T0901317 at 1 µM which was defined as 100%. The assays were validated with LXR agonists T0901317 (LXRα: EC_{50} = 0.94±0.02 µM; LXRβ: EC_{50} = 0.80±0.04 µM; 1 µM defined as 100%), and WAY252623 (LXRα: EC_{50} = 1.44±0.25 µM; LXRβ: EC_{50} = 0.90±0.01 µM).

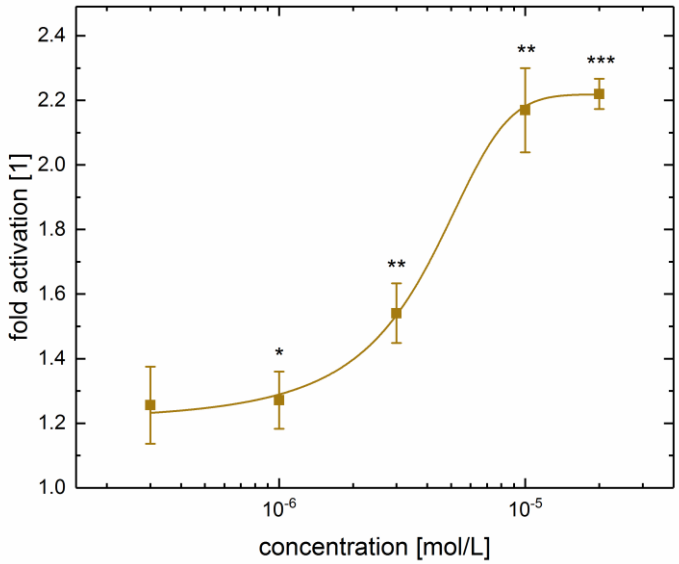


Figure S1: Dose-response curve for endogenous partial LXR agonist 22(*R*)-hydroxycholesterol (**1**) obtained in the hybrid LXRα-Gal4 reporter gene assay. EC_{50} = 4.02 ± 0.01 µM. Results are expressed as mean ± SEM, n ≥ 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant.

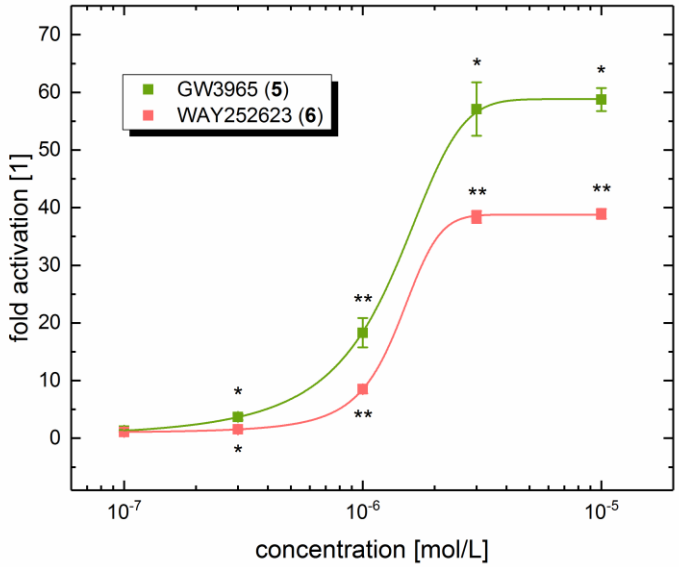


Figure S2: Dose-response curve for synthetic LXR full agonists GW3965 (**5**) and WAY252623 (**6**) obtained in the hybrid LXRα-Gal4 reporter gene assay. EC_{50} values are 1.41 ± 0.32 µM (**5**) and 1.44 ± 0.25 µM (**6**). Results are expressed as mean ± SEM, n ≥ 3; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; n.s.: not significant.

16.2 Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulator in Vitro

Heitel, P.; Gellrich, L.; Heering, J.; Goebel, T.; Kahnt, A.; Proschak, E.; Schubert-Zsilavecz, M.; Merk, D. Urate Transporter Inhibitor Lesinurad Is a Selective Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulator (sPPARγM) in Vitro *Scientific Reports* **2018**, *8*, 13554.

Dieser Artikel ist lizenziert durch eine Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie dieser Lizenz ist unter `http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/` verfügbar. Es wurden keine Änderungen vorgenommen.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Urate transporter inhibitor lesinurad is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator (sPPARγM) in vitro

Received: 23 April 2018
Accepted: 29 August 2018
Published online: 10 September 2018

Pascal Heitel[1], Leonie Gellrich[1], Jan Heering[2], Tamara Goebel[1], Astrid Kahnt[1], Ewgenij Proschak[1], Manfred Schubert-Zsilavecz[1] & Daniel Merk[1]

Gout is the most common arthritic disease in human but was long neglected and therapeutic options are not satisfying. However, with the recent approval of the urate transporter inhibitor lesinurad, gout treatment has experienced a major innovation. Here we show that lesinurad possesses considerable modulatory potency on peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ). Since gout has a strong association with metabolic diseases such as type 2 diabetes, this side-activity appears as very valuable contributing factor to the clinical efficacy profile of lesinurad. Importantly, despite robustly activating PPARγ *in vitro*, lesinurad lacked adipogenic activity, which seems due to differential coactivator recruitment and is characterized as selective PPARγ modulator (sPPARγM).

With rising incidence, gout is the most prevalent arthritic disease affecting approximately 3% of the population worldwide. It arises from chronic hyperuricaemia leading to disposal of urate microcrystals in and around joints. These urate crystals together with other factors can then induce a painful inflammatory reaction. The disease was long neglected and poorly studied but the recent decade has improved its understanding and yielded several novel therapeutics. According to current knowledge, gout is strongly associated with metabolic diseases such as type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome[1]. Treating metabolic dysbalance might, therefore, be a future strategy to cure gout.

Late in 2015, the urate transporter inhibitor lesinurad[2] was approved for the treatment of gout and expected to gain a dominant role in gout therapy. It acts as uricosuric agent by inhibiting the uric acid re-absorbing solute carrier SLC22A12 also known as URAT1[3] in the kidney and thereby promotes urinary uric acid excretion[2]. In clinical development, lesinurad was studied in combination therapy with allopurinol[4] or febuxostat[5] and as monotherapy[6] and in all trials markedly decreased serum uric acid levels with a generally favorable safety profile. However, indicators for increased cardiovascular risk were observed at higher lesinurad doses[7] that may point to off-target activities. Beyond that, clinically more relevant nephrotoxicity has led to a black box warning about acute renal failure under lesinurad therapy[8].

The peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ) acts as fatty acid sensing nuclear receptor and has a long history as drug target[9]. PPARγ is a key regulator of adipocyte differentiation and fatty acid storage but also has insulin-sensitizing and anti-inflammatory effects. PPARγ-agonistic thiazolidinediones (rosiglitazone, pioglitazone) reached blockbuster status as oral antidiabetics until safety warnings concerning increased cardiovascular risk and bladder cancer incidence significantly lowered their therapeutic relevance[10]. In addition, weight gain as a common side-effect of PPARγ agonists is an obstacle for their use especially in metabolic diseases. Still, PPARγ stays in focus of drug discovery for a variety of indications including metabolic[11] and inflammatory[12] disorders.

[1]Goethe University Frankfurt, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Max-von-Laue-Str. 9, D-60438, Frankfurt, Germany. [2]Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596, Frankfurt, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.M. (email: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de)

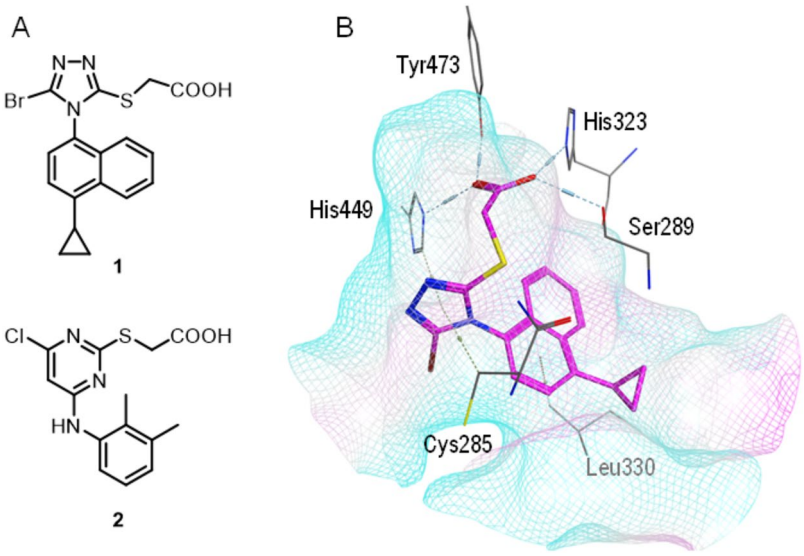


Figure 1. (**A**) Lesinurad (**1**) structurally resembles the dual PPARα/PPARγ agonist WY14,643 (**2**) and shares the typical architecture of fatty acid mimetics. (**B**) Molecular docking of lesinurad (**1**) into the PPARγ ligand binding domain (PDB-ID: 3ET3[17]) suggests a very favorable binding mode. The carboxylic acid of **1** forms neutralizing contacts with the triad of Ser_{289}, His_{323}, His_{449} and Tyr_{473} and the triazole moiety participates in π-interactions with Cys_{285} and His_{449}. Lesinurad's hydrophobic tail is placed in a lipophilic arm of the PPARγ ligand binding site.

Recent progress in PPARγ research has yielded selective PPARγ modulators (reviewed in[11]) that exploit beneficial effects of PPARγ activation *in vivo* while partly avoiding its adverse effects.

Due to its remarkable structural similarity with known PPARγ ligands, we have studied the activity of lesinurad on PPARs and several related nuclear receptors and conclude that the recently approved uricosuric agent exhibits selective PPARγ-modulatory activity that may significantly contribute to its therapeutic efficacy in gout.

Results

Molecular Docking. Lesinurad (**1**)[2] comprises the typical molecular architecture of fatty acid mimetics[13] and shares considerable structural similarity with the PPAR agonist WY14,643[14–16] (**2**, Fig. 1A). Molecular docking of lesinurad into the PPARγ ligand binding site (PDB ID: 3ET3[17], Fig. 1B) suggested a very favorable binding mode involving various ligand-protein interactions. The carboxylic acid of the drug participated in a hydrogen bond network with Ser_{289}, His_{323}, His_{449} and Tyr_{473}, which is common for PPARγ agonists. Moreover, the triazole ring of lesinurad formed π-interactions with Cys_{285} and His_{449}.

Reporter Gene Assay. Intrigued by this observation, we profiled lesinurad on PPARs and twelve closely related nuclear receptors in specific Gal4 hybrid reporter gene assays (Fig. 2A). These *in vitro* test systems are based on a constitutively expressed hybrid receptor composed of the ligand binding domain of the respective human nuclear receptor and the DNA binding domain of the yeast receptor Gal4. A Gal4-inducible firefly luciferase serves as reporter gene and a constitutively expressed renilla luciferase is used for normalization of transfection efficacy and internal toxicity control[18,19]. In these test systems, lesinurad at 30 μM concentration robustly transactivated PPARγ and, despite with lower efficacy, PPARα and pregnane X receptor (PXR). Control experiments in absence of a hybrid receptor showed no reporter transactivation confirming that the effects of lesinurad were mediated by the human nuclear receptor ligand binding domains. Full dose-response characterization revealed an EC_{50} value of 18.5 ± 0.7 μM for lesinurad on PPARγ combined with almost equal efficacy as the full PPARγ agonist pioglitazone (Fig. 2C). On PPARα, lesinurad possessed a similar EC_{50} value (20.8 ± 0.7 μM) but markedly lower activation efficacy (13.5 ± 0.5% vs. 1 μM of PPARα agonist GW7647). Compared to the remarkable PPARγ-agonistic activity, this weak partial PPARα agonism appears less relevant. In addition, PXR-agonistic activity (EC_{50} = 19 ± 1 μM, 145 ± 9% efficacy vs. 1 μM SR12813) was observed but was not surprising since the drug has been characterized as CYP3A4 inducer previously[20].

The marked PPARγ-agonistic activity of lesinurad according to reported plasma concentrations of up to 29 μM[21] (200 mg p.o.) and 54 μM[21] (600 mg p.o.) might indeed have pharmacological relevance especially since PPARγ activation might beneficially support lesinurad's mode of action. Therefore, we further characterized this pharmacodynamic effect by various biophysical and *in vitro* pharmacological studies.

First, we compared the activities of lesinurad with several drugs known to modulate PPARα, PPARγ or PXR (Figure 2B–D, Table 1). For PPARα agonist fenofibric acid, PPARγ activators pioglitazone, rosiglitazone and troglitazone as well as PXR agonists SR12813 and rifampicin, our hybrid reporter gene assays clearly reproduced the potencies of these reference drugs in terms of EC_{50} values and transactivation efficacy as reported in literature. For

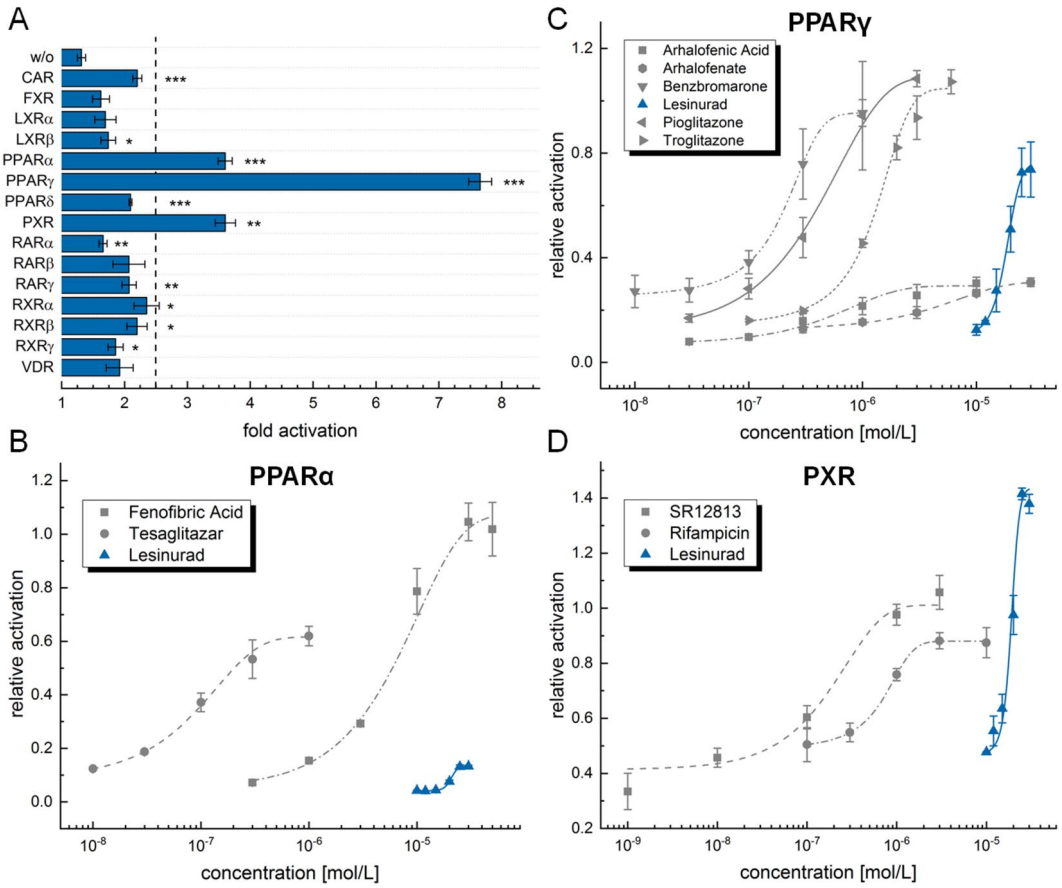


Figure 2. *In vitro* profiling of lesinurad on nuclear receptors: (**A**) At 30 μM concentration, lesinurad robustly transactivated Gal4-PPARγ and - with lower efficacy - Gal4-PPARα and Gal4-PXR. No reporter transactivation was observed in absence (w/o) of a hybrid receptor confirming nuclear receptor-mediated activity. Effects below a fold activation of 2.5 (dashed line) were considered irrelevant despite statistical significance. (**B**–**D**) Dose-response curves of lesinurad (blue) and selected drugs/reference compounds (grey) for comparison on PPARα (**B**), PPARγ (**C**) and PXR (**D**): (**B**) Transactivation efficacy of lesinurad on PPARα is very modest and, thus, this activity appears neglectable. (**C**) Dose-response characterization of lesinurad on PPARγ revealed an EC_{50} value of 18.5 ± 0.7 μM and 79 ± 5% relative efficacy compared to the reference PPARγ agonist pioglitazone. (**D**) On PXR, lesinurad possessed high transactivation efficacy (145 ± 9% compared to SR12813) which is not surprising since it has been characterized as CYP3A4 inducer previously[20]. Results are mean ± SEM of at least three independent experiments; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

arhalofenic acid and tesaglitazar, we observed discrepancies between reported PPARγ potency[22,23] and behavior in our test system that is well explained by the fact that the literature activities refer to murine PPARγ. The determined potency of tesaglitazar on PPARα also exceeds the reported value which may be due to marked differences in assay conduct. The literature activity[23] of tesaglitazar refers to a hybrid transactivation assay that in contrast to our system involves a very long incubation period of 40 hours (vs 12–14 hours in our protocol) which might cause significant degradation of the test compound leading to underestimation of its potency. Overall, potencies and transactivation efficacies of the reference drugs observed in our test system agreed very well with literature which further validated the assay systems and the activity of lesinurad. As further reference, we also compared the activities of lesinurad and urate transporter inhibitor benzbromarone which was characterized as PPARγ activator previously[24]. Benzbromarone revealed similar activation efficacy but significantly higher potency than lesinurad on PPARγ.

Full-length PPARγ reporter gene assay. The activity we observed for lesinurad in the hybrid reporter gene assay was reproduced in a full-length PPARγ transactivation assay involving the entire human nuclear receptor (Fig. 3). In this less artificial test system, lesinurad revealed equal potency with an EC_{50} value of 21 ± 2 μM confirming that lesinurad is competent to activate the human full-length PPARγ protein. The potencies of pioglitazone (EC_{50} = 1.7 ± 0.1 μM) and rosiglitazone (EC_{50} = 0.39 ± 0.03 μM) in this assay agree with their activities reported in literature which validated the test system and the activity observed for lesinurad (Table 1).

Isothermal titration calorimetry. To confirm direct modulation of PPARγ by lesinurad, we analyzed their interaction by isothermal titration calorimetry (ITC). Due to limited solubility of lesinurad, recombinant PPARγ ligand binding domain (LBD) protein was (reversely) titrated to the drug. The ITC experiment confirmed direct

drug	PPARα (EC_{50} [μM])		PPARγ (EC_{50} [μM])			PXR (EC_{50} [μM])	
	Gal4 assay	literature	Gal4 assay	full-length assay	literature	Gal4 assay	literature
arhalofenate*			5.4 ± 1.1		—		
arhalofenic acid*			0.47 ± 0.02		12[22]**		
benzbromarone			0.21 ± 0.03		active[24]***		
fenofibrate*	inactive	—					
fenofibric acid*	6.5 ± 0.5	30[56]					
pioglitazone			0.41 ± 0.09	1.7 ± 0.1	0.58[56]		
rosiglitazone			0.052 ± 0.010	0.39 ± 0.03	0.043[56]		
tesaglitazar	0.099 ± 0.005	1.7[23]	0.049 ± 0.005		0.25[23]**		
troglitazone			1.5 ± 0.1		0.55[56]		
SR12813						0.17 ± 0.02	0.14[57]
rifampicin						0.76 ± 0.07	0.72[57]
lesinurad	**20.8 ± 0.7**	—	**18.5 ± 0.7**	**21 ± 2**	—	**19 ± 1**	—

Table 1. *In vitro* activities of lesinurad and PPAR/PXR activating reference compounds/drugs for comparison. Where available, literature values refer to reporter gene assays similar to our test systems. However, there are differences concerning incubation times and used cell lines that may affect observed activities. Results are mean ± SEM of at least three independent experiments. *Arhalofenate and fenofibrate are prodrugs with arhalofenic acid and fenofibric acid as active metabolites. **Literature values of arhalofenic acid and tesaglitazar refer to murine PPARγ. ***No precise activity value has been reported for benzbromarone on PPARγ.

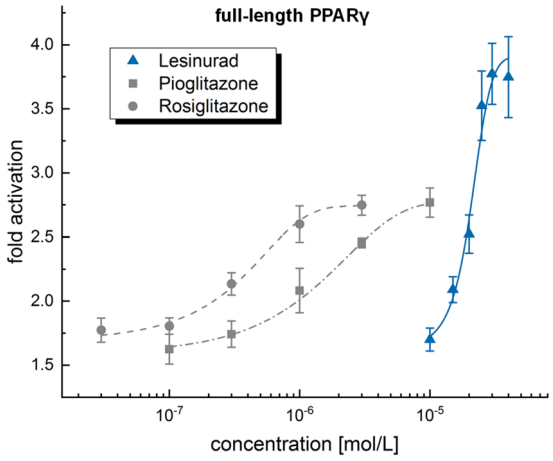


Figure 3. Activity of lesinurad in a full-length PPARγ reporter gene assay compared to reference agonists rosiglitazone and pioglitazone: With an EC_{50} value of 21 ± 2 μM, lesinurad was equally potent on full-length PPARγ as on the hybrid receptor and revealed higher transactivation efficacy than pioglitazone and rosiglitazone. Results are mean ± SEM of at least three independent experiments; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

high-affinity binding of lesinurad to the PPARγ LBD with an independent K_d value of 1.3 μM (Fig. 4). Moreover, ITC data indicated that lesinurad binding to PPARγ is driven by both enthalpic (ΔH = −26 kJ/mol) and entropic (ΔS = 27 J/mol·K) contributions. The enthalpic share of −26 kJ/mol equals two hydrogen bonds as suggested by the molecular docking.

Differentiation of 3T3-L1 adipocytes and PPAR-regulated gene expression. As PPARγ is a major regulator of lipid homeostasis and adipocyte differentiation, we studied the effects of lesinurad on lipid accumulation in murine 3T3-L1 adipocytes. For this, 3T3-L1 cells were treated with insulin, dexamethasone and isobutylmethylxanthine (IBMX) to induce their differentiation into mature adipocytes. In this experiment, addition of the synthetic PPARγ agonist rosiglitazone at 2 μM caused massive accumulation of lipid droplets during differentiation visualized by Oil Red O staining whereas lesinurad up to a concentration of 50 μM lacked this adipogenic effect. Cells treated with lesinurad were indistinguishable from DMSO-treated cells and even undifferentiated controls (Fig. 5A). Of note, lesinurad exhibited no cytotoxicity up to 50 μM (data not shown) excluding that the lack of lipid accumulation is a toxic effect. To gain deeper understanding of lesinurad-mediated PPARγ modulation in adipocytes, we analyzed their gene expression profiles after differentiation (Fig. 5B). Compared to DMSO-treated cells, the full PPARγ agonist rosiglitazone robustly induced the scavenger receptor CD36, adiponectin, fatty acid binding protein 4 (FABP4) and the glucose transporter 4 (GLUT4). In strong contrast,

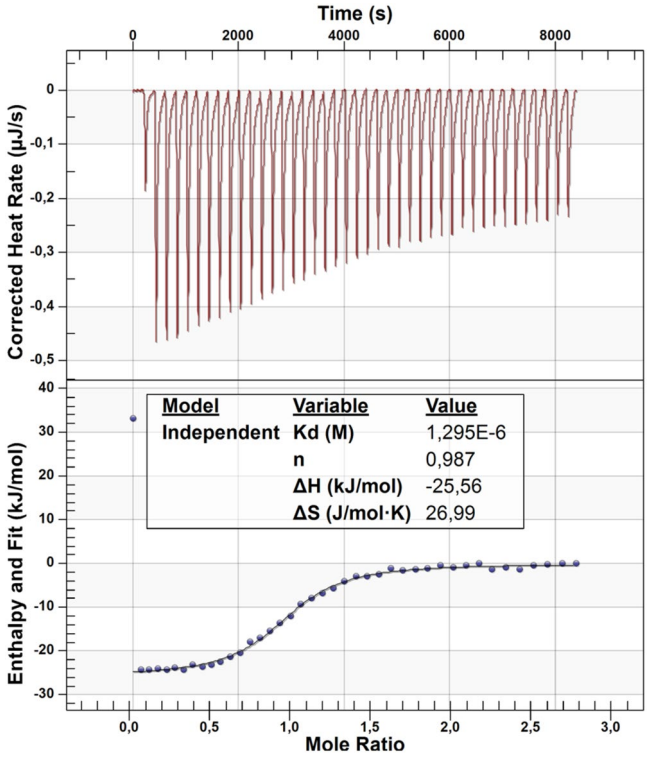


Figure 4. Isothermal titration calorimetry (ITC, recombinant PPARγ ligand binding domain was titrated to lesinurad due to the drug's limited aqueous solubility) confirmed direct interaction of lesinurad with the PPARγ ligand binding domain and revealed an independent K_d value of 1.3 µM. Binding was driven by enthalpic ($\Delta H = -26$ kJ/mol) and entropic ($\Delta S = 27$ J/mol·K) shares confirming the proposed binding mode which revealed two H-bonds and several lipophilic contacts.

lesinurad at 30 µM caused almost no changes in PPARγ-regulated gene expression with only slight trends for CD36 and adiponectin induction. Thus, the gene expression profiles confirmed the results of the staining experiments and indicated that lesinurad does not activate pro-adipogenic PPARγ target gene transcription in adipocytes to cause lipid accumulation. In contrast, in human hepatoma cells (HepG2 cells), lesinurad caused a more distinguished effect on PPARγ-regulated genes (Fig. 5C). As in adipocytes, lesinurad hardly affected CD36 and adiponectin expression but markedly induced angiopoietin-like 4 (ANGPTL4).

Thus, the cellular gene expression profiles indicated that lesinurad differentially affects distinct PPARγ-regulated genes which could be due to differential coactivator recruitment.

Coactivator recruitment assay. We analyzed the ability of lesinurad to induce recruitment of the coactivators steroid receptor coactivator 1 (SRC-1, also known as nuclear receptor coactivator 1 (NCOA1)) and cyclic AMP responsive element binding (CREB) protein (CBP) to the PPARγ ligand binding domain in a time-resolved FRET assay with labeled PPARγ-LBD and coactivator proteins (Fig. 5D). Lesinurad robustly induced the recruitment of SRC-1 with an EC_{50} value of 12 ± 2 µM and 91 ± 5% efficacy compared to rosiglitazone (1 µM). In contrast, lesinurad-induced CBP recruitment was significantly weaker in terms of EC_{50} value (44 ± 8 µM) and relative efficacy (59 ± 4%). According to this, at the concentrations of lesinurad used in our *in vitro* studies and at physiological concentrations, recruitment of CBP plays only a minor role.

Discussion

Lesinurad has been developed and approved as inhibitor of the urate transporter 1 (URAT1) on which it possesses intermediate potency with an IC_{50} value of 3.5 µM[2]. According to our results, **1** with an EC_{50} value of 18.5 µM has almost equal potency as PPARγ modulator and therefore potentially acts as gout therapeutic by a dual mode of action.

We have characterized the interaction of lesinurad with the PPARγ ligand binding domain employing a broad spectrum of *in vitro* test systems. A hybrid reporter gene assay that was validated with numerous reference compounds revealed strong PPARγ transactivation efficacy of lesinurad and ITC experiments clearly assigned this effect to a direct interaction of the drug with the PPARγ ligand binding domain. Equal potency of lesinurad in a full-length PPARγ transactivation assay confirmed that the drug is also competent to activate the native human nuclear receptor and that the observed activities were not an artifact of the test systems relying on the PPARγ ligand binding domain.

Contradictory to our data, Miner *et al.*[2] have reported that lesinurad does not activate PPARγ up to 100 µM concentration. This discrepancy might be explained by the fact that Miner *et al.* used a (not further specified)

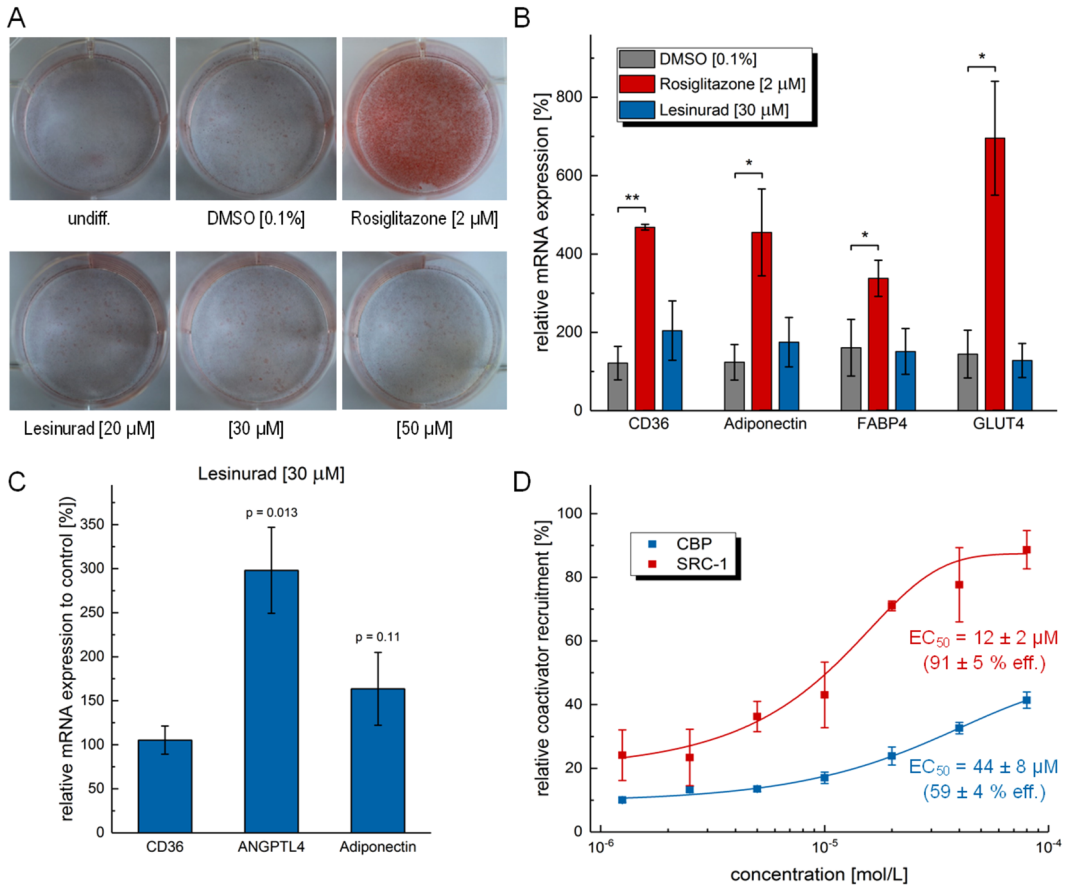


Figure 5. *In vitro* pharmacological characterization of lesinurad: (**A**) Despite its PPARγ-agonistic potency, lesinurad does not induce fat accumulation in murine 3T3-L1 adipocytes up to a concentration of 50 µM whereas the classical PPARγ agonist rosiglitazone causes massive storage of fat visualized by Oil Red O staining. (**B**) Rosiglitazone robustly induces PPARγ-regulated genes scavenger receptor CD36, adiponectin, fatty acid binding protein 4 (FABP4) and glucose transporter 4 (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes whereas lesinurad hardly affects their expression. (**C**) In HepG2 cells, lesinurad did not alter the expression of CD36 and only slightly induced adiponectin but caused marked induction of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4). (**D**) Lesinurad robustly recruits the steroid receptor coactivator 1 (SRC-1) with an EC_{50} value of $12 \pm 2\,\mu M$ and $91 \pm 5\%$ efficacy compared to 1 µM rosiglitazone. In contrast, recruitment of CREB binding protein (CBP) is significantly weaker induced by lesinurad ($EC_{50} = 44 \pm 8\,\mu M$; $59 \pm 4\%$ efficacy compared to 1 µM rosiglitazone). Results are mean ± SEM of at least three independent experiments; $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.

non-human cell line overexpressing PPARγ and engineered with a PPAR-responsive luciferase reporter. This cell line might either express a non-human PPARγ that is not activated by lesinurad or lacks human coactivators that are required for PPARγ activity. In all our test systems except the murine adipocyte cell line 3T3-L1, human cell lines and human PPARγ was used including recombinant human PPARγ ligand binding domain protein for the ITC measurement and coactivator recruitment assay as well as a hybrid receptor containing the human PPARγ ligand binding domain in the transactivation assay. PPARγ is highly conserved between human and mouse and it is commonly agreed that the mouse is a suitable species for PPARγ-related experiments[25]. Thus, we conclude that lesinurad is an intermediately potent agonist of PPARγ with high transactivation efficacy.

Gout is characterized by high concentrations of uric acid leading to disposal of urate crystals that cause an inflammatory arthritis[26]. The disease is associated with metabolic disorders, particularly the metabolic syndrome which makes a relation to PPARγ obvious[1]. Current international guidelines[26–30] for the management of gout recommend weight-lowering lifestyle changes and the supportive treatment of metabolic dysbalance and cardiovascular risk factors such as type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia and obesity. In human HepG2 cells, lesinurad markedly induced expression of angiopoetin-like protein 4 (ANGPTL4) which is involved in glucose homeostasis, lipid metabolism and might improve insulin sensitivity[31,32]. Moreover, lesinurad had a tendency to induce adiponectin that functions as a regulator of glucose levels and fatty acid degradation[33]. Gout patients with metabolic comorbidities such as type 2 diabetes mellitus and other manifestations of the metabolic syndrome may therefore strongly profit from PPARγ activation also in terms of reduced gout. In addition, PPARγ is a major regulator of fatty acid uptake and storage which strongly contributes to its beneficial metabolic effects[34–36]. Recent progress in understanding gout pathology points to an important role of fatty acids as cofactor of urate microcrystals in causing inflammation[1]. Improved fatty acid homeostasis upon PPARγ activation might have beneficial impact in

gout treatment. Moreover, as inflammatory disease, gout may also benefit from other anti-inflammatory effects of PPARγ activation. The PPARγ agonist pioglitazone is studied in clinical trials[12,37,38] for rheumatoid arthritis (as well as other chronic inflammatory diseases) where it shows promising activity especially in combination therapy with standard of care. In addition, direct effects of pioglitazone in a rat model of gout have been reported and associated with reduced synovial cytokine (TNFα, IFN-γ and IL-1β) levels[39]. Therefore, the PPARγ-agonistic potency of lesinurad seems to support its URAT1-inhibitory activity which together form a convenient dual mode of action: while URAT1 inhibition controls uric acid levels and prevents acute inflammatory episodes, PPARγ activation is a validated and efficacious therapeutic approach to metabolic diseases and in addition may particularly reduce the chronic inflammatory aspect of gout.

Pharmacokinetic studies[21] of lesinurad in healthy men reported mean peak plasma levels of 22 μg/mL after a single 600 mg oral dose corresponding to 54 μM plasma concentration. For the commonly used oral dose of 200 mg reported peak plasma levels vary between 15 μM[40], 17 μM[41] and 29 μM[21] plasma concentration. High (98%) plasma protein binding[2,41] has been observed for lesinurad and this interaction would lower the free concentration to approximately 0.3–0.6 μM[2], normally precluding a clinical effect. However, lesinurad is known to be a substrate of various organic solute transporters[41] and as other fatty acid mimetics[13] thus could accumulate in cells providing the potential for PPARγ modulation in humans.

Classical PPARγ agonists such as the thiazolidinediones rosiglitazone and pioglitazone are commonly characterized by adipogenic effects translating into weight gain as clinical side-effect. Extensive research has focused on separating this effect from the variety of beneficial activities mediated by the nuclear receptor culminating in the development of selective PPARγ modulators (sPPARγM). Of note, the term "selective" here refers to the mode of PPARγ modulation in terms of tissue-selectivity or selective effects compared to full PPARγ agonists such as pioglitazone but not to the selectivity over related molecular targets such as other PPAR subtypes. Several sPPARγMs[11,42,43] have been developed that differentially induce PPARγ-regulated genes potentially due to differential recruitment of different coactivators to the nuclear receptor. According to our results, lesinurad also constitutes such sPPARγM and is free from the adipogenic effect of classical PPARγ agonists *in vitro*. This profile further supports lesinurad's PPARγ-modulatory activity as beneficial contributor to the drug's pharmacological profile.

In murine adipose tissue, expression of both SRC-1 and CBP was observed[44] but CBP/PPARγ interaction was shown crucial for differentiation of 3T3-L1 adipocytes[45,46] which agrees with our observation that lesinurad does neither induce CBP recruitment nor promote adipocyte differentiation or lipid accumulation in 3T3-L1 cells. In contrast, SRC-1 which is robustly recruited to PPARγ through lesinurad binding has been associated with the regulation of energy homeostasis in adipose tissue and SRC-1 knockout in mice favored obesity development[47]. Additionally, SRC-1 plays a major role in thermogenesis[47]. Together, this data suggests that a PPARγ ligand that recruits SRC-1 but not CBP to the PPARγ ligand binding domain causes beneficial metabolic effects without inducing adipogenesis.

The selective modulatory activity of lesinurad on PPARγ might, therefore, also catch attention for selective optimization of side-activities. As approved drug, lesinurad is safe and bioavailable and therefore a very valuable starting point for new drug development. Minor structural variations might allow optimizing the selective PPARγ-modulatory characteristic and reduce URAT1 inhibition to generate a more potent sPPARγM for novel indications in metabolic diseases.

The predecessor of lesinurad and structurally related uricosuric benzbromarone has been characterized as PPARγ agonist previously[24]. This activity was confirmed in our hybrid reporter gene assay where we observed significantly higher PPARγ-agonistic potency for benzbromarone ($EC_{50} = 0.21$ μM) compared to lesinurad ($EC_{50} = 18.5$ μM) but equal transactivation efficacy. As a result, benzbromarone enhanced adiponectin plasma levels in men[48], but, in contrast to lesinurad, benzbromarone also significantly induced the expression of CD36, adiponectin and FABP4 (aP2) in 3T3-L1 mouse fibroblasts[48] where lesinurad showed no effect in our study. Benzbromarone, therefore, appears to promote adipocyte differentiation and to have adipogenic potential. In HEK293T cells, benzbromarone induced lipoprotein lipase (LPL) and acyl-CoA-synthetase[24] suggesting PPAR activation in this cell type, as well. Together these results indicate marked differences in the mode of PPARγ modulation by lesinurad and benzbromarone and suggest that lesinurad but not benzbromarone has selective PPARγ-modulatory properties. Still, the PPARγ-agonistic activity of both uricosuric drugs may contribute to therapeutic efficacy in gout in a dual mode of action. The lack of adipogenic effects appears as a potential safety advantage of lesinurad, however.

In conclusion, we report a secondary mode of action for the recently approved gout therapeutic lesinurad. By selective PPARγ modulation and differential induction coactivator recruitment to the PPARγ ligand binding domain, lesinurad activates PPARγ without causing adipogenic effects *in vitro*. As PPARγ activation beneficially affects chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, and as gout is closely associated with metabolic diseases, lesinurad's PPARγ modulation appears as supportive side-activity to its URAT1 inhibitory potency. Moreover, with its interesting pharmacological profile, lesinurad might also hold great therapeutic potential in metabolic diseases since adipogenic effects of PPARγ activation and resulting weight gain are a major obstacle to the therapeutic exploitation of PPARγ in metabolic diseases. By avoiding this adipogenic activity, lesinurad could help PPARγ to a rebirth as target for metabolic disorders or serve as lead compound for the development of potent drug-like sPPARγM by selective optimization of side-activities[49].

Materials and Methods

Hybrid reporter gene assays for PPARα/γ/δ, LXRα/β, RXRα/β/γ, RARα/β/γ, FXR, VDR, CAR and PXR. *Plasmids.* The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-hPPARα-LBD[50], pFA-CMV-hPPARγ-LBD[50], pFA-CMV-hPPARδ-LBD[50], pFA-CMV-hLXRα-LBD[51], pFA-CMV-hLXRβ-LBD[51], pFA-CMV-hRXRα-LBD[52], pFA-CMV-hRXRβ-LBD[52], pFA-CMV-hRXRγ-LBD[52], pFA-CMV-hRARα-LBD[52],

pFA-CMV-hRARβ-LBD[52], pFA-CMV-hRARγ-LBD[52], pFA-CMV-hFXR-LBD[53], pFA-CMV-hVDR-LBD[52], pFA-CMV-hCAR-LBD[52] and pFA-CMV-hPXR-LBD[52] 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 µg/mL) at 37 °C and 5% CO_2. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ($3{\cdot}10^4$ 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 the corresponding Gal4-fusion nuclear receptor plasmid. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (12-14 h) incubation with the test compounds, 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 (PPARα: GW7647; PPARγ: pioglitazone; PPARδ: L165,041; LXRα/β: T0901317; RXRα/β/γ: bexarotene; RARα/β/γ: tretinoin; FXR: GW4064; VDR: calcitriol; CAR: CITCO; PXR: SR12813). All hybrid assays were validated with the above-mentioned reference agonists which yielded EC_{50} values in agreement with literature.

Full-length PPARγ reporter gene assay. 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_2. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ($3{\cdot}10^4$ 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 hPPARγ responsive firefly luciferase construct PPRE1-pGL3 and pRL-SV40 (Promega) as internal control to monitor transfection efficiency and test compound toxicity. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (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. The assay was validated with reference agonists pioglitazone and rosiglitazone which yielded EC_{50} values in agreement with literature.

Isothermal titration calorimetry (ITC). Isothermal titration calorimetry (ITC) was conducted on an Affinity ITC (TA Instruments Affinity ITC). Recombinant PPARγ ligand binding domain protein (138 µM) and lesinurad (40 µM) were each dissolved in a HEPES buffer (25 mM; adjusted to pH 7.5 with KOH; further containing 150 mM KF, 10% glycerol (w/w), 1% DMSO (v/v) and 5 mM DTT). The ITC instrument was adjusted to a temperature of 25 °C and the stirring rate was set at 75 rpm. 190 µL lesinurad solution were filled into the reaction cell and PPARγ ligand binding domain solution was titrated in 41 injections. The first injection had a reduced volume of 1.0 µL and was followed by 40 injections of 2.5 µL. An interval of 200 s was maintained between individual injections. The heats of dilution resulting from titrating PPARγ ligand binding domain protein solution into the buffer solution were recorded in an additional ITC run and subtracted from the raw ITC data obtained for lesinurad.

ITC raw data was analyzed using NanoAnalyze software package (version 3.7.5). An independent binding model was used to fit the reaction enthalpy (ΔH), binding affinity constant (K_d), and stoichiometry (n). Free energy change (ΔG) was calculated from the equation $\Delta G = -RT \ln K$ and the entropy (ΔS) was calculated from $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

Differentiation of murine 3T3-L1 Cells. 3T3-L1 cells were subcultured in DMEM containing 10% newborn calf serum in a humidified atmosphere at 37 °C, 5% CO_2. Cells were differentiated into adipocytes within 14 days according to the method[54] reported by Zebisch and colleagues. In brief, cells were seeded in 6-well plates ($2.5{\cdot}10^6$/well). Differentiation was induced at day 3 by addition of 1 µg/mL insulin, 0.25 µM dexamethasone, and 0.5 mM isobutylmethylxanthine as well as the test compounds or controls in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. At day 5, medium was changed to contain only insulin for another two days. Cells were then kept for lipid droplet accumulation in basal medium without additions until day 15. Rosiglitazone (2 µM) was used as PPARγ positive control. Differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes was confirmed by Oil Red O

staining. For this, cells were washed with PBS and then fixed for 60 min with a formaldehyde solution (4% in PBS). Subsequently, cells were rinsed with 60% isopropanol and incubated with Oil Red O solution (0.3%) for 120 min. Figure 5A displays one representative staining example of three independent repeats.

PPARγ target gene quantification. *3T3-L1 Adipocytes.* 3T3-L1 cells were cultured and differentiated as described above. Cells were then lysed using TRIzol reagent (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and mRNA was isolated following the manufacturer's protocol. DNA contaminations were digested using DNase (DNase I, RNase-free kit; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and mRNA concentrations were measured with a NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Subsequently, reverse transcription was performed using the high capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative real-time PCR was performed using specific primers for CD36, Cytokeratin20 and CPT1A with a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Non-POU domain containing octamer binding protein (NonO) was used as reference gene for 3T3-L1. All samples were measured in duplicate and were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method. The following PCR primers were used: Adiponectin: 5′-TGA CGA CAC CAA AAG GGC TC-3′ (fwd) and 5′-CAC AAG TTC CCT TGG GTG GA-3′ (rev); CD36: 5′-TGC TGG AGC TGT TAT TGG TG-3′ (fwd) and 5′-CAT GAG AAT GCC TCC AAA CA-3′ (rev); FABP4: 5′-AGA AGT GGG AGT GGG CTT TG-3′ (fwd) and 5′-ACT CTC TGA CCG GAT GGT GA-3′ (rev); GLUT4: 5′-TGA AGA ACG GAT AGG GAG CAG-3′ (fwd) and 5′-GAA GTG CAA AGG GTG AGT GAG-3′ (rev); NonO: 5′-TGC TCC TGT GCC ACC TGG TAC TC-3′ (fwd) and 5′-CCG GAG CTG GAC GGT TGA ATG C-3′ (rev).

Results (expressed as mean ± SEM % relative mRNA expression; n = 3): Adiponectin: untreated (0.1% DMSO): 124 ± 45%; rosiglitazone (2 μM): 455 ± 111%; **1** (30 μM): 175 ± 63%; CD36: untreated (0.1% DMSO): 122 ± 43%; rosiglitazone (2 μM): 468 ± 8%; **1** (30 μM): 205 ± 76%; FABP4: untreated (0.1% DMSO): 161 ± 72%; rosiglitazone (2 μM): 338 ± 46%; **1** (30 μM): 151 ± 58%; GLUT4: untreated (0.1% DMSO): 145 ± 61%; rosiglitazone (2 μM): 695 ± 145%; **1** (30 μM): 128 ± 43%.

HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with **1** (30 μM) or 0.1% DMSO as untreated control for 8 h, harvested, washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) and then directly used for RNA extraction. 2 μg 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. PPARγ target gene expression was evaluated by quantitative real time PCR analysis with a StepOnePlus™ System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using Power SYBR Green (Life Technologies; 12.5 μL per well). Each sample was set up in duplicates and repeated in four independent experiments. The expression was quantified by the comparative $\Delta\Delta C_t$ method and glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as reference gene. The following PCR primers were used: Adiponectin: 5′-TGG CTA TGC TCA CAG TCT CAC ATC-3′ (fwd) and 5′-CTC TGT GCC TCT GGT TCC ACA A-3′ (rev); ANGPTL4: 5′-ATT CTT TCC AGC GGC TTC TG-3′ (fwd) and 5′-GAG GAC TGG AGA CGC GGA G-3′ (rev); CD36: 5′-GGC TGT GAC CGG AAC TGT G-3′ (fwd) and 5′-AGG TCT CCA ACT GGC ATT AGA A-3′ (rev); GAPDH: 5′-ATA TGA TTC CAC CCA TGG CA-3′ (fwd) and 5′-GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC-3′ (rev).

Results (expressed as mean ± SEM % relative mRNA expression to vehicle (0.1% DMSO); n = 4): Adiponectin: **1** (30 μM): 163 ± 41%; ANGPTL4: **1** (30 μM): 298 ± 49%; CD36: **1** (30 μM): 105 ± 16%.

PPARγ coactivator recruitment assay (time-resolved FRET assay). Recruitment of coactivator-derived peptides to the PPARγ LBD was studied by homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (HT-FRET or HTRF). Terbium cryptate as streptavidin conjugate (cisbio assays, France) was used as FRET donor. Peptides derived from coactivators SRC-1 [biotin-CPSSHSSLTERHKILHRLLQEGSPS] or CBP [biotin-NLVPDAASKHKQLSELLRGGSGS] encompassing the coactivator consensus motif LxxLL and N-terminal biotin for stable coupling to streptavidin were purchased (Eurogentec GmbH, Germany). Solutions containing 12 nM recombinant PPARγ LBD ligand binding domain fused to N-terminal GFP as FRET acceptor and 12 nM of FRET donor complex with either SRC-1 or CBP derived peptide as well as 1% DMSO with test compound at varying concentrations or DMSO alone were prepared in HEPES buffer (25 mM HEPES pH 7.5 adjusted with KOH, 150 mM KF, 5% (w/v) glycerol, 0.1% (w/v) CHAPS and 5 mM DTT). After 2 h incubation at RT, the fluorescence intensities (FI) at 520 nm (acceptor) and 620 nm (donor reference) after excitation at 340 nm were recorded on a Tecan Infinite F200 (Tecan Deutschland GmbH). $FI_{520\ nm}$ was divided by $FI_{620\ nm}$ and multiplied with 10,000 giving a dimensionless HTRF signal. Coactivator recruitment by the PPARγ LBD brings FRET donor and acceptor into close proximity resulting in a gain in FRET signal as signal for binding. Recruitment of coactivator derived peptides to the PPARγ LBD was validated with increasing concentrations of rosiglitazone (data not shown). Recruitment of SRC-1 or CBP was referenced to recruitment in response to 1 μM rosiglitazone (~EC_{80}) and reported as relative coactivator recruitment.

Molecular docking. Molecular modelling experiments were carried out using MOE (Molecular Operating Environment v. 2016.0802, Chemical Computing Group, Montreal, Canada). Structure preparation of PPARγ LBD (3ET3[17]) was subjected to the Quick Preparation routine, which includes automated structure curation, determination of protonation state and restrained energy minimization. Afterwards, molecular docking was performed using default settings for induced fit docking. London dG scoring function was used for initial placement of 30 poses and afterwards refinement was performed using MM/GBVI method[55]. After visual inspection, the highest-scored pose was selected as basis for the optimization hypothesis.

References

1. Pascart, T. & Lioté, F. Gout: state of the art after a decade of developments. *Rheumatology (Oxford)*, https://doi.org/10.1093/rheumatology/key002 (2018).
2. Miner, J. N. *et al*. Lesinurad, a novel, oral compound for gout, acts to decrease serum uric acid through inhibition of urate transporters in the kidney. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 214 (2016).
3. Koepsell, H. & Endou, H. The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **447**, 666–676 (2004).
4. Bardin, T. *et al*. Lesinurad in combination with allopurinol: a randomised, double-blind, placebo-controlled study in patients with gout with inadequate response to standard of care (the multinational CLEAR 2 study). *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 811–820 (2017).
5. Dalbeth, N. *et al*. Lesinurad, a Selective Uric Acid Reabsorption Inhibitor, in Combination With Febuxostat in Patients With Tophaceous Gout: Findings of a Phase III Clinical Trial. *Arthritis Rheumatol.* **69**, 1903–1913 (2017).
6. Tausche, A.-K. *et al*. Lesinurad monotherapy in gout patients intolerant to a xanthine oxidase inhibitor: a 6 month phase 3 clinical trial and extension study. *Rheumatology (Oxford)*. **56**, 2170–2178 (2017).
7. Sanchez-Niño, M. D. *et al*. Lesinurad: what the nephrologist should know. *Clin. Kidney J.* **10**, 679–687 (2017).
8. FDA. Zurampic Label. Available at: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209203s000lbl.pdf. (Accessed: 21st June 2018).
9. Lamers, C., Schubert-Zsilavecz, M. & Merk, D. Therapeutic modulators of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR): a patent review (2008–present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **22**, 803–841 (2012).
10. Nanjan, M. J., Mohammed, M., Prashantha Kumar, B. R. & Chandrasekar, M. J. N. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg. Chem.* **77**, 548–567 (2018).
11. 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.* **4**, 101310 (2017).
12. Hanke, T., Merk, D., Steinhilber, D., Geisslinger, G. & Schubert-Zsilavecz, M. Small molecules with anti-inflammatory properties in clinical development. *Pharmacol. Ther.* **157**, 163–87 (2015).
13. Proschak, E., Heitel, P., Kalinowsky, L. & Merk, D. Opportunities and challenges for fatty acid mimetics in drug discovery. *J. Med. Chem.* **60**, 5235–5266 (2017).
14. Santilli, A. A., Scotese, A. C. & Tomarelli, R. M. A potent antihypercholesterolemic agent: [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14643). *Experientia* **30**, 1110–1111 (1974).
15. Pollinger, J. & Merk, D. Therapeutic applications of the versatile fatty acid mimetic WY14643. *Expert Opin. Ther. Pat.* **27**, 517–525 (2017).
16. Merk, D., Zettl, M., Steinhilber, D., Werz, O. & Schubert-Zsilavecz, M. Pirinixic acids: flexible fatty acid mimetics with various biological activities. *Future Med. Chem.* **7**, 1597–616 (2015).
17. Artis, D. R. *et al*. Scaffold-based discovery of indeglitazar, a PPAR pan-active anti-diabetic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 262–7 (2009).
18. Schmidt, J. *et al*. A dual modulator of farnesoid X receptor and soluble epoxide hydrolase to counter nonalcoholic steatohepatitis. *J. Med. Chem.* **60**, 7703–7724 (2017).
19. Merk, D., Steinhilber, D. & Schubert-Zsilavecz, M. Characterizing ligands for farnesoid Xreceptor-available *in vitro* test systems for farnesoid Xreceptor modulator development. *Expert Opin. Drug Discov.* **9**, 27–37 (2014).
20. Gillen, M. *et al*. Evaluation of Pharmacokinetic Interactions Between Lesinurad, a New Selective Urate Reabsorption Inhibitor, and CYP Enzyme Substrates Sildenafil, Amlodipine, Tolbutamide, and Repaglinide. *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* **6**, 363–376 (2017).
21. Shen, Z. *et al*. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of lesinurad, a selective uric acid reabsorption inhibitor, in healthy adult males. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**, 3423 (2015).
22. Gregoire, F. M. *et al*. MBX-102/JNJ39659100, a novel non-TZD selective partial PPAR-γ agonist lowers triglyceride independently of PPAR-α activation. *PPAR Res.* **2009**, (2009).
23. Ljung, B. *et al*. AZ 242, a novel PPARα/γ agonist with beneficial effects on insulin resistance and carbohydrate and lipid metabolism in ob/ob mice and obese Zucker rats. *J. Lipid Res.* **43**, 1855–1863 (2002).
24. Kunishima, C. *et al*. Activating effect of benzbromarone, a uricosuric drug, on peroxisome proliferator-activated receptors. *PPAR Res.* **2007** (2007).
25. Pap, A., Cuaranta-Monroy, I., Peloquin, M. & Nagy, L. Is the Mouse a Good Model of Human PPARγ-Related Metabolic Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1236 (2016).
26. Jones, G., Panova, E. & Day, R. Guideline development for the management of gout: role of combination therapy with a focus on lesinurad. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 3077–3081 (2017).
27. Hui, M. *et al*. The British Society for Rheumatology Guideline for the Management of Gout. *Rheumatology* **56**, e1–e20 (2017).
28. Richette, P. *et al*. 2016 updated EULAR evidence-based recommendations for the management of gout. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 29–42 (2017).
29. Dalbeth, N. *et al*. Discordant American College of Physicians and international rheumatology guidelines for gout management: consensus statement of the Gout, Hyperuricemia and Crystal-Associated Disease Network (G-CAN). *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 561–568 (2017).
30. Yu, K.-H. *et al*. Management of gout and hyperuricemia: Multidisciplinary consensus in Taiwan. *Int. J. Rheum. Dis.*, https://doi.org/10.1111/1756-185X.13266 (2018).
31. Wang, Y. *et al*. *Molecular medicine reports*. *Molecular Medicine Reports* **14**, (D.A. Spandidos, 2016).
32. Köster, A. *et al*. Transgenic Angiopoietin-Like (Angptl)4 Overexpression and Targeted Disruption of Angptl4 and Angptl3: Regulation of Triglyceride Metabolism. *Endocrinology* **146**, 4943–4950 (2005).
33. Kern, P. A., Gregorio, G. B. D., Lu, T., Rassouli, N. & Ranganathan, G. Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue. *Diabetes* **52**, 1779–1785 (2003).
34. Kersten, S., Desvergne, B. & Wahli, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* **405**, 421–4 (2000).
35. Han, L., Shen, W.-J., Bittner, S., Kraemer, F. B. & Azhar, S. PPARs: regulators of metabolism and as therapeutic targets in cardiovascular disease. Part II: PPAR-β/δ and PPAR-γ. *Future Cardiol.* **13**, 279–296 (2017).
36. Heikkinen, S., Auwerx, J. & Argmann, C. A. PPARγ in human and mouse physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1771**, 999–1013 (2007).
37. Ormseth, M. J. *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist effect on rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Res. Ther.* **15**, R110 (2013).
38. Marder, W. *et al*. The Peroxisome Proliferator Activated Receptor- Pioglitazone Improves Vascular Function and Decreases Disease Activity in Patients With RheumatoidArthritis. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e000441–e000441 (2013).
39. Wang, R.-C. & Jiang, D.-M. PPAR-γ agonist pioglitazone affects rat gouty arthritis by regulating cytokines. *Genet. Mol. Res.* **13**, 6577–6581 (2014).
40. Astra Zeneca. Zurampic Product Information. Available at: https://www.tga.gov.au/sites/default/files/auspar-lesinurad-160920-pi.docx. (Accessed: 24th June 2018).
41. Shen, Z. *et al*. *In Vitro* and *In Vivo* Interaction Studies Between Lesinurad, a Selective Urate Reabsorption Inhibitor, and Major Liver or Kidney Transporters. *Clin. Drug Investig.* **36**, 443–52 (2016).
42. Sohn, K.-A. K. *et al*. S26948, a new specific peroxisome proliferator activated receptor gamma modulator improved *in vivo* hepatic insulin sensitivity in 48 h lipid infused rats. *Eur. J. Pharmacol.* **608**, 104–11 (2009).

43. Fujimura, T. *et al*. FK614, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator, induces differential transactivation through a unique ligand-specific interaction with transcriptional coactivators. *J. Pharmacol. Sci.* **99**, 342–52 (2005).
44. Yu, S. & Reddy, J. K. Transcription coactivators for peroxisome proliferator-activated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1771**, 936–951 (2007).
45. Mizukami, J. & Taniguchi, T. The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR gamma and CBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 61–4 (1997).
46. Takahashi, N. *et al*. Overexpression and Ribozyme-mediated Targeting of Transcriptional Coactivators CREB-binding Protein and p300 Revealed Their Indispensable Roles in Adipocyte Differentiation through the Regulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor. *J. Biol. Chem.* **277**, 16906–16912 (2002).
47. Picard, F. *et al*. SRC-1 and TIF2 control energy balance between white and brown adipose tissues. *Cell* **111**, 931–41 (2002).
48. Inokuchi, T. *et al*. Effects of benzbromarone and allopurinol on adiponectin *in vivo* and *in vitro*. *Horm. Metab. Res.* **41**, 327–332 (2009).
49. Wermuth, C. G. Selective optimization of side activities: the SOSA approach. *Drug Discov. Today* **11**, 160–164 (2006).
50. Rau, O. *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.* **72**, 881–887 (2006).
51. Heitel, P., Achenbach, J., Moser, D., Proschak, E. & Merk, D. DrugBank screening revealed alitretinoin and bexarotene as liver X receptor modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 1193–1198 (2017).
52. Flesch, D. *et al*. Non-acidic farnesoid X receptor modulators. *J. Med. Chem.* **60**, 7199–7205 (2017).
53. Schmidt, J. *et al*. NSAIDs Ibuprofen, Indometacin, and Diclofenac do not interact with Farnesoid XReceptor. *Sci. Rep.* **5**, 14782 (2015).
54. Zebisch, K., Voigt, V., Wabitsch, M. & Brandsch, M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* **425**, 88–90 (2012).
55. Labute, P. The generalized Born/volume integral implicit solvent model: estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area. *J. Comput. Chem.* **29**, 1693–1698 (2008).
56. Willson, T. M., Brown, P. J., Sternbach, D. D. & Henke, B. R. The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. **43** (2000).
57. Lemaire, G. *et al*. Identification of New Human Pregnane X Receptor Ligands among Pesticides Using a Stable Reporter Cell System. *Toxicol. Sci.* **91**, 501–509 (2006).

Acknowledgements

P.H. gratefully acknowledges financial support by the Else-Kroener-Fresenius-Foundation funding the graduate school 'Translational Research Innovation – Pharma' (TRIP). E.P. was supported by the German Research Foundation (DFG; Sachbeihilfe PR1405/2-2; Heisenberg-Professur PR1405/4-1, SFB1039 Teilprojekt A07).

Author Contributions

P.H. did the reporter gene assays, prepared cDNA samples from human HepG2 cells, did the quantitative polymerase chain reaction for both murine and human samples and analyzed the data; J.H. did the coactivator recruitment assay; L.G. did the isothermal titration calorimetry assay; T.G. and A.K. differentiated the murine 3T3-L1 cells and prepared cDNA samples thereof; E.P. and D.M. performed the in silico studies and structural analysis; D.M. and P.H. prepared the figures; M.S.-Z. and D.M. conceived the study; D.M. supervised the project, interpreted the data and wrote the manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2018

16.3 Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype

Heitel, P.; Gellrich, L.; Kalinowsky, L.; Heering, J.; Kaiser, A.; Ohrndorf, J.; Proschak, E.; Merk, D. Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *10*, 203–208.

Reprinted with permission from Heitel, P.; Gellrich, L.; Kalinowsky, L.; Heering, J.; Kaiser, A.; Ohrndorf, J.; Proschak, E.; Merk, D. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2019**, *10*, 203–208. Copyright (2019) American Chemical Society.

ACS Medicinal Chemistry Letters
Cite This: ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203−208
Letter
pubs.acs.org/acsmedchemlett

Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype

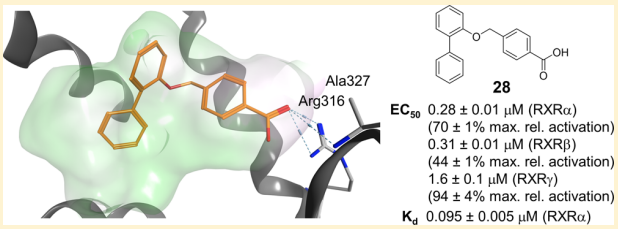
Pascal Heitel,[†] Leonie Gellrich,[†] Lena Kalinowsky,[†] Jan Heering,[‡] Astrid Kaiser,[†] Julia Ohrndorf,[†] Ewgenij Proschak,[†] and Daniel Merk*,[†]

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

[‡]Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: As universal heterodimer partners of many nuclear receptors, the retinoid X receptors (RXRs) constitute key transcription factors. They regulate cell proliferation, differentiation, inflammation, and metabolic homeostasis and have recently been proposed as potential drug targets for neurodegenerative and inflammatory diseases. Owing to the hydrophobic nature of RXR ligand binding sites, available synthetic RXR ligands are lipophilic, and their structural diversity is limited. Here, we disclose the computer-assisted discovery of a novel RXR agonist chemotype and its systematic optimization toward potent RXR modulators. We have developed a nanomolar RXR agonist with high selectivity among nuclear receptors and superior physicochemical properties compared to classical rexinoids that appears suitable for *in vivo* applications and as lead for future RXR-targeting medicinal chemistry.



KEYWORDS: *Nuclear receptors, RXR, Neurodegeneration, Inflammation*

The fatty acid-sensing ligand-activated transcription factors retinoid X receptors (RXRs, NR2B1−3) stand out among nuclear receptors by acting as universal heterodimer partners of numerous members of this protein family.[1] Thereby, RXRs are key regulators of cell proliferation and differentiation and are involved in metabolic homeostasis as well as inflammation.[2] The synthetic rexinoid bexarotene (**1**, Figure 1) and the putative endogenous RXR agonist 9-*cis*-retinoic acid (**2**) are the only RXR ligands with market approval and only available for second line treatment of cutaneous T-cell lymphoma and Kaposi's sarcoma, respectively. Recent animal studies have also demonstrated great potential of RXR modulation in neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis and Alzheimer's disease.[3,4] However, toxicity, lack of selectivity,[5] and unfavorable physicochemical properties of available rexinoids hamper the full exploration of RXR's therapeutic potential.[6−10] By pharmacophore-based virtual screening and subsequent structural optimization, we have identified a new RXR agonist chemotype to equip medicinal chemistry with innovative novel rexinoids and potentially overcome the characteristic issues of RXR ligands.

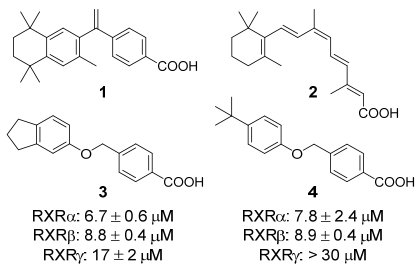


Figure 1. Chemical structures of bexarotene (**1**), 9-*cis*-retinoic acid (**2**), and virtual screening hits (**3** and **4**) confirmed active *in vitro*.

To identify potential RXR ligands in large screening collections, we have developed a pharmacophore model (Figure S1) based on the binding mode of bexarotene (**1**, PDB entry 4K6I[11]) in the hRXR*α* ligand binding domain (LBD) considering positive features and excluded volumes. Screening of a focused library of commercially available fatty acid mimetics[10] on this computational model resulted in 29 primary hits. The 15 most diverse compounds of these computationally favored molecules (Figure S2) were evaluated *in vitro* employing specific Gal4-hybrid reporter gene assays to determine modulatory potential on the three RXR subtypes. In these assays, HEK293T cells were transiently transfected with plasmids coding for a constitutively expressed (CMV promoter) RXR-LBD-Gal4-DNA binding domain fusion

Received: November 16, 2018
Accepted: December 27, 2018
Published: January 4, 2019

Downloaded via UNIV FRANKFURT on February 15, 2019 at 12:30:17 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

© 2019 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203−208

receptor, a Gal4-responsive firefly luciferase, and a constitutively expressed (SV40 promoter) renilla luciferase for normalization. In total, four compounds were confirmed active on RXR at 10 μM (Figure S2) of which two were rejected due to maximal activations below 10% compared to bexarotene (**1**, 1 μM). Full dose−response characterization of the remaining hits **3** and **4** revealed comparably low micromolar potency on all RXR subtypes (7−18 μM), but **3** possessed markedly higher activation efficacy and was less toxic (Figure S3).

In silico binding mode inspection of **3** (Figure 2a) suggested favorable formation of the canonical neutralizing contact with

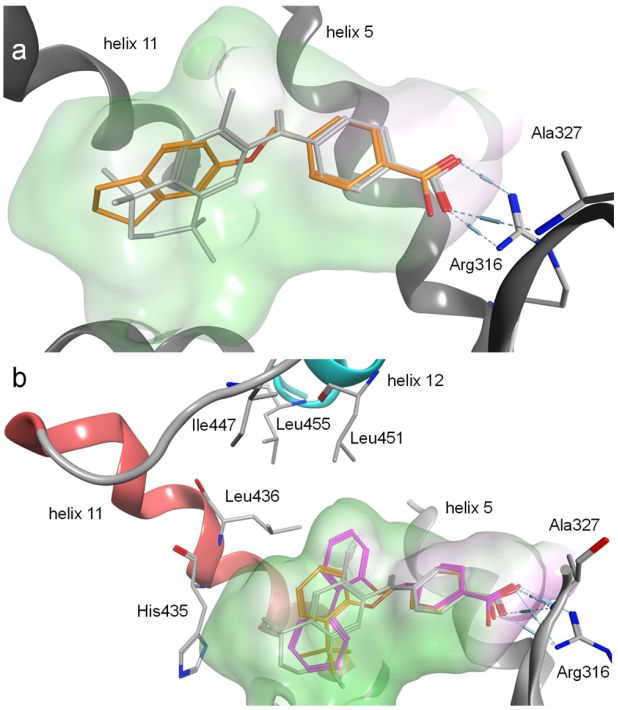
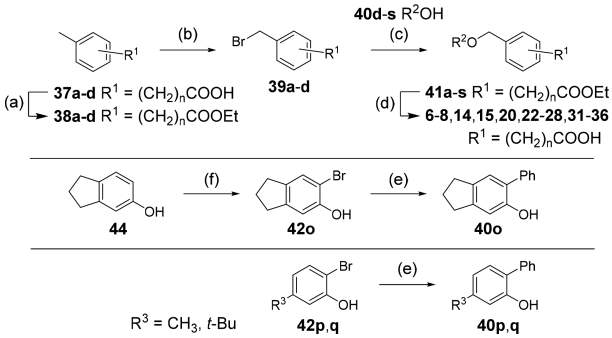


Figure 2. Molecular docking of **3**, **27**, and **28** into the ligand binding domain of RXRα (PDB-ID 4K6I). Crystallized ligand **1** in gray for comparison. Pocket surfaces are colored according to lipophilicity with green for lipophilic and red for hydrophilic. (a) **3** as **1** forms a canonical neutralizing contact with Arg316 but leaves considerable space for optimization. (b) **28** (pink) in contrast to **27** (orange) occupies an unexplored subpocket between helices 5, 11, and 12, which appears essential for stabilizing contacts to helix 12 that result in high activation efficacy.

Arg316 but also indicated considerable space for structural optimization. While the lipophilic moieties of **3** and **1** aligned well, a subpocket close to the methylene group of the crystallized ligand **1** was not occupied by **3** and further space seemed available around the indane residue. For this promising optimization potential and their favorable activity, we systematically studied the structure−activity relationship (SAR) of **3** and **4** as RXR agonists with analogues **5**−**36**.

Analogues **3**−**5**, **16**−**19**, **21**, and **29** were commercially available. The synthesis of the remaining derivatives was accomplished in three different routes (Scheme 1−3). In route A (Scheme 1), carboxylic acids of different chain lengths with terminal toluene residues (**37a**−**d**) were brominated under radical conditions as ethyl esters **38a**−**d** to benzyl bromides **39a**−**d**, which were then suitable for Williamson ether synthesis to esters **41a**−**s** with phenols **40d**−**s**. The required

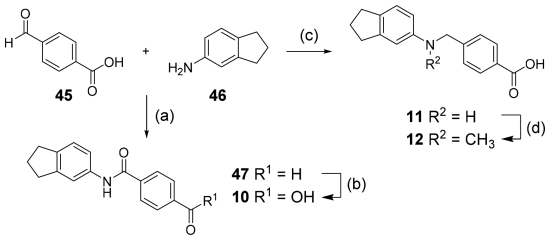
Scheme 1. Synthetic Route A to Novel RXR Agonists[1]



[1]Reagents and conditions: (a) EtOH, H_2SO_4, reflux, 77−99%; (b) NBS, AIBN, $CHCl_3$, reflux, 15−86%; (c) K_2CO_3, DMF, rt−100 °C, 28−94%; (d) LiOH, THF, H_2O, rt−50 °C, 31−99%; (e) Ph-B$(OH)_2$ (**43**), $Pd(PPh_3)_4$, Na_2CO_3, dioxane, H_2O, reflux, 40−64%; (f) NBS, DMF, rt, 80%. n is defined in Table 1; R^2 is defined in Tables 3 and 4.

phenols were either purchased or obtained from Suzuki reaction of the corresponding 2-bromophenols (**42o-q**) with phenylboronic acid (**43**). Bromination of 5-indanol (**44**) afforded 6-bromo-5-indanol (**42o**), whereas the remaining 2-bromophenols (**42p,q**) were purchased. Alkaline ester hydrolysis of **41a**−**s** then yielded test compounds **6**−**8**, **14**, **15**, **20**, **22**−**28**, and **31**−**36**. 4-Formylbenzoic acid (**45**) and 5-aminoindane (**46**) were reacted to **47** by amide coupling and to secondary amine **11** by reductive amination in Route B (Scheme 2). Subsequently, aldehyde **47** was oxidized to carboxylic acid **10**, and amine **11** was methylated in an Eschweiler-Clarke reaction affording **12** (Route B).

Scheme 2. Synthetic Route B to Novel RXR Agonists[1]



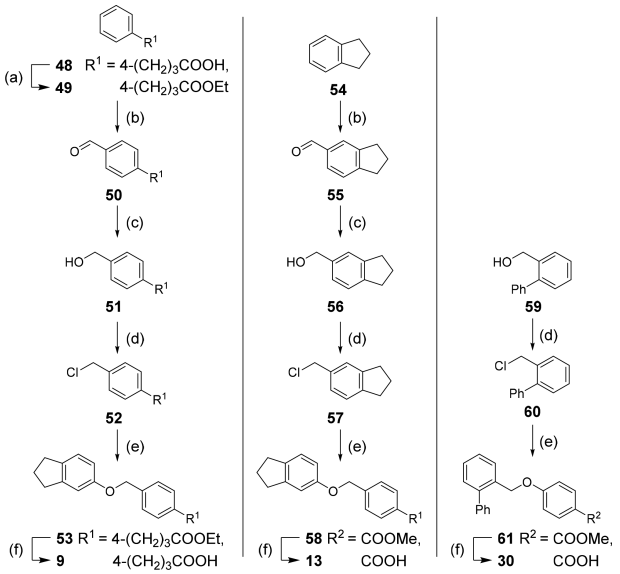
[1]Ragents and conditions: (a) EDC·HCl, 4-DMAP, $CHCl_3$, reflux, 63%; (b) oxone, DMF, rt, 29%; (c) $NaBH(OAc)_3$, DCE, HOAc, rt, 91%; (d) glacial acetic acid, formaldehyde, reflux, 54%.

For the preparation of **9**, **13**, and **30** (Route C, Scheme 3), **48** was esterified to **49**, and arenes **49** and **54** were formylated in a Duff reaction. The resulting aldehydes (**50**, **55**) were reduced to the corresponding benzyl alcohols **51** and **56**. Then **51**, **56**, and **59** were transformed to benzyl chlorides **52**, **57**, and **60** and used for Williamson ether synthesis with 5-indanol (**44**) to **53** or with methyl 4-hydroxybenzoate (**62**) to "inverted" ethers **58** and **61**, respectively. Saponification yielded the free carboxylic acids **9**, **13**, and **30**.

For a systematic SAR evaluation, we first studied the favored position and length of the carboxyl side chain (Table 1). 4-Benzoic acid **3** possessed balanced low micromolar potency on RXRs despite lower activation efficacy on RXRγ. Shifting the carboxyl group to the 2-position (**6**) significantly reduced activity on all three RXR subtypes, and 3-substitution (**5**) produced a firefly luciferase inhibitor, which rendered 4-

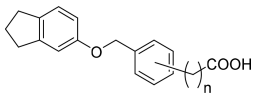
DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203−208

Scheme 3. Synthetic Route C to Novel RXR Agonists[1]



[1]Reagents and conditions: (a) EtOH, H_2SO_4, reflux, 96%; (b) hexamethylenetetramine, TFA, 100 °C, 18−60%; (c) $NaBH_4$, EtOH, 0 °C → rt, 55−59%; (d) $SOCl_2$, DCM, 0 °C, 41−80%; (e) 5-indanol (**44**) or methyl 4-hydroxybenzoate (**62**), K_2CO_3, DMF, rt−100 °C, 82−93%; (f) LiOH, THF, H_2O, rt−50 °C, 92−99%.

Table 1. Lead Optimization in the Acidic Head Region



no.	pos.	*n*	RXR*α* EC_{50} [*μ*M]	RXR*β* EC_{50} [*μ*M]	RXR*γ* EC_{50} [*μ*M]
3	4	0	6.7 ± 0.6 (29 ± 3%)	8.8 ± 0.4 (28 ± 1%)	17 ± 2 (5.0 ± 0.2%)
5	3	0	-[1]	-[1]	-[1]
6	2	0	>30	>30	>30
7	4	1	13 ± 2 (47 ± 5%)	18 ± 1 (9.9 ± 0.1%)	22 ± 1 (8.8 ± 0.1%)
8	4	2	6.7 ± 0.5 (28 ± 1%)	10 ± 1 (29 ± 2%)	21 ± 1 (19 ± 1%)
9	4	3	tox.	tox.	tox.

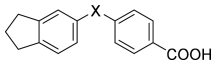
[1]Firefly luciferase inhibitor; tox., toxic at 30 *μ*M; pos., position; relative activation efficacy compared to **1** (1 *μ*M) is shown in parentheses. All values are the mean ± SEM; $n \geq 3$.

substitution as preferred geometry for RXR activation. Exploration of the side chain length in 4-position revealed decreased potency for phenylacetic acid **7**, which was restored with phenylpropionic acid **8**. On RXR*γ*, **8** was slightly superior to **3** in terms of activation efficacy (19%). Further chain elongation to **9** resulted in toxicity.

In the linker region (Table 2), ether replacement by an amide moiety (**10**) was not tolerated, and free amine **11** revealed markedly reduced potency. *N*-Methylamine **12** recovered the potency of ether **3** in terms of EC_{50} values but with diminished activation efficacy. Inverted ether **13** was active but turned out too toxic for full characterization. Still, reduced potency of **13** indicated that the linker residue of **3** was superior.

To systematically study the SAR of the lipophilic ether substituent, we started with the minimized motif **14** (Table 3)

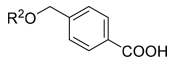
Table 2. Structure−Activity Relationship of Linker Moiety[1]



no.	X	RXR*α* EC_{50} [*μ*M]	RXR*β* EC_{50} [*μ*M]	RXR*γ* EC_{50} [*μ*M]
3		6.7 ± 0.6 (29 ± 3%)	8.8 ± 0.4 (28 ± 1%)	17 ± 2 (5.0 ± 0.2%)
10		i.a.	i.a.	i.a.
11		> 30	> 30	> 30
12		10 ± 1 (22 ± 1%)	9.9 ± 0.4 (15 ± 1%)	30 ± 1 (8.5 ± 0.2%)
13		> 30	21 ± 1 (25 ± 1%)	> 30

[1]i.a., inactive at 30 *μ*M; relative activation efficacy compared to **1** (1 *μ*M) is shown in parentheses. All values are mean ± SEM; $n \geq 3$.

Table 3. Modification in the Lipophilic Tail Region[1]



no.	R^2	RXR*α* EC_{50} [*μ*M]	RXR*β* EC_{50} [*μ*M]	RXR*γ* EC_{50} [*μ*M]
14	Ph	>30	>30	>30
15	4-Cl-Ph	>30	>30	>30
16	4-Br-Ph	40 ± 4 (21 ± 4%)	48 ± 10 (36 ± 15%)	>30
17	4-I-Ph	24 ± 1 (19 ± 1%)	29 ± 2 (25 ± 2%)	>30
18	4-Et-Ph	28 ± 3 (11 ± 1%)	35 ± 3 (7.4 ± 0.7%)	i.a.
19	4-*i*Pr-Ph	16 ± 1 (11 ± 1%)	16 ± 1 (9.5 ± 0.5%)	i.a.
4	4-*t*Bu-Ph	7.8 ± 2.4 (16 ± 4%)	8.9 ± 0.4 (15 ± 1%)	>30
20	3-Cl-Ph	17 ± 1 (54 ± 3%)	20 ± 4 (26 ± 5%)	44 ± 16 (9.3 ± 3.4%)
21	2-Cl-Ph	9.9 ± 0.5 (58 ± 2%)	8.3 ± 0.8 (31 ± 2%)	>30
22	2-F-Ph	>30	>30	>30
23	2-CH_3-Ph	5.0 ± 0.1 (24 ± 1%)	8.6 ± 1.1 (27 ± 2%)	19 ± 1 (19 ± 1%)
24	2-CF_3-Ph	1.1 ± 0.1 (22 ± 1%)	2.1 ± 0.1 (22 ± 1%)	10 ± 1 (52 ± 1%)
25	2-OCH_3-Ph	29 ± 1 (21 ± 1%)	>30	>30
26	2-OCF_3-Ph	1.1 ± 0.1 (26 ± 1%)	1.9 ± 0.1 (18 ± 1%)	4.2 ± 0.1 (25 ± 1%)
27	2-*t*Bu-Ph	0.16 ± 0.01 (11 ± 1%)	0.37 ± 0.03 (12 ± 1%)	1.1 ± 0.1 (21 ± 1%)
28	(1,1′-biphenyl)-2-yl	0.28 ± 0.01 (70 ± 1%)	0.31 ± 0.01 (44 ± 1%)	1.6 ± 0.1 (94 ± 4%)

[1]i.a., inactive at 30 *μ*M; relative activation efficacy compared to **1** (1 *μ*M) is shown in parentheses. All values are mean ± SEM; $n \geq 3$.

only carrying an unsubstituted phenyl ether, which still activated all RXRs with lower potency. Introduction of halogen substituents in 4-position (**15**−**17**) enhanced potency with increasing halogen size. Similar SAR was observed for 4-alkyl derivatives where potency increased from ethyl (**18**) over *iso*-propyl (**19**) to *tert*-butyl (**4**). However, all 4-substituents, especially alkyl residues, markedly decreased activation efficacy

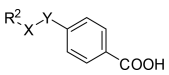
DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203−208

and were less potent on RXRγ. When we shifted the chlorine substituent from 4- (**15**) to 3-position (**20**), potency and activation efficacy were improved, but the highest activity was achieved with a 2-chlorine substituent (**21**). Further exploration of substituents in 2-position revealed that fluorine (**22**) was not favored, but small lipophilic residues such as methyl (**23**) and especially trifluoromethyl (**24**) markedly increased potency. A similar trend was observed for methoxy (**25**) and trifluoromethoxy (**26**) derivatives, where **26** demonstrated balanced high potency and efficacy on all RXRs. Further improvement was achieved with larger residues in 2-position with *tert*-butyl (**27**) and phenyl (**28**) analogues displaying nanomolar activity. While **27** despite high potency possessed weak activation efficacy, 2-phenyl derivative **28** was identified as RXR agonist with particularly high efficacy in RXRγ activation. This trend was not observed for any other compound in this series rendering **28** as potential starting point for the development of RXRγ-preferential ligands.

Systematic analysis of the SAR for the individual molecular building blocks of **3** and derivatives particularly suggested optimization potential in the lipophilic ether substituent. Striving to combine the SAR knowledge for further optimization, we fused the most promising structural elements identified for each moiety of the lead compound (Table 4).

First, we aimed to enhance the RXRγ-preferential profile of **28** by inverting the linker residue since 3-chlorine-substituted inverted ether **29** improved balance over all RXR subtypes in terms of potency and activation efficacy. However, the resulting compound **30** turned out less potent and toxic. We then combined bulky, hydrophobic elements in 2- and 4-position of the phenyl ether since both positions were favored for high potency (e.g., **4** and **28**). 2,4-Di-*tert*-butyl derivative **31**, 6-phenylindane **32**, 4-*tert*-butyl-2-phenyl combination **33**, and 4-methyl-2-phenyl analogue **34** failed to achieve any additive effect in potency, however, and were significantly less active than **28**. We hypothesized that steric reasons might explain the inactivity of these bulky combinations and investigated sterically less demanding combinations in the hydrophobic tail region with 2,4-bis(trifluoromethyl) derivative **35** and 4-*tert*-butyl-2-chloro residue **36**. Both molecules did not achieve as high potency as **28**, but **35** provided full-agonistic activity on RXRα as well as increased maximal activation of RXRβ compared to single trifluoromethyl substitution in 2-position (**24**).

Table 4. Combinations of Structural Motifs for Enhanced Potency Identified in SAR Studies[1]



no.	X	Y	R^2	RXRα EC_{50} [μM]	RXRβ EC_{50} [μM]	RXRγ EC_{50} [μM]
20	O	CH_2		17 ± 1 (54 ± 3%)	20 ± 4 (26 ± 5%)	44 ± 16 (9.3 ± 3.4%)
29	CH_2	O		27 ± 4 (27 ± 10%)	28 ± 4 (24 ± 11%)	29 ± 5 (29 ± 11%)
30	CH_2	O		> 30	> 30	tox.
31	O	CH_2		tox.	tox.	tox.
32	O	CH_2		> 30	> 30	> 30
33	O	CH_2		> 30	> 30	> 30
34	O	CH_2		> 30	> 30	tox.
35	O	CH_2		6.0 ± 0.9 (118 ± 22%)	4.3 ± 0.5 (66 ± 7%)	11 ± 2 (49 ± 8%)
36	O	CH_2		4.2 ± 0.1 (37 ± 1%)	5.3 ± 0.4 (36 ± 3%)	4.0 ± 1.0 (14 ± 2%)

[1]tox., toxic at 30 μM; relative activation efficacy compared to **1** (1 μM) is shown in parentheses. All values are mean ± SEM; $n \geq 3$.

In an attempt to rationalize the high potency of **28** and its rather strict SAR that prevented any further optimization on the phenylether moiety, we virtually studied its interaction with the RXRα ligand binding site compared to bexarotene (**1**, Figure 2b). The benzoic acid residues of **1** and **28** aligned well in the proposed binding mode and participated in the canonical neutralizing contact with Arg316. The lipophilic tails of **1** and **28** differently extended to the large lipophilic pocket of RXRα and deep burial of the central aromatic ring of **28** in a subpocket between helices 5 and 11 illustrated why no further substituents were tolerated on this ring. Instead, the calculated binding mode indicated further optimization potential at the terminal aromatic ring. Similar to previous observations,[12,13] the molecular docking simulation suggested that lack of direct interaction with helix 12 may explain lower activation efficacy of **27** compared to **1** and **28**. As a result of the bulkier 2-phenyl substituent, the central aromatic ring of **28** extended to a lipophilic subpocket between helices 5, 11, and 12. This region appears not to be addressed by **27** after all and in contrast to **27**, the central aromatic ring of **28** provided a lipophilic surface for stabilizing interactions with helix 12 that were mediated by lipophilic contacts to the network of Leu436, Leu451, and Leu455. Overall, the molecular docking suggested a binding mode for **28** that significantly differed from the classical rexinoid **1** since it protruded to unexplored regions of the pocket between helices 5 and 11 and provided a novel binding geometry rendering **28** as innovative new RXR ligand. To further evaluate this novel RXR modulator and its properties, **28** was extensively characterized *in vitro* (Figure 3).

The interaction of **28** and the RXRα LBD was studied under cell-free conditions by isothermal titration calorimetry (ITC), where **28** displayed high affinity binding with an independent binding constant K_d of 0.095 ± 0.005 μM (Figure S4). Binding was both driven by enthalpic ($\Delta H = -25$ kJ/mol) and entropic shares ($\Delta S = 49$ J/mol K). The minor difference between the K_d and EC_{50} value may be due to the cellular assay environment where activity is also affected by cell penetration and potential degradation.

Off-target profiling of **28** and the initial screening hit **3** on 12 nuclear receptors in addition to RXRs showed markedly improved selectivity for **28** (Figure 3b,c). While **3** also strongly activated RARs at 30 μM concentration, **28** was only active on RXRs. In addition, **28** possessed favorable properties compared to classical rexinoid **1** with superior aqueous solubility (**28**, 1.3 μg/mL; **1**, 0.31 μg/mL), experimental logP (**28**, 2.0; **1**, 5.2, Figure S5), and cytotoxicity (Figure S3).

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203−208

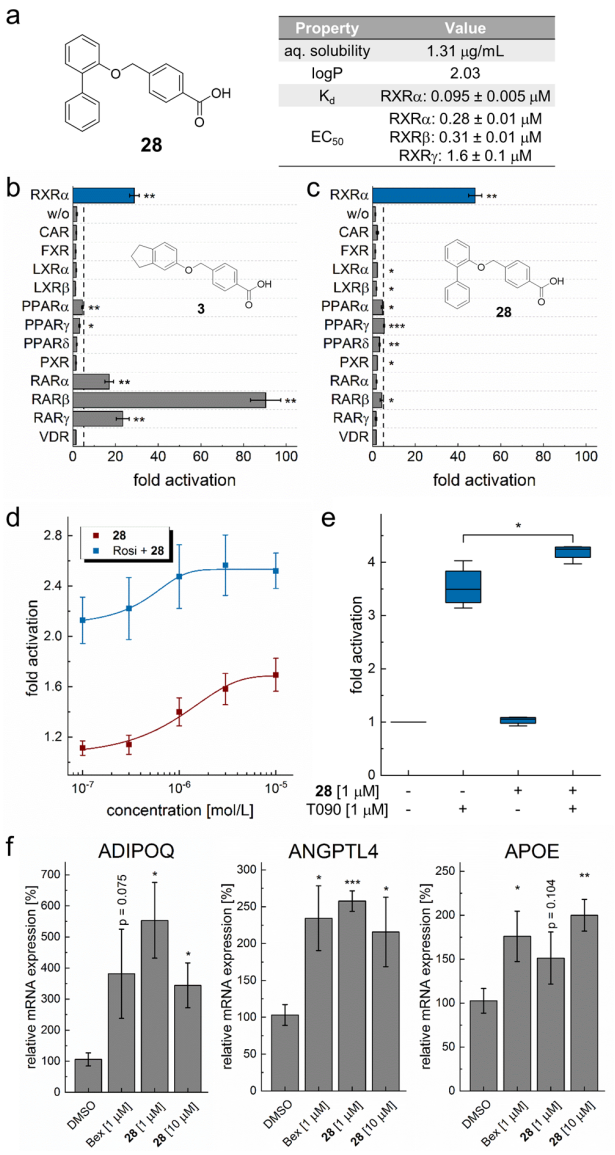


Figure 3. (a) Structure and key properties of compound **28**. (b,c) Selectivity profile of **3** and optimized derivative **28** on 12 nuclear receptors related to RXRs at 30 μM. Although **3** also activates RAR, **28** gained full RXR selectivity. $n \geq 3$. (d, e) **28** activated permissive RXR heterodimers with (d) PPAR and (e) LXR in full-length assays showing synergistic effects with the respective partner agonists rosiglitazone (Rosi) and T0901317 (T090); (d) $n = 3$, (e) $n = 4$. (f) **28** induced RXR-regulated gene expression (qRT-PCR) of adiponectin (ADIPOQ), angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), and apolipoprotein E (APOE) with similar efficacy as bexarotene (1, Bex). $n = 4$. All values are mean ± SEM; $* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$.

To further evaluate the RXR-modulatory activity of **28**, we studied its effect on the RXR heterodimers (Figure 3d,e) in reporter gene assays employing human full-length heterodimers to govern reporter gene expression (Figure 3d,e). **28** was capable of activating PPARγ-RXR with an EC_{50} value of 1.0 ± 0.2 μM and synergistically promoted its activation by PPARγ agonist rosiglitazone (1 μM) with an EC_{50} value of 0.47 ± 0.12 μM. LXR-RXR activation by **28** alone was too weak to reach statistical significance, but **28** again synergistically promoted LXR-RXR activation by LXR agonist T0901317 (1 μM).

As nuclear receptors translate ligand signals into adaptions in gene expression, we also analyzed RXR modulation by **28** on mRNA level (Figure 3f). In HepG2 cells, **28** induced the expression of adiponectin (ADIPOQ), angiopoietin-like 4 (ANGPTL4), and apolipoprotein E (APOE), which are known to be regulated by RXRs and their heterodimer partners PPAR and LXR. At 1 μM and 10 μM concentration, **28** induced gene expression with comparable efficacy as bexarotene (**1**, 1 μM). Thus, **28** was confirmed as potent and selective RXR agonist.

Potential therapeutic applications for RXR modulators are versatile. RXR agonists appear to contribute to β-amyloid clearance in Alzheimer's disease[4] and accelerate central nervous system remyelination in multiple sclerosis.[3] Apart from these neurodegenerative diseases, rexinoids also hold potential in cancer where **1** is approved for cutaneous T-cell lymphoma and **2** represents a therapeutic option in Kaposi's sarcoma. Current research also focuses on other cancer types.[6,14] Furthermore, RXR ligands showed beneficial effects in a multitude of disorders linked to the metabolic syndrome such as diabetes[15] and cardiovascular diseases.[16] However, several side-effects, among them hypertriglyceridemia,[16] hepatomegaly,[17] and hypothyroidism,[18] hinder further exploration of RXRs as therapeutic targets illustrating the high unmet need for novel RXR modulators that can overcome these obstacles.

Here we report the computer-assisted discovery and structural optimization of a new RXR activator chemotype culminating in the development of nanomolar RXR agonist **28**. *In vitro* characterization confirmed high affinity of **28** to the RXR LBD and effective induction of RXR-regulated gene expression by **28**. The compound's reduced lipophilicity, as well as improved solubility and beneficial toxicity profile, is clearly superior to the classical rexinoid **1**, which suffers from poor physicochemical properties and pronounced toxicity. Furthermore, recent reports[12,13,19] suggest that RXR modulators with partial agonistic activity offer preferable safety compared to full RXR agonists but retain therapeutic efficacy. Thus, the high potency of **28** combined with its intermediate RXR activation efficacy constitutes a very favorable pharmacodynamic profile.

Molecular docking of **28** to the RXRα LBD suggested a significantly different binding mode for **28** compared to **1**, which might enable this new RXR ligand scaffold to overcome the characteristic challenge of poor subtype selectivity in RXR targeting. Especially the slight RXRγ-favoring activity of **28** in terms of activation efficacy appears promising and might open a new avenue toward subtype selectivity. Despite its high RXR-agonistic potency, **28** has a small, rather fragment-like size (304 g/mol) and a modular architecture that will allow broad further structural variation. Therefore, the new RXR ligand scaffold of **28** contributes to the SAR of RXR modulators and can provide access to innovative RXR activators that help further explore the therapeutic potential of RXR modulation in neurodegeneration, inflammation, and cancer.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551.

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203−208

Synthesis and analytical characterization of compounds **6**–**61**, assay protocols, computational methods (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: merk@pharmchem.uni-frankfurt.de. Phone: +496979829327.

ORCID

Pascal Heitel: 0000-0001-5187-6342
Ewgenij Proschak: 0000-0003-1961-1859
Daniel Merk: 0000-0002-5359-8128

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the DFG (PR1405/2-2, SFB1039/A07). P.H. was supported by the Else-Kroener-Fresenius-Foundation funding the graduate school 'Translational Research Innovation – Pharma' (TRIP). E.P. was supported by the DFG (PR1405/4-1).

ABBREVIATIONS

ADIPOQ, adiponectin; AIBN, azobis(isobutyronitrile); ANGPTL4, angiopoietin-like 4; APOE, apolipoprotein E; CAR, constitutive androgen receptor; CMV, cytomegalovirus; DBD, DNA binding domain; DCE, 1,2-dichloroethane; DCM, dichloromethane; DMAP, 4-dimethylaminopyridine; DMF, dimethylformamide; EC, effective concentration; EDC, 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide; FXR, farnesoid X receptor; ITC, isothermal titration calorimetry; LBD, ligand binding domain; LXR, liver X receptor; NBS, *N*-Bromosuccinimide; Pos, position; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PXR, pregnane X receptor; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; THF, tetrahydrofuran; TFA, trifluoroacetic acid; RAR, retinoic acid receptor; rt, room temperature; RXR, retinoid X receptor; SAR, structure–activity relationship; SEM, standard error of the mean; VDR, vitamin D receptor

REFERENCES

(1) Germain, P.; Chambon, P.; Eichele, G.; Evans, R. M.; Lazar, M. A.; Leid, M.; De Lera, A. R.; Lotan, R.; Mangelsdorf, D. J.; Gronemeyer, H. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X Receptors. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (4), 760–772.

(2) Yamada, S.; Kakuta, H. Retinoid X Receptor Ligands: A Patent Review (2007 - 2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24* (4), 443–452.

(3) Huang, J. K.; Jarjour, A. A.; Oumesmar, B. N.; Kerninon, C.; Williams, A.; Krezel, W.; Kagechika, H.; Bauer, J.; Zhao, C.; Evercooren, A. B.-V.; et al. Retinoid X Receptor Gamma Signaling Accelerates CNS Remyelination. *Nat. Neurosci.* **2011**, *14* (1), 45–53.

(4) Cramer, P. E.; Cirrito, J. R.; Wesson, D. W.; Lee, C. Y. D.; Karlo, J. C.; Zinn, A. E.; Casali, B. T.; Restivo, J. L.; Goebel, W. D.; James, M. J.; et al. ApoE-Directed Therapeutics Rapidly Clear β-Amyloid and Reverse Deficits in AD Mouse Models. *Science* **2012**, *335* (6075), 1503–1506.

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

(6) Liby, K.; Sporn, M. Rexinoids for Prevention and Treatment of Cancer: Opportunities and Challenges. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (6), 721–730.

(7) Eshagh, K.; Romero, L. S.; So, J. K.; Zhao, X. F. Late-Onset Bexarotene-Induced CD4 Lymphopenia in a Cutaneous T-Cell Lymphoma Patient. *Cutis* **2017**, *99* (2), E30–E34.

(8) Vaz, B.; de Lera, Á. Advances in Drug Design with RXR Modulators. *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7* (11), 1003–1016.

(9) Dominguez, M.; Alvarez, S.; de Lera, A. R. Natural and Structure-Based RXR Ligand Scaffolds and Their Functions. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17* (6), 631–662.

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

(11) Boerma, L. J.; Xia, G.; Qui, C.; Cox, B. D.; Chalmers, M. J.; Smith, C. D.; Lobo-Ruppert, S.; Griffin, P. R.; Muccio, D. D.; Renfrow, M. B. Defining the Communication between Agonist and Coactivator Binding in the Retinoid X Receptor α Ligand Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (2), 814–826.

(12) Kawata, K.; Morishita, K.; Nakayama, M.; Yamada, S.; Kobayashi, T.; Furusawa, Y.; Arimoto-Kobayashi, S.; Oohashi, T.; Makishima, M.; Naitou, H.; et al. RXR Partial Agonist Produced by Side Chain Repositioning of Alkoxy RXR Full Agonist Retains Antitype 2 Diabetes Activity without the Adverse Effects. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (2), 912–926.

(13) Ohsawa, F.; Yamada, S.; Yakushiji, N.; Shinozaki, R.; Nakayama, M.; Kawata, K.; Hagaya, M.; Kobayashi, T.; Kohara, K.; Furusawa, Y.; et al. Mechanism of Retinoid X Receptor Partial Agonistic Action of 1-(3,5,5,8,8-Pentamethyl-5,6,7,8-Tetrahydro-2-Naphthyl)-1 *H* -Benzotriazole-5-Carboxylic Acid and Structural Development To Increase Potency. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (5), 1865–1877.

(14) Uray, I. P.; Dmitrovsky, E.; Brown, P. H. Retinoids and Rexinoids in Cancer Prevention: From Laboratory to Clinic. *Semin. Oncol.* **2016**, *43* (1), 49–64.

(15) Altucci, L.; Leibowitz, M.; Ogilvie, K.; de Lera, A.; Gronemeyer, H. RAR and RXR Modulation in Cancer and Metabolic Disease. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6* (10), 793–810.

(16) Lalloyer, F.; Fiévet, C.; Lestavel, S.; Torpier, G.; van der Veen, J.; Touche, V.; Bultel, S.; Yous, S.; Kuipers, F.; Paumelle, R.; et al. The RXR Agonist Bexarotene Improves Cholesterol Homeostasis and Inhibits Atherosclerosis Progression in a Mouse Model of Mixed Dyslipidemia. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **2006**, *26* (12), 2731–2737.

(17) Kapetanovic, I. M.; Horn, T. L.; Johnson, W. D.; Cwik, M. J.; Detrisac, C. J.; McCormick, D. L. Murine Oncogenicity and Pharmacokinetics Studies of 9- *Cis* -UAB30, an RXR Agonist, for Breast Cancer Chemoprevention. *Int. J. Toxicol.* **2010**, *29* (2), 157–164.

(18) Sherman, S. I.; Gopal, J.; Haugen, B. R.; Chiu, A. C.; Whaley, K.; Nowlakha, P.; Duvic, M. Central Hypothyroidism Associated with Retinoid X Receptor–Selective Ligands. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340* (14), 1075–1079.

(19) Kakuta, H.; Yakushiji, N.; Shinozaki, R.; Ohsawa, F.; Yamada, S.; Ohta, Y.; Kawata, K.; Nakayama, M.; Hagaya, M.; Fujiwara, C.; et al. RXR Partial Agonist CBt-PMN Exerts Therapeutic Effects on Type 2 Diabetes without the Side Effects of RXR Full Agonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, *3* (5), 427–432.

DOI: 10.1021/acsmedchemlett.8b00551
ACS Med. Chem. Lett. 2019, 10, 203–208

Computer-Assisted Discovery and Structural Optimization of a Novel Retinoid X Receptor Agonist Chemotype

Pascal Heitel[†], Leonie Gellrich[†], Lena Kalinowsky[†], Jan Heering[‡], Astrid Kaiser[†], Julia Ohrndorf[†], Ewgenij Proschak[†], and Daniel Merk[*,†]

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

[‡]Project Group Translational Medicine and Pharmacology TMP, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596, Frankfurt, Germany.

- Supporting Information -

Table of Contents

Supporting Figures 2

Chemistry 6

General Procedures 7

List of Compounds 9

Analytical Characterization 15

Methods for *in Vitro* Characterization 25

Computational Methods 29

Supporting References 31

Supporting Figures

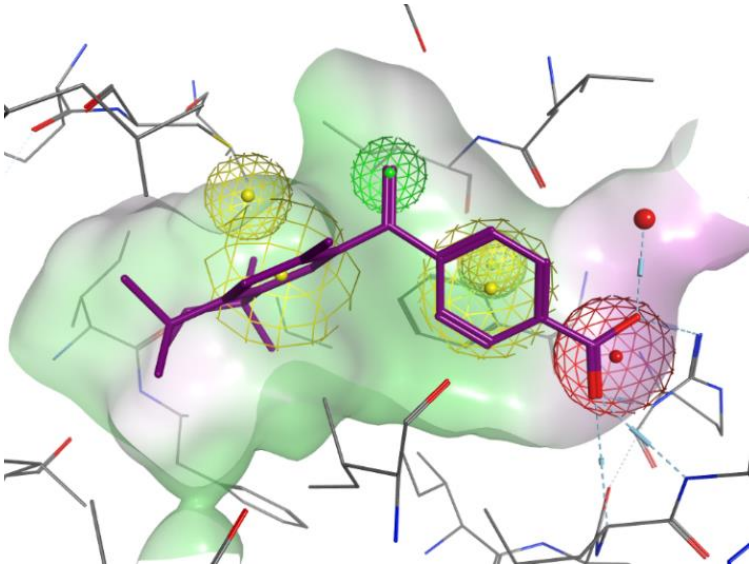


Figure S1: Pharmacophore Model of Bexarotene in Crystal Structure 4K6I. Pharmacophore features are colored by type: Aromatic centroids and corresponding pins in yellow, hydrophobic atom in green, bioisostere COO^- in red. The surface of the binding pocket is colored by lipophilicity (green: lipophilic, magenta: hydrophilic).

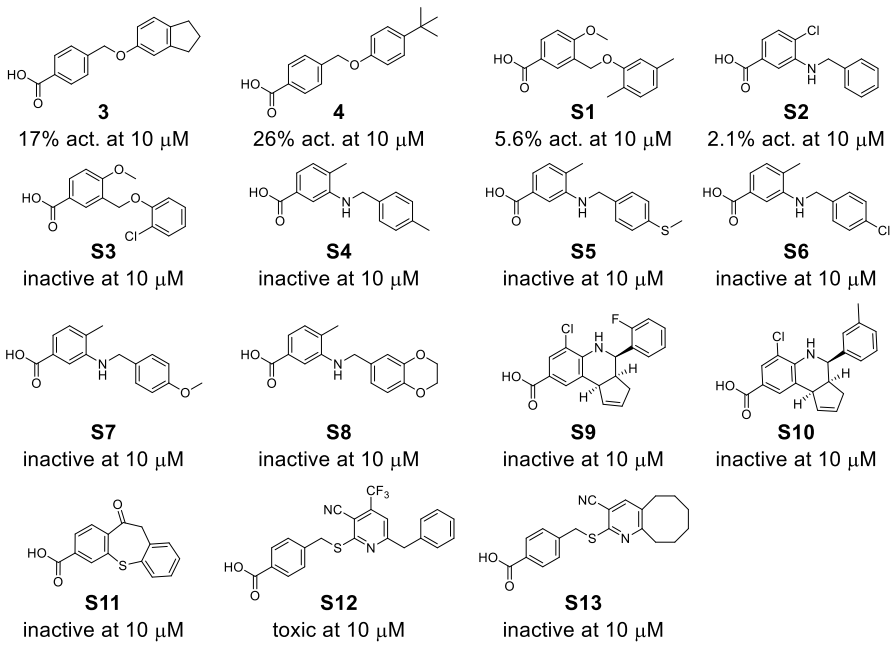


Figure S2**: **Screening Hits. Chemical structures of the 15 virtual screening hits that were tested *in vitro* in a RXRα-Gal4 hybrid reporter gene assay.

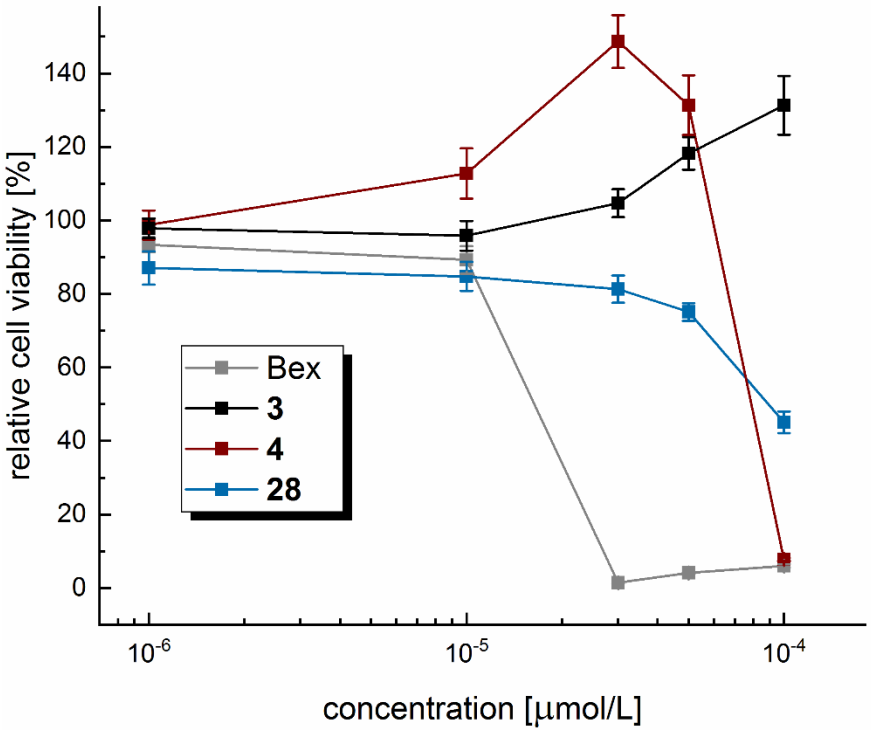


Figure S3**: **Water-Soluble Tetrazolium 1 Assay (WST-1) to Capture Test Compound Toxicity. After 48h incubation, screening hit **3** shows no toxicity in HepG2 cells and compound **4** demonstrates weak antiproliferative effects only at the highest concentration tested (100 µM). Compared to literature RXR agonist bexarotene (**1**, Bex), the optimized compound **28** exhibits markedly lower toxic effects. Results are mean ± SEM, n = 3.

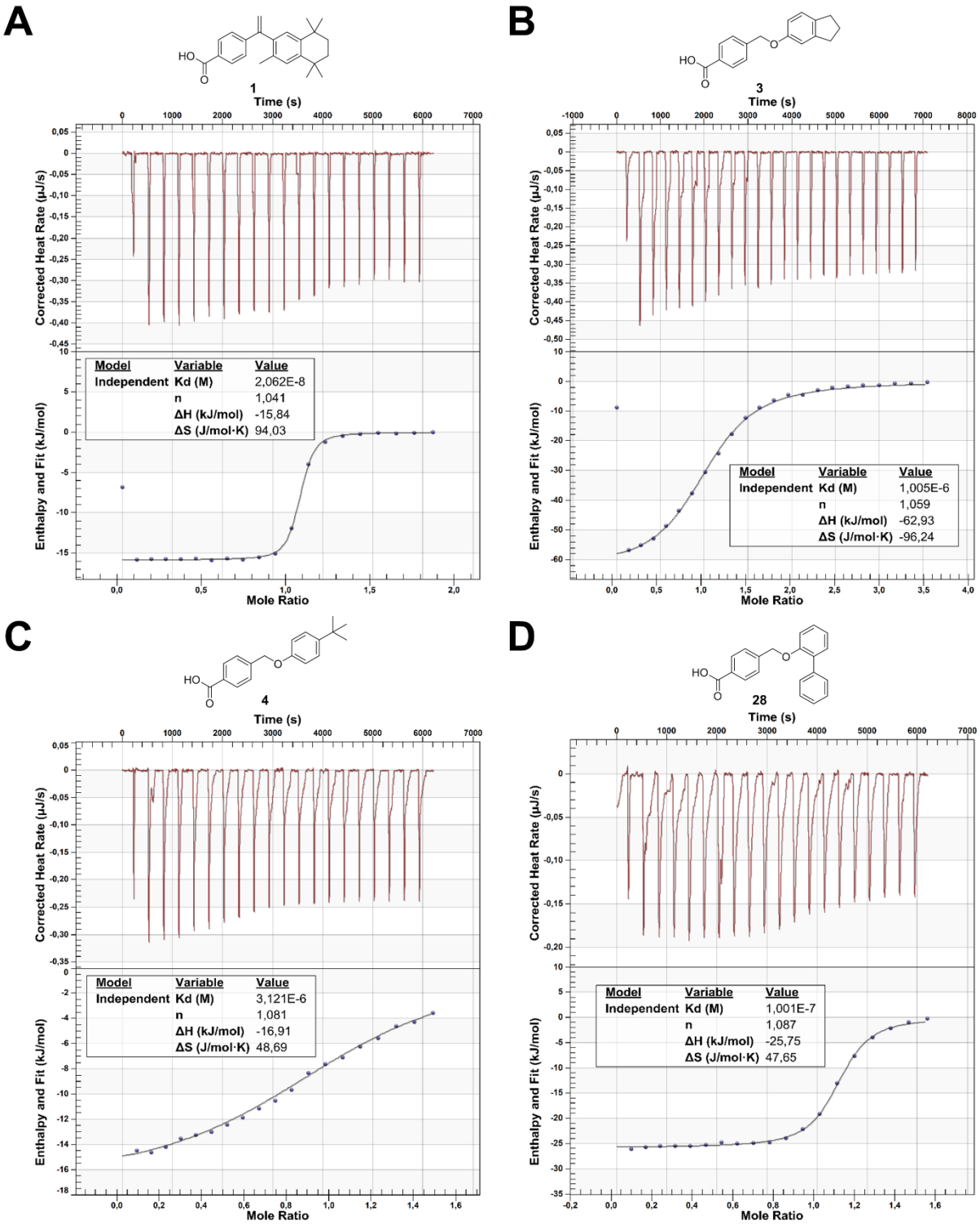


Figure S4: Isothermal Titration Calorimetry. Representative curves to determine binding affinity of literature RXR agonist bexarotene (**1**, A) and compounds **3** (B), **4** (C), and **28** (D).

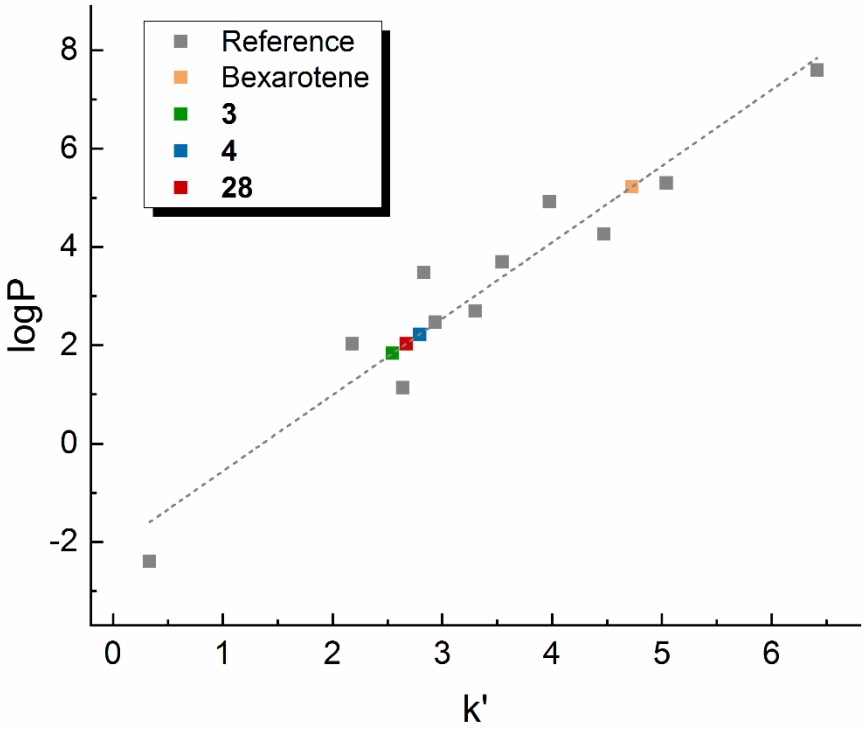


Figure S5: LogP Determination by HPLC. After calibration with eleven reference compounds (grey), test compounds **1**, **3**, **4**, and **28** were analyzed and logP was calculated relative to the references by regression. Compared to literature RXR agonist bexarotene (**1**), compounds **3**, **4**, and **28** are markedly less lipophilic.

Chemistry

General. All chemicals and solvents were obtained from commercial sources in reagent grade and used without further purification. TLC was performed using TLC-plates (silica gel 60 F254, 0.2 mm, Merck or Alugram Xtra Sil G/UV 0.2 mm, Machery-Nagel) with detection under UV-light (254 nm and 366 nm). Preparative column chromatography was performed using Silicagel 60 (Macherey-Nagel) and solvents of technical grade. Reactions with air- or moisture-sensitive compounds were carried out under argon atmosphere. NMR spectra were recorded on Bruker AM 250 XP, AV 300, AV 400, AV 500 spectrometers (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to TMS, coupling constants (*J*) in Hz. Multiplicity of signals is indicated as s for singulet, d for duplet, t for triplet, q for quartet, and m for multiplet. 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) or on a Bruker maXis ESI-Qq-TOF-MS instrument (Bruker). Compound purity was analyzed on a Varian ProStar HPLC (SpectraLab Scientific Inc., Markham, ON, Canada) equipped with a MultoHigh100 Phenyl-5 µ 240+4 mm column (CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) using a gradient (H_2O/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 nm and 280 nm. All final compounds for biological evaluation had a purity > 95%. Compounds **3-5**, **16-19**, **21**, **29**, and **S1-S13** were purchased from Specs (Zoetermeer, Netherlands).

General Procedures

(a) Esterification

The corresponding carboxylic acid (1.0 eq) was dissolved in a 20:1 (v/v) mixture of ethanol and concentrated sulfuric acid to a concentration of 0.5 mol/L and heated to reflux for 2 – 15 hours. After cooling to room temperature, the solution was neutralized with sodium carbonate and the crude product was extracted three times with ethyl acetate. The organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 and the solvent was evaporated in vacuum. If required, the product was further purified by column chromatography on silica. Compounds **38a-d** and **49** were prepared according to this general procedure in 77 – 99% yield.

(b) Bromination Under Radical Conditions

The toluene derivative (1.0 eq), *N*-bromosuccinimide (1.0 eq) and 10-mol% AIBN were suspended in dry $CHCl_3$ (2 mL/mmol) under Ar. The suspension dissolved while heating to reflux, which was kept for one hour. After cooling to room temperature, the solvent was removed under reduced pressure and the purified product was obtained after column chromatography on silica. Compounds **39a-d** were prepared according to this general procedure in 15 – 86% yield.

(c) Williamson Ether Synthesis

The corresponding alcohol (1.0 eq), benzyl bromide or benzyl chloride (0.8 – 1.2 eq) and 2.0 equivalents of potassium carbonate were suspended in dry DMF (4 mL/mmol) and stirred for 10 min. to 18 hours at rt – 100 °C. After cooling to room temperature, ethyl acetate (30 mL) was added and organic layer was washed three times with water (30 mL). The organic layer was then dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated in vacuum. Column chromatography on silica afforded the pure product. Compounds **41a-s**, **53**, **58**, and **61** were prepared according to this general procedure in 28 – 94% yield.

(d) Suzuki Reaction

The respective bromoarene (1.0 eq) and sodium carbonate (3.0 eq) were dissolved in a 4:1 mixture of 1,4-dioxane and water (c = 0.1 M) and the solvents were degassed. A catalytic amount of $Pd(PPh_3)_4$ (5.0 mol-%) and phenylboronic acid (1.2 eq) were added. The mixture was heated to reflux for 2 - 7 hours. After cooling to room temperature, 5 mL of 5% aqueous hydrochloric acid were added, the mixture was extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated in vacuum. The crude product was purified by column chromatography on silica. Compounds **40o-q** were prepared according to this general procedure in 40 – 64% yield.

(e) Alkaline Hydrolysis

An aqueous solution of lithium hydroxide (5.0 eq, c = 1.0 M) was added to a solution of the ester (1.0 eq) in THF (c = 0.05 M). The resulting mixture was either heated to 50 °C or stirred at ambient temperature until TLC indicated complete conversion. Subsequently, the solution was acidified with 5% aqueous hydrochloric acid and extracted three times with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvents were evaporated in vacuum. If necessary, further purification was achieved by column chromatography on silica. Compounds **6-9**, **13-15**, **20**, **22-28**, and **30-36** were prepared according to this general procedure in 31 – 99% yield.

(f) Duff Reaction

To a solution of the corresponding arene (1.0) in trifluoroacetic acid (5 mL/mmol) hexamethylene-tetramine (1.1 eq) was added and the mixture was heated to 100 °C for 3 – 7 hours. After cooling to room temperature, the mixture was neutralized with saturated $NaHCO_3$. The mixture was extracted three times with ethyl acetate, the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, and the solvent was

evaporated in vacuum. Purification by column chromatography afforded the pure product. Compounds **50** and **55** were prepared according to this general procedure in 18 – 60% yield.

(g) Aldehyde Reduction

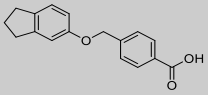
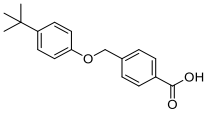
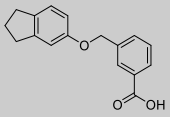
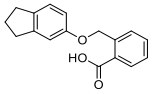
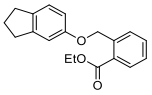
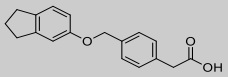
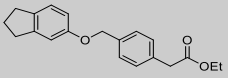
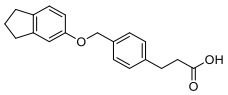
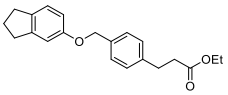
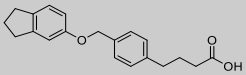
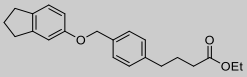
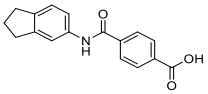
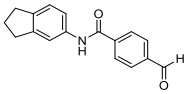
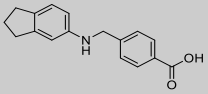
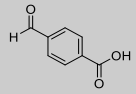
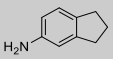
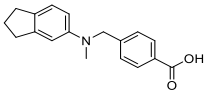
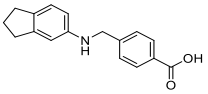
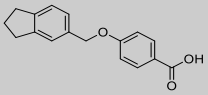
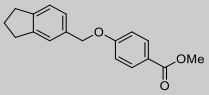
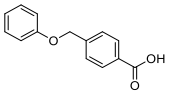
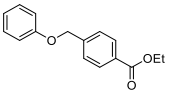
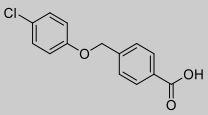
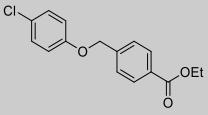
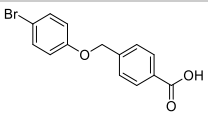
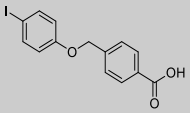
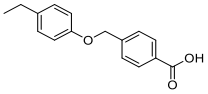
Sodium borohydride (1.5 eq) was carefully added to a solution of the respective benzaldehyde (1.0 eq) in methanol (20 mL/mmol) at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature for 2 – 3 hours and then quenched with water and 5% aqueous hydrochloric acid. The mixture was extracted three times with ethyl acetate, the combined organic layers were dried over Na_2SO_4, and the solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified with column chromatography. Compounds **51** and **56** were prepared according to this general procedure in 55 – 59% yield.

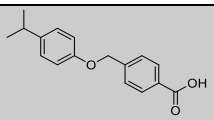
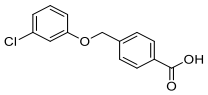
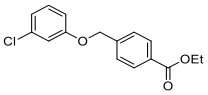
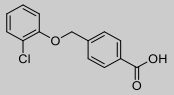
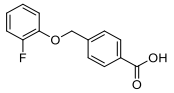
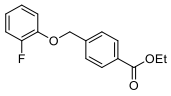
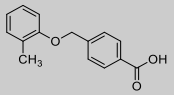
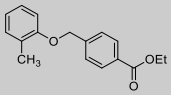
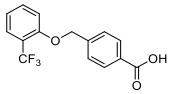
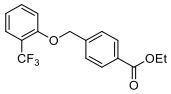
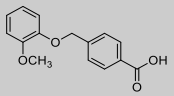
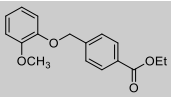
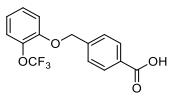
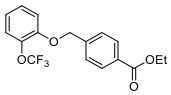
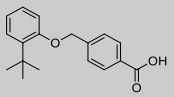
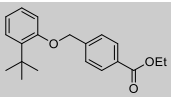
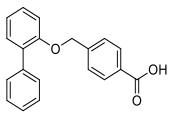
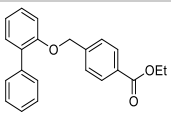
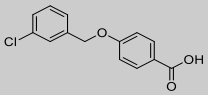
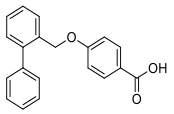
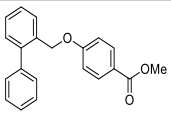
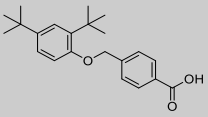
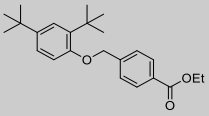
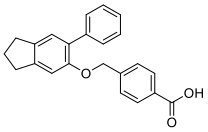
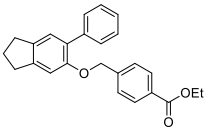
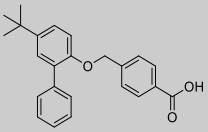
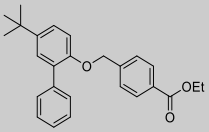
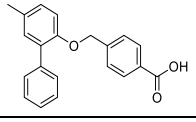
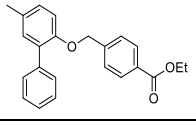
(h) Chlorination of Benzyl Alcohols

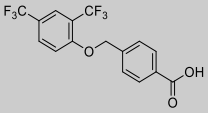
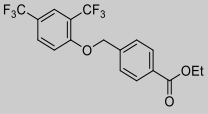
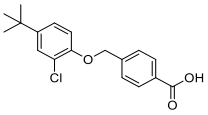
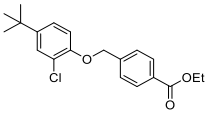
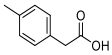
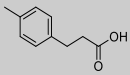
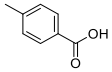
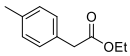
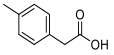
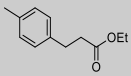
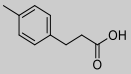
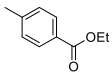
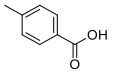
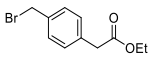
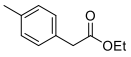
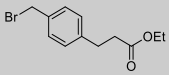
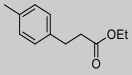
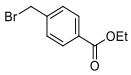
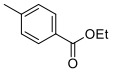
Thionyl chloride (1.3 eq) was added dropwise to a solution of the corresponding benzyl alcohol (1.0 eq) in dry CH_2Cl_2 (15 mL/mmol) at 0 °C. The solution was stirred for 1 – 2 hours. Then, water was added to stop the reaction and the solution was neutralized with $NaHCO_3$ solution. Phases were separated and the organic layer was washed twice with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent was evaporated in vacuum. If required, the product was further purified by column chromatography. Compounds **52**, **57**, and **60** were prepared according to this general procedure in 41 – 80% yield.

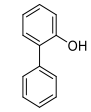
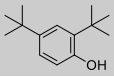
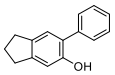
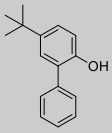
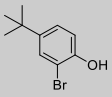
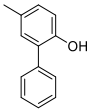
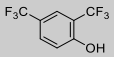
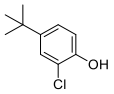
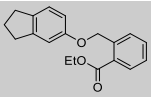
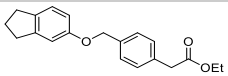
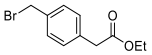
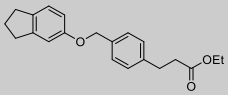
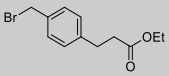
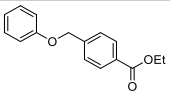
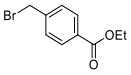
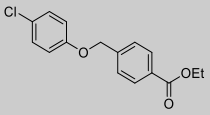
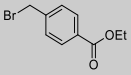
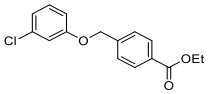
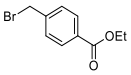
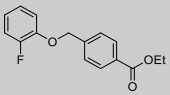
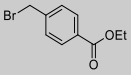
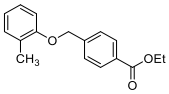
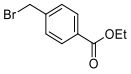
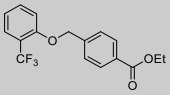
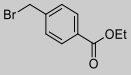
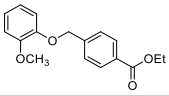
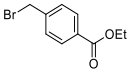
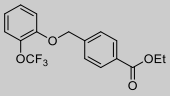
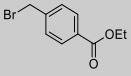
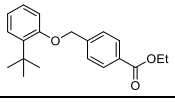
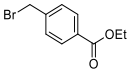
List of Compounds

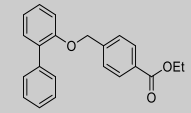
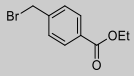
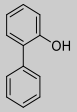
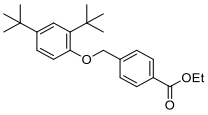
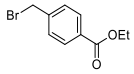
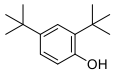
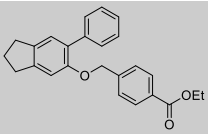
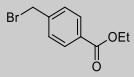
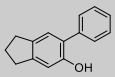
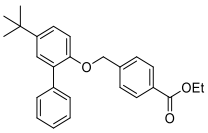
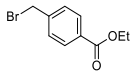
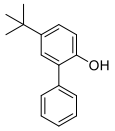
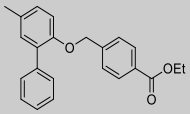
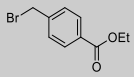
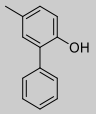
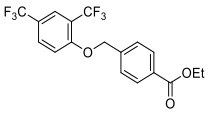
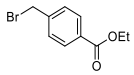
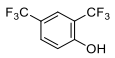
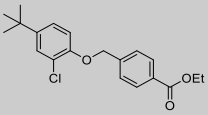
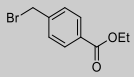
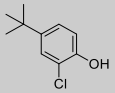
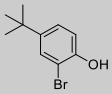
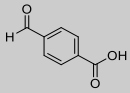
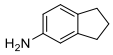
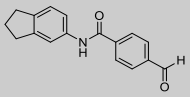
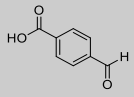
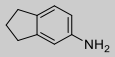
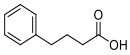
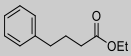
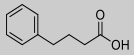
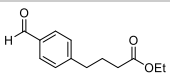
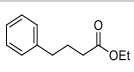
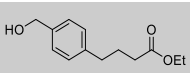
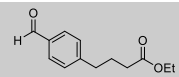
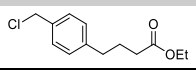
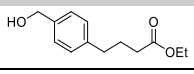
Table S1: List of Compounds.

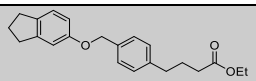
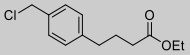
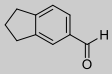
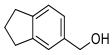
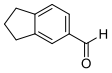
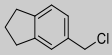
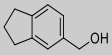
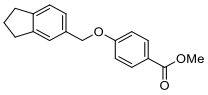
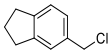
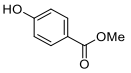
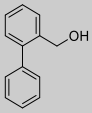
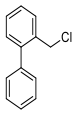
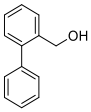
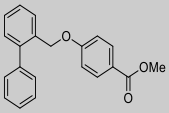
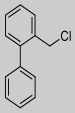
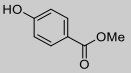
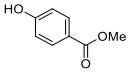
#	Structure	General Procedure	Precursor A	Structure	Precursor B	Structure
3		purchased	-	-	-	-
4		purchased	-	-	-	-
5		purchased	-	-	-	-
6		e	**41a**		-	-
7		e	**41b**		-	-
8		e	**41c**		-	-
9		e	**53**		-	-
10		-	**47**		-	-
11		-	**45**		**46**	
12		-	**10**		-	-
13		e	**58**		-	-
14		e	**41d**		-	-
15		e	**41e**		-	-
16		purchased	-	-	-	-
17		purchased	-	-	-	-
18		purchased	-	-	-	-

#	Structure	General Procedure	Precursor A	Structure	Precursor B	Structure
19		purchased	-	-	-	-
20		e	**41f**		-	-
21		purchased	-	-	-	-
22		e	**41g**		-	-
23		e	**41h**		-	-
24		e	**41i**		-	-
25		e	**41j**		-	-
26		e	**41k**		-	-
27		e	**41l**		-	-
28		e	**41m**		-	-
29		purchased	-	-	-	-
30		e	**61**		-	-
31		e	**41n**		-	-
32		e	**41o**		-	-
33		e	**41p**		-	-
34		e	**41q**		-	-

#	Structure	General Procedure	Precursor A	Structure	Precursor B	Structure
35		e	**41r**		-	-
36		e	**41s**		-	-
37a		purchased	-	-	-	-
37b		purchased	-	-	-	-
37c		purchased	-	-	-	-
37d		purchased	-	-	-	-
38a		a	**37a**		-	-
38b		a	**37b**		-	-
38c		a	**37c**		-	-
38d		a	**37d**		-	-
39a		b	**38a**		-	-
39b		b	**38b**		-	-
39c		b	**38c**		-	-
39d		b	**38d**		-	-
40d		purchased	-	-	-	-
40e		purchased	-	-	-	-
40f		purchased	-	-	-	-
40g		purchased	-	-	-	-
40h		purchased	-	-	-	-
40i		purchased	-	-	-	-
40j		purchased	-	-	-	-
40k		purchased	-	-	-	-
40l		purchased	-	-	-	-

#	Structure	General Procedure	Precursor A	Structure	Precursor B	Structure
40m		purchased	-	-	-	-
40n		purchased	-	-	-	-
40o		d	**42o**		**43**	
40p		d	**42p**		**43**	
40q		d	**42q**		**43**	
40r		purchased	-	-	-	-
40s		purchased	-	-	-	-
41a		c	**39a**		**44**	
41b		c	**39b**		**44**	
41c		c	**39c**		**44**	
41d		c	**39d**		**40d**	
41e		c	**39d**		**40e**	
41f		c	**39d**		**40f**	
41g		c	**39d**		**40g**	
41h		c	**39d**		**40h**	
41i		c	**39d**		**40i**	
41j		c	**39d**		**40j**	
41k		c	**39d**		**40k**	
41l		c	**39d**		**40l**	

#	Structure	General Procedure	Precursor A	Structure	Precursor B	Structure
41m		c	**39d**		**40m**	
41n		c	**39d**		**40n**	
41o		c	**39d**		**40o**	
41p		c	**39d**		**40p**	
41q		c	**39d**		**40q**	
41r		c	**39d**		**40r**	
41s		c	**39d**		**40s**	
42o		-	**44**			
42p		purchased	-	-	-	-
42q		purchased	-	-	-	-
43		purchased	-	-	-	-
44		purchased	-	-	-	-
45		purchased	-	-	-	-
46		purchased	-	-	-	-
47		-	**45**		**46**	
48		purchased	-	-	-	-
49		a	**48**		-	-
50		f	**49**		-	-
51		g	**50**		-	-
52		h	**51**		-	-

#	Structure	General Procedure	Precursor A	Structure	Precursor B	Structure
53		c	**52**		**44**	
54		purchased	-	-	-	-
55		f	**54**		-	-
56		g	**55**		-	-
57		h	**56**		-	-
58		c	**57**		**62**	
59		purchased	-	-	-	-
60		h	**59**		-	-
61		c	**60**		**62**	
62		purchased	-	-	-	-

Analytical Characterization

2-([{5-Indanyl}oxy]methyl)benzoic acid (**6**): Preparation according to general procedure e using **41a**. Yield: 64%. Pale yellow solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.99 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.76 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2H), 2.80 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 5.40 (s, 2H), 6.71 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.84 (d, ^{4}J = 1.9 Hz, 1H), 7.10 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.43 (ddd, ^{3}J = 7.7, 7.7 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz, 1H), 7.58 (ddd, ^{3}J = 7.6, 7.6 Hz, ^{4}J = 1.3 Hz, 1H), 7.63 (d, ^{3}J = 7.0 Hz, 1H), 7.92 (dd, ^{3}J = 7.8 Hz, ^{4}J = 1.1 Hz, 1H), 13.05 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.4, 31.4, 32.6, 67.7, 110.6, 112.7, 124.7, 127.5, 127.7, 129.3, 130.5, 132.1, 135.7, 138.8, 145.2, 157.2, 168.2 ppm. ESI-MS: *m/z* 267.11 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 291.09917 for $C_{17}H_{16}O_3Na$, found 291.09923 ([M+Na]$^+$).

4-([{5-Indanyl}oxy]methyl)phenylacetic acid (**7**): Preparation according to general procedure e using **41b**. Yield: 90%. Yellow solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.99 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.76 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2H), 2.80 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 3.56 (s, 2H), 5.02 (s, 2H), 6.74 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.87 (d, ^{4}J = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.26 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 7.36 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 12.33 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.4, 31.4, 32.6, 40.4, 69.0, 110.7, 112.8, 124.7, 127.5, 129.4, 134.5, 135.6, 135.7, 145.1, 157.2, 172.7 ppm. ESI-MS: *m/z* 281.12 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 305.11482 for $C_{18}H_{18}O_3Na$, found 305.11459 ([M+Na]$^+$).

3-([4-{(5-Indanyl)oxy}methyl]phenyl)propanoic acid (**8**): Preparation according to general procedure e using **41c**. Purification by preparative HPLC. Yield: 55%. Beige solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.99 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.53 (t, ^{3}J = 7.7 Hz, 2H), 2.76 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2H), 2.78 – 2.86 (m, 4H), 5.00 (s, 2H), 6.73 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.87 (d, ^{4}J = 1.9 Hz, 1H), 7.09 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.23 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 2H), 12.13 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.4, 30.1, 31.4, 32.6, 35.2, 69.1, 110.7, 112.8, 124.6, 127.7, 128.3, 135.0, 135.6, 140.4, 145.1, 157.3, 173.7 ppm. ESI-MS: *m/z* 295.16 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 319.13047 for $C_{19}H_{20}O_3Na$, found 319.13035 ([M+Na]$^+$).

4-(4-[{(5-Indanyl)oxy}methyl]phenyl)butanoic acid (**9**): Preparation according to general procedure e using **53**. Yield: 99%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.79 (p, ^{3}J = 7.5 Hz, 2H), 1.98 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.21 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.58 (t, ^{3}J = 7.7 Hz, 2H), 2.76 (t, ^{3}J = 7.3 Hz, 2H), 2.80 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 6.73 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.87 (d, ^{4}J = 2.0 Hz, 1H), 7.09 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.19 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 2H), 12.07 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.4, 26.3, 31.4, 32.6, 33.1, 34.1, 69.2, 110.7, 112.8, 124.7, 127.7, 128.4, 134.9, 135.6, 141.1, 145.1, 157.3, 174.3 ppm. ESI-MS: *m/z* 309.23 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 333.14612 for $C_{20}H_{22}O_3Na$, found 333.14596 ([M+Na]$^+$).

4-([5-Indanyl]carbamido)benzoic acid (**10**): *N*-(5-Indanyl)-4-formylbenzamide (**47**, 111 mg, 419 µmol, 1.0 eq) and 129 mg oxone® (419 µmol, 1.0 eq) were suspended in dry DMF under argon atmosphere and stirred for 3 hours at ambient temperature. Another equivalent of oxone® was added and the reaction stirred overnight. Ethyl acetate (30 mL) was then added and the mixture was washed once with 5% HCl and twice with water (30 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate, the solvent was evaporated in vacuum and the product obtained by column chromatography in a gradient of hex/EA (3:1) + 2% to EA + 2% HOAc as a beige solid (35 mg) with a yield of 29%. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.02 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.77 – 2.91 (m, 4H), 7.19 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 1H), 7.48 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 8.02 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 2H), 8.06 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 2H), 10.29 (s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.2, 31.9, 32.5, 116.7, 118.6, 124.1, 127.8, 129.3, 133.6, 137.1, 138.7, 139.2, 144.1, 164.7, 166.9 ppm. ESI-MS: *m/z* 280.11 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 282.11247 for $C_{17}H_{16}NO_3$, found 282.11271 ([M+H]$^+$).

4-([{5-Indanyl}amino]methyl)benzoic acid (**11**): 4-Formylbenzoic acid (**45**, 112 mg, 743 µmol, 1.0 eq) and 5-aminoindane (**46**, 109 mg, 818 µmol, 1.1 eq) were dissolved in 1,2-dichloroethane (5 mL) and acetic acid (85 µL, 1.5 mmol, 2.0 eq) under argon atmosphere. The mixture was stirred for two hours at room temperature. Subsequently, 221 mg $NaBH(OAc)_3$ (1.04 mmol, 1.4 eq) were added. After 17 h, the

reaction was quenched with water, followed by 5% aqueous hydrochloric acid and the mixture was extracted three times with ethyl acetate (3x 30 mL). The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvent was evaporated in vacuum. Purification by column chromatography in hexane/EA (3:2) + 2% HOAc afforded the title compound as a pale brown solid (182 mg, 91%). ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.90 (p, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.61 – 2.74 (m, 4H), 4.31 (s, 2H), 6.10 (br s, 1H), 6.33 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.1 Hz, 1H), 6.43 (d, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 6.87 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.88 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 12.71 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.3, 31.4, 32.6, 46.6, 108.3, 110.8, 124.3, 127.1, 129.1, 129.4, 130.9, 144.3, 146.2, 147.2, 167.3 ppm. ESI-MS: *m/z* 266.19 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 268.13321 for $C_{17}H_{18}NO_2$, found 268.13236 ([M+H]$^+$).

4-([{5-Indanyl}{methyl}amino]methyl)benzoic acid (**12**): To a mixture of **10** (50 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq) in 3 mL formic acid at 0 °C was carefully added a 37% aqueous solution of formaldehyde (3 mL). Then, the solution was heated to 100 °C for 90 minutes. Ethyl acetate (30 mL) was added to the cooled mixture and the mixture was washed three times with water (30 mL each). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent removed under reduced pressure. The product was isolated by column chromatography in hex/EA (3:1) + 2% HOAc as a yellow solid (28 mg, 54%). ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.94 (p, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.68 – 2.77 (m, 4H), 2.97 (s, 3H), 4.58 (s, 2H), 6.48 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 6.60 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H), 6.98 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.30 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.87 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 12.85 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.3, 31.3, 32.8, 39.0, 55.7, 108.3, 110.6, 124.4, 126.9, 129.2, 129.5, 131.2, 144.6, 144.9, 148.0, 167.2 ppm. ESI-MS: *m/z* 280.16 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 282.14886 for $C_{18}H_{20}NO_2$, found 282.14831 ([M+H]$^+$).

4-([5-Indanyl]methoxy)benzoic acid (**13**): Preparation according to general procedure e using **58**. Yield: 96%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.01 (p, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.78 – 2.91 (m, 4H), 5.12 (s, 2H), 7.08 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H), 7.19 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.23 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.88 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H), 12.63 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.1, 32.1, 32.1, 69.7, 114.6, 123.0, 124.0, 124.2, 126.0, 131.4, 134.3, 143.7, 144.1, 162.0, 167.0 ppm. ESI-MS: *m/z* 267.33 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 269.11722 for $C_{17}H_{17}O_3$, found 269.11721 ([M+H]$^+$).

4-(Phenoxymethyl)benzoic acid (**14**): Preparation according to general procedure e using **41d**. Yield: 93%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.19 (s, 2H), 6.95 (dd, ^3J = 7.3, 7.3 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H), 7.30 (dd, ^3J = 8.4, 7.5 Hz, 2H), 7.56 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 7.96 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 12.93 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 68.5, 114.8, 120.9, 127.4, 129.5, 129.6, 130.2, 142.2, 158.1, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 227.06 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 229.08592 for $C_{14}H_{13}O_3$, found 229.08549 ([M+H]$^+$).

4-([4-Chlorophenoxy]methyl)benzoic acid (**15**): Preparation according to general procedure e using **41e**. Yield: 66%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.02 (s, 2H), 7.04 (d, ^3J = 9.0 Hz, 2H), 7.34 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H), 7.55 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 7.96 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 12.95 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 68.9, 116.6, 124.6, 127.4, 129.3, 129.5, 130.2, 141.8, 157.0, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 261.01 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 262.03912 for $C_{14}H_{11}ClO_3$, found 262.03899 ($M^{+\bullet}$).

4-([3-Chlorophenoxy]methyl)benzoic acid (**20**): Preparation according to general procedure e using **41f**. Yield: 98%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.23 (s, 2H), 6.98 – 7.03 (m, 2H), 7.12 (dd, ^4J = 2.2, 2.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 8.2, 8.2 Hz, 1H), 7.56 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.97 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 12.98 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 68.9, 114.0, 114.9, 120.9, 127.4, 129.5, 130.3, 130.9, 133.8, 141.7, 159.1, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 261.10 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 262.04695 for $C_{14}H_{12}ClO_3$, found 263.04687 ([M+H]$^+$).

4-([2-Fluorophenoxy]methyl)benzoic acid (**22**): Preparation according to general procedure e using **41g**. Yield: 86%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.27 (s, 2H), 6.96 (dddd, ^3J = 7.9,

7.9 Hz, ^4J = 4.7, 1.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.18 – 7.29 (m, 2H), 7.57 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.97 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 69.5, 115.5 (d, $^3J_{C-F}$ = 1.3 Hz), 116.2 (d, $^2J_{C-F}$ = 17.8 Hz), 121.5 (d, $^3J_{C-F}$ = 6.9 Hz), 124.8 (d, $^4J_{C-F}$ = 3.8 Hz), 127.5, 129.6, 130.5, 141.6, 146.0 (d, $^2J_{C-F}$ = 10.4 Hz), 151.9 (d, $^1J_{C-F}$ = 243.5 Hz), 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 245.01 ([M-H]$^-$). HRMS (ESI-): *m/z* calculated 245.0619 for $C_{14}H_{10}FO_3$, found 245.0618 ([M-H]$^-$).

4-([2-Methylphenoxy]methyl)benzoic acid (**23**): Preparation according to general procedure e using **41h**. Yield: 32%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.22 (s, 3H), 5.21 (s, 2H), 6.85 (dd, ^3J = 7.3, 7.3 Hz, 1H), 6.98 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.10 – 7.20 (m, 2H), 7.58 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 7.97 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 12.98 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 16.1, 68.4, 111.6, 120.5, 125.9, 126.9, 127.0, 129.4, 130.0, 130.5, 142.5, 156.0, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 241.29 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 242.09375 for $C_{15}H_{14}O_3$, found 242.09368 ($M^{+\bullet}$).

4-([2-{Trifluoromethyl}phenoxy]methyl)benzoic acid (**24**): Preparation according to general procedure e using **41i**. Yield: 88%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.37 (s, 2H), 7.12 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.33 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.56 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 7.60 – 7.70 (m, 2H), 7.98 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 12.97 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 69.1, 114.0, 117.3 (q, $^2J_{C-F}$ = 30.0 Hz), 120.7, 123.9 (q, $^1J_{C-F}$ = 272.2 Hz), 126.9 (q, $^3J_{C-F}$ = 5.2 Hz), 127.0, 129.6, 130.3, 134.3, 141.5, 155.8, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 295.22 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 319.05525 for $C_{15}H_{11}F_3O_3Na$, found 319.05404 ([M+Na]$^+$).

4-([2-Methoxyphenoxy]methyl)benzoic acid (**25**): Preparation according to general procedure e using **41j**. Yield: 80%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 3.77 (s, 3H), 5.16 (s, 2H), 6.86 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 1.6 Hz,1H), 6.91 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 6.97 – 7.04 (m, 2H), 7.55 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.96 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 12.94 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 55.6, 69.3, 112.3, 114.0, 120.7, 121.5, 127.4, 129.5, 130.2, 142.4, 147.6, 149.3, 167.2 ppm. ESI-MS: *m/z* 257.27 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 258.08866 for $C_{15}H_{14}O_4$, found 258.08806 ($M^{+\bullet}$).

4-([2-{Trifluoromethoxy}phenoxy]methyl)benzoic acid (**26**): Preparation according to general procedure e using **41k**. Yield: 98%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.31 (s, 2H), 7.04 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.29 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 7.32 – 7.42 (m, 2H), 7.55 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 7.98 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 12.99 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 69.3, 115.0, 120.3 (q, $^1J_{C-F}$ = 256.4 Hz), 121.3, 123.2, 127.2, 128.8, 129.6, 130.3, 137.1 (q, $^3J_{C-F}$ = 1.5 Hz), 141.5, 150.4, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 311.21 ([M-H]$^-$). HRMS (ESI-): *m/z* calculated 311.0537 for $C_{15}H_{10}F_3O_4$, found 311.0544 ([M-H]$^-$).

4-([2-tert-Butylphenoxy]methyl)benzoic acid (**27**): Preparation according to general procedure e using **41l**. Yield: 31%. Pale yellow solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.35 (s, 9H), 5.23 (s, 2H), 6.89 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.04 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.17 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.25 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.60 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 12.96 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 29.7, 34.5, 69.0, 112.9, 120.6, 126.4, 127.2, 127.4, 129.6, 130.1, 137.3, 142.4, 156.9, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 283.32 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 284.14070 for $C_{18}H_{20}O_3$, found 284.14164 ($M^{+\bullet}$).

4-([{(1,1'-Biphenyl)-2-yl}oxy]methyl)benzoic acid (**28**): Preparation according to general procedure e using **41m**. Yield: 80%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.22 (s, 2H), 7.06 (ddd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 7.17 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.29 – 7.36 (m, 3H), 7.42 (dd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, 2H), 7.47 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.51 – 7.59 (m, 2H), 7.92 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 12.93 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 69.1, 113.2, 121.3, 127.0, 127.0, 128.0, 128.9, 129.4, 129.4, 130.0, 130.3, 130.6, 138.1, 142.3, 154.9, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 303.25 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 327.09917 for $C_{20}H_{16}O_3Na$, found 327.09959 ([M+Na]$^+$).

4-([{1,1'-Biphenyl}-2-yl]methoxy)benzoic acid (**30**): Preparation according to general procedure e using **61**. Yield: 92%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.01 (s, 2H), 6.96 (d, ^3J = 8.8 Hz,

2H), 7.32 – 7.50 (m, 8H), 7.61 (d, ^{3}J = 7.0 Hz, 1H), 7.85 (d, ^{3}J = 8.8 Hz, 2H), 12.60 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 67.9, 114.4, 123.2, 127.4, 127.7, 128.3, 128.6, 128.9, 129.9, 130.0, 131.3, 133.3, 139.9, 141.8, 161.7, 167.0 ppm. ESI-MS: *m/z* 303.12 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 305.11722 for $C_{20}H_{17}O_3$, found 305.11627 ([M+H]$^+$).

4-([2,4-Di-tert-butyl]phenoxymethyl)benzoic acid (**31**): Preparation according to general procedure e using **41n**. Yield: 99%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.26 (s, 9H), 1.37 (s, 9H), 5.20 (s, 2H), 6.95 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, ^{3}J = 8.5 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 7.26 (d, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 7.60 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H), 12.97 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 29.8, 31.4, 33.9, 34.6, 69.1, 112.5, 123.1, 123.5, 127.3, 129.6, 130.1, 136.4, 142.3, 142.6, 154.6, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 339.32 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 340.20330 for $C_{22}H_{28}O_3$, found 340.20294 ($M^{+\bullet}$).

4-([{6-Phenyl-5-indanyl}oxy]methyl)benzoic acid (**32**): Preparation according to general procedure e using **41o**. Yield: 90%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.03 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.83 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.87 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 7.06 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.26 – 7.33 (m, 1H), 7.39 (t, ^{3}J = 7.6 Hz, 2H), 7.44 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H), 7.48 – 7.53 (m, 2H), 7.90 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 12.92 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.4, 31.6, 32.7, 69.3, 109.6, 126.1, 126.6, 126.9, 127.9, 128.4, 129.3, 129.4, 130.0, 136.2, 138.7, 142.5, 144.4, 153.8, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 343.11 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 344.14070 for $C_{23}H_{20}O_3$, found 344.14070 ($M^{+\bullet}$).

4-([{(5-tert-Butyl-1,1'-biphenyl)-2-yl}oxy]methyl)benzoic acid (**33**): Preparation according to general procedure e using **41p**. Yield: 77%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.29 (s, 9H), 5.18 (s, 2H), 7.07 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 1H), 7.29 (d, ^{4}J = 2.5 Hz, 1H), 7.30 – 7.35 (m, 2H), 7.42 (dd, ^{3}J = 7.6, 7.6 Hz, 2H), 7.46 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 7.52 – 7.57 (m, 2H), 7.91 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 12.91 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 31.3, 33.9, 69.2, 112.9, 125.4, 126.8, 126.9, 127.5, 128.0, 129.4, 129.4, 129.6, 130.0, 138.5, 142.5, 143.4, 152.7, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 359.15 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 383.16177 for $C_{24}H_{24}O_3Na$, found 383.16135 ([M+Na]$^+$).

4-([{(5-Methyl-1,1'-biphenyl)-2-yl}oxy]methyl)benzoic acid (**34**): Preparation according to general procedure e using **41q**. Yield: 72%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.28 (s, 3H), 5.16 (s, 2H), 7.04 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.08 – 7.17 (m, 2H), 7.31 (dd, ^{3}J = 7.4, 7.4 Hz, 1H), 7.41 (dd, ^{3}J = 7.6, 7.6 Hz, 2H), 7.44 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H), 7.50 – 7.56 (m, 2H), 7.91 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H), 12.80 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 20.1, 69.2, 113.4, 126.9, 126.9, 128.0, 129.0, 129.3, 129.4, 130.0, 130.1, 130.1, 131.2, 138.2, 142.4, 152.8, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 317.21 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 319.13287 for $C_{21}H_{19}O_3$, found 319.13197 ([M+H]$^+$).

4-([{2,4-Bis(trifluoromethyl)}phenoxy]methyl)benzoic acid (**35**): Preparation according to general procedure e using **41r**. Yield: 99%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 5.48 (s, 2H), 7.50 - 7.59 (m, 3H), 7.94 (d, ^{4}J = 1.4 Hz, 1H), 7.99 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 8.05 (dd, ^{3}J = 8.9 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz, 1H), 12.96 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 69.8, 115.0, 117.9 (q, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 31.3 Hz), 121.2 (q, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 33.2 Hz), 122.9 (q, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 272.7 Hz), 123.7 (q, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 271.4 Hz), 124.2 (m), 127.1, 129.6, 130.5, 131.8 (d, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 3.4 Hz), 140.7, 158.7, 167.0 ppm. ESI-MS: *m/z* 363.02 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 365.06069 for $C_{16}H_{11}F_6O_3$, found 365.06118 ([M+H]$^+$).

4-([{4-tert-Butyl-2-chloro}phenoxy]methyl)benzoic acid (**36**): Preparation according to general procedure e using **41s**. Yield: 89%. White solid. ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.24 (s, 9H), 5.27 (s, 2H), 7.11 (d, ^{3}J = 8.7 Hz, 1H), 7.28 (dd, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (d, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 7.57 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 7.97 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 12.95 (br s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 31.1, 34.0, 69.4, 114.0, 121.1, 124.9, 126.9, 127.1, 129.5, 130.3, 141.9, 144.6, 151.1, 167.1 ppm. ESI-MS: *m/z* 317.09 ([M-H]$^-$). HRMS (MALDI): *m/z* calculated 318.10172 for $C_{18}H_{19}ClO_3$, found 318.10206 ($M^{+\bullet}$).

Ethyl 2-methylbenzoate (**38a**): Preparation according to general procedure a using 2-methylbenzoic acid (**37a**). Yield: 77%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.60 (s, 3H), 4.36 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 7.18 – 7.31 (m, 2H), 7.39 (ddd, ^{3}J = 7.5, 7.5 Hz, ^{4}J = 1.4 Hz, 1H), 7.85 - 7.96 (m, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 21.8, 60.8, 125.8, 130.1, 130.6, 131.8, 131.9, 140.1, 167.9 ppm.

Ethyl 4-methylphenylacetate (**38b**): Preparation according to general procedure a using 4-methyl-phenylacetic acid (**37b**). Yield: 99%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.25 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.33 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 4.14 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 7.13 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 2H), 7.18 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 21.2, 41.2, 60.9, 129.2, 129.4, 131.2, 136.8, 172.0 ppm.

Ethyl 3-(4-methylphenyl)propanoate (**38c**): Preparation according to general procedure a using 3-(4-methylphenyl)propanoic acid (**37c**). Yield: 90%. Pale yellow liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.60 (t, ^{3}J = 7.9 Hz, 2H), 2.91 (t, ^{3}J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 7.10 (s, 4H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 21.1, 30.7, 36.2, 60.5, 128.3, 129.3, 135.8, 137.7, 173.1 ppm.

Ethyl 4-methylbenzoate (**38d**): Preparation according to general procedure a using 4-methylbenzoic acid (**37d**). Yield: 90%. Colorless oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.40 (s, 3H), 4.36 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 7.23 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 7.94 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.6, 21.9, 61.0, 128.0, 129.3, 129.8, 143.6, 167.0 ppm.

Ethyl 2-(bromomethyl)benzoate (**39a**): Preparation according to general procedure b using **38a**. Yield: 73%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.43 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.41 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 4.96 (s, 2H), 7.37 (dd, ^{3}J = 7.3, 7.3 Hz, 1H), 7.42 – 7.54 (m, 2H), 7.97 (d, ^{3}J = 7.8 Hz, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 31.7, 61.5, 128.6, 129.7, 131.4, 131.8, 132.5, 139.2, 166.8 ppm.

Ethyl 4-(bromomethyl)phenylacetate (**39b**): Preparation according to general procedure b using **38b**. Yield: 57%. White solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.25 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 3.60 (s, 2H), 4.15 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 7.26 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 7.35 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 33.3, 41.2, 61.1, 129.4, 129.8, 134.6, 136.7, 171.4 ppm.

Ethyl 3-([4-bromomethyl]phenyl)propanoate (**39c**): Preparation according to general procedure b using **38c**. Yield: 15%. Pale yellow liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^{3}J = 7.8 Hz, 2H), 2.94 (t, ^{3}J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 7.18 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 7.32 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 30.8, 33.6, 35.8, 60.6, 128.9, 129.3, 135.9, 141.2, 172.9 ppm.

Ethyl 4-(bromomethyl)benzoate (**39d**): Preparation according to general procedure b using **38d**. Yield: 86%. Brown solid. Used for following reactions without further purification. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 7.45 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 2H), 8.01 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 32.4, 61.2, 129.1, 130.2, 130.6, 142.6, 166.2 ppm.

6-Phenyl-5-indanol (**40o**): Preparation according to general procedure d using **42o**. Yield: 40%. Yellow oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.10 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.84 – 2.96 (m, 4H), 5.05 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.33 – 7.56 (m, 5H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 26.0, 32.2, 33.1, 111.8, 125.7, 127.7, 129.3, 129.4, 129.8, 136.5, 137.9, 145.8, 151.2 ppm.

4-tert-Butyl-2-phenylphenol (**40p**): Preparation according to general procedure d using 2-bromo-4-*tert*-butylphenol (**42p**). Yield: 64%. Yellow oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.33 (s, 9H), 5.06 (s, 1H), 6.93 (dd, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 0.4 Hz, 1H), 7.25 (d, ^{4}J = 2.5 Hz, 1H), 7.29 (dd, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 2.5 Hz, 1H), 7.37 – 7.45 (m, 1H), 7.47 – 7.52 (m, 4H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 31.7, 34.3, 115.4, 126.2, 127.3, 127.6, 127.9, 129.3, 129.4, 137.8, 143.7, 150.2 ppm.

4-Methyl-2-phenylphenol (**40q**): Preparation according to general procedure d using 2-bromo-4-methylphenol (**42q**). Yield: 63%. White solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.33 (s, 3H), 5.03 (br s, 1H), 6.87 – 6.92 (m, 1H), 7.05 – 7.10 (m, 2H), 7.36 – 7.44 (m, 1H), 7.45 – 7.52 (m, 4H) ppm. ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 20.6, 115.8, 127.9, 128.0, 129.2, 129.3, 129.7, 130.1, 130.8, 137.4, 150.3 ppm.

Ethyl 2-([{5-indanyl}oxy]methyl)benzoate (**41a**): Preparation according to general procedure c using **39a** and 5-indanol (**44**). Yield: 67%. White solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.07 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.78 – 2.93 (m, 4H), 4.37 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.47 (s, 2H), 6.78 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, ^{4}J = 1.9 Hz, 1H), 7.11 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.37 (dd, ^{3}J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.54 (ddd, ^{3}J = 7.7, 7.7 Hz, ^{4}J = 1.3 Hz, 1H), 7.77 (d, ^{3}J = 7.8 Hz, 1H), 8.03 (dd, ^{3}J = 7.8 Hz, ^{4}J = 1.2 Hz, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 26.0, 32.1, 33.3, 61.2, 68.5, 111.0, 113.0, 124.9, 127.2, 127.5, 128.1, 130.8, 132.6, 136.6, 140.1, 145.9, 157.8, 167.2 ppm.

Ethyl 4-([{5-indanyl}oxy]methyl)phenylacetate (**41b**): Preparation according to general procedure c using **39b** and 5-indanol (**44**) with caesium carbonate as a base instead of potassium carbonate. Yield: 34%. Yellow oil. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.28 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.09 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.78 – 2.97 (m, 4H), 3.64 (s, 2H), 4.18 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 6.78 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.89 (d, ^{4}J = 1.8 Hz, 1H), 7.14 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.32 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 7.42 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 25.9, 32.1, 33.3, 41.3, 61.0, 70.0, 111.0, 112.9, 124.8, 127.8, 129.5, 133.8, 136.4, 136.6, 145.8, 157.8, 171.6 ppm.

Ethyl 3-([4-{(5-indanyl)oxy}methyl]phenyl)propanoate (**41c**): Preparation according to general procedure c using **39c** and 5-indanol (**44**). Yield: 68%. Pale yellow liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.07 (p, ^{3}J = 7.4 Hz, 2H), 2.62 (t, ^{3}J = 7.8 Hz, 2H), 2.79 – 2.90 (m, 4H), 2.96 (t, ^{3}J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 6.76 (dd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 2.4 Hz, 1H), 6.86 (d, ^{4}J = 1.9 Hz, 1H), 7.11 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 7.22 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H), 7.35 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 26.0, 30.8, 32.1, 33.3, 36.0, 60.6, 70.2, 111.1, 113.0, 124.9, 127.9, 128.6, 135.5, 136.6, 140.4, 145.9, 157.9, 173.0 ppm

Ethyl 4-(phenoxymethyl)benzoate (**41d**): Preparation according to general procedure c using **39d** and phenol (**40d**). Yield: 74%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.92 – 7.02 (m, 3H), 7.26 – 7.35 (m, 2H), 7.46 – 7.55 (m, 2H), 8.01 – 8.12 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 61.1, 69.3, 115.0, 121.3, 127.0, 129.6, 129.9, 130.1, 142.3, 158.6, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([4-chlorophenoxy]methyl)benzoate (**41e**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 4-chlorophenol (**40e**). Yield: 69%. White solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.09 (s, 2H), 6.84 – 6.94 (m, 2H), 7.20 – 7.26 (m, 2H), 7.48 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 8.06 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 61.2, 69.8, 116.3, 126.3, 127.0, 129.6, 130.0, 130.3, 141.8, 157.2, 166.4 ppm.

Ethyl 4-([3-chlorophenoxy]methyl)benzoate (**41f**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 3-chlorophenol (**40f**). Yield: 80%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.39 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 6.82 – 6.88 (m, 1H), 6.93 – 7.00 (m, 2H), 7.20 (dd, ^{3}J = 8.1, 8.1 Hz, 1H), 7.48 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H), 8.07 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 61.2, 69.7, 113.4, 115.5, 121.6, 127.1, 130.1, 130.4, 130.5, 135.1, 141.6, 159.3, 166.4 ppm.

Ethyl 4-([2-fluorophenoxy]methyl)benzoate (**41g**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-fluorophenol (**40g**). Yield: 78%. White solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 6.88 – 7.05 (m, 3H), 7.10 (ddd, ^{3}J = 11.4 Hz, 8.0 Hz, ^{4}J = 1.6 Hz, 1H), 7.51 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 2H), 8.06 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 61.1, 70.9, 116.0 (d, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 1.7 Hz), 116.6 (d, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 18.2 Hz), 122.0 (d,

$^{3}J_{C-F}$ = 6.9 Hz), 124.4 (d, $^{4}J_{C-F}$ = 4.0 Hz), 127.1, 130.0, 130.3, 141.8, 146.6 (d, $^{2}J_{C-F}$ = 10.6 Hz), 153.1 (d, $^{1}J_{C-F}$ = 246.0 Hz), 166.5 ppm.

Ethyl 4-([2-methylphenoxy]methyl)benzoate (**41h**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-methylphenol (**40h**). Yield: 83%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.31 (s, 3H), 4.39 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 6.80 – 6.96 (m, 2H), 7.10 – 7.22 (m, 2H), 7.52 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 2H), 8.07 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 16.5, 61.1, 69.4, 111.5, 121.0, 126.8, 126.9, 127.2, 129.9, 130.0, 131.0, 142.7, 156.7, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([2-{trifluoromethyl}phenoxy]methyl)benzoate (**41i**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-(trifluoromethyl)phenol (**40i**). Yield: 61%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.95 – 7.11 (m, 2H), 7.42 - 7.50 (m, 1H), 7.52 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 2H), 7.61 (dd, ^{3}J = 7.1 Hz, ^{4}J = 0.8 Hz, 1H), 8.07 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 61.1, 69.8, 113.3, 119.4 (q, $^{2}J_{C-F}$ = 30.9 Hz), 120.7, 123.8 (q, $^{1}J_{C-F}$ = 272.4 Hz), 126.6, 127.4 (q, $^{3}J_{C-F}$ = 5.3 Hz), 130.0, 130.3, 133.4 (q, $^{4}J_{C-F}$ = 1.0 Hz), 141.4, 156.3 (q, $^{3}J_{C-F}$ = 1.8 Hz), 166.5 ppm.

Ethyl 4-([2-methoxyphenoxy]methyl)benzoate (**41j**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-methoxyphenol (**40j**). Yield: 65%. Beige solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 3.90 (s, 3H), 4.37 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.21 (s, 2H), 6.80 – 6.89 (m, 2H), 6.90 – 6.98 (m, 2H), 7.51 (dd, ^{3}J = 8.0 Hz, ^{4}J = 0.6 Hz, 2H), 8.04 (d, ^{3}J = 8.5 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 56.1, 61.1, 70.7, 112.2, 114.5, 120.9, 122.0, 126.9, 130.0, 130.1, 142.6, 148.0, 149.9, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([2-{trifluoromethoxy}phenoxy]methyl)benzoate (**41k**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-(trifluoromethoxy)phenol (**40k**). Yield: 73%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.20 (s, 2H), 6.93 – 7.01 (m, 2H), 7.17 – 7.31 (m, 2H), 7.46 – 7.55 (m, 2H), 8.04 – 8.12 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 61.2, 70.3, 114.7, 120.9 (q, $^{1}J_{C-F}$ = 257.3 Hz), 121.5, 123.5 (q, $^{4}J_{C-F}$ = 0.8 Hz), 126.8, 128.0, 130.0, 130.3, 138.6 (q, $^{3}J_{C-F}$ = 1.7 Hz), 141.6, 151.0, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([2-tert-butylphenoxy]methyl)benzoate (**41l**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-*tert*-butylphenol (**40l**). Yield: 72%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.37 – 1.44 (m, 12H), 4.40 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.18 (s, 2H), 6.87 – 6.97 (m, 2H), 7.17 (ddd, ^{3}J = 8.0, 7.4 Hz, ^{4}J = 1.7 Hz, 1H), 7.33 (dd, ^{3}J = 7.7 Hz, ^{4}J = 1.7 Hz, 1H), 7.51 – 7.57 (m, 2H), 8.06 – 8.12 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 30.0, 35.0, 61.1, 69.7, 112.6, 121.0, 127.0, 127.1, 127.2, 130.0, 130.1, 138.5, 142.6, 157.4, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([{(1,1'-biphenyl)-2-yl}oxy]methyl)benzoate (**41m**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2-phenylphenol (**40m**). Yield: 94%. Pale yellow solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.96 – 7.04 (m, 1H), 7.08 (ddd, ^{3}J = 7.5, 7.5 Hz, ^{4}J = 1.1 Hz, 1H), 7.22 – 7.47 (m, 5H), 7.47 – 7.52 (m, 2H), 7.55 – 7.63 (m, 2H), 8.01 (dd, ^{3}J = 8.4 Hz, ^{4}J = 1.7, 1.7 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 61.1, 70.0, 113.4, 121.8, 126.6, 127.2, 128.1, 128.7, 129.2, 129.4, 129.8, 129.8, 131.2, 138.5, 142.5, 155.4, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([{2,4-di-tert-butyl}phenoxy]methyl)benzoate (**41n**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2,4-di-*tert*-butylphenol (**40n**). Yield: 51%. Colorless oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.35 (s, 9H), 1.43 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 4.42 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.18 (s, 2H), 6.86 (d, ^{3}J = 8.5 Hz, 1H), 7.20 (dd, ^{3}J = 8.5 Hz, ^{4}J = 2.5 Hz, 1H), 7.41 (d, ^{4}J = 2.5 Hz, 1H), 7.53 – 7.62 (m, 2H), 8.08 – 8.16 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 30.1, 31.7, 34.4, 35.2, 61.1, 69.7, 111.9, 123.5, 124.2, 127.0, 130.0, 130.0, 137.6, 142.9, 143.2, 155.2, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([{6-phenyl-5-indanyl}oxy]methyl)benzoate (**41o**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 6-phenyl-5-indanol (**40o**). Yield: 64%. Colorless oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$):

δ = 1.31 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.03 (p, ^{3}J = 7.5 Hz, 2H), 2.77 – 2.90 (m, 4H), 4.29 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 4.99 (s, 2H), 6.82 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.22 – 7.37 (m, 5H), 7.44 – 7.53 (m, 2H), 7.87 – 7.95 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 25.8, 32.3, 33.3, 61.0, 70.4, 110.0, 126.5, 126.7, 126.8, 128.0, 129.7, 129.7, 129.7, 129.8, 137.2, 139.1, 142.7, 144.9, 154.3, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([{(5-tert-butyl-1,1'-biphenyl)-2-yl}oxy]methyl)benzoate (**41p**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 4-*tert*-butyl-2-phenylphenol (**40p**). Yield: 58%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.38 (s, 9H), 1.42 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.40 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.13 (s, 2H), 6.96 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 1H), 7.30 – 7.51 (m, 7H), 7.63 (ddd, ^{3}J = 8.2 Hz, ^{4}J = 1.8, 1.8 Hz, 2H), 8.03 (d, ^{3}J = 8.4 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 31.6, 34.3, 61.0, 70.1, 113.0, 125.4, 126.6, 127.0, 128.1, 128.4, 129.8, 129.8, 129.8, 130.9, 139.0, 142.7, 144.4, 153.2, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([{(5-methyl-1,1'-biphenyl)-2-yl}oxy]methyl)benzoate (**41q**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 4-methyl-2-phenylphenol (**40q**). Yield: 28%. Colorless oil. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 2.35 (s, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.09 (s, 2H), 6.90 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, ^{3}J = 8.3 Hz, ^{4}J = 1.8 Hz, 1H), 7.19 (d, ^{4}J = 1.9 Hz, 1H), 7.31 – 7.40 (m, 3H), 7.39 – 7.46 (m, 2H), 7.58 (d, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 8.00 (d, ^{3}J = 8.3 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 20.7, 61.1, 70.3, 113.7, 126.6, 127.1, 128.1, 129.0, 129.7, 129.8, 129.8, 131.1, 131.5, 131.9, 138.6, 142.7, 153.4, 166.5 ppm.

Ethyl 4-([{2,4-bis(trifluoromethyl)}phenoxy]methyl)benzoate (**41r**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 2,4-bis(trifluoromethyl)phenol (**40r**). Yield: 78%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.39 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 7.09 (d, ^{3}J = 8.7 Hz, 1H), 7.44 – 7.55 (m, 2H), 7.73 (dd, ^{3}J = 8.7 Hz, ^{4}J = 2.2 Hz, 1H), 7.87 (d, ^{4}J = 1.4 Hz, 1H), 8.04 – 8.12 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 61.2, 70.1, 113.3, 119.9 (q, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 32.0 Hz), 123.0 (q, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 272.8 Hz), 123.2 (q, $^{2}J_{C\text{-}F}$ = 33.8 Hz), 123.7 (q, $^{1}J_{C\text{-}F}$ = 271.6 Hz), 125.1 (m), 126.6, 130.2, 130.6, 130.8 (q, $^{3}J_{C\text{-}F}$ = 2.9 Hz), 140.3, 158.7, 166.3 ppm.

Ethyl 4-([{4-tert-butyl-2-chloro}phenoxy]methyl)benzoate (**41s**): Preparation according to general procedure c using **39d** and 4-*tert*-butyl-2-chlorophenol (**40s**) with acetonitrile as solvent instead of dimethylformamide. Yield: 76%. White solid. ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.28 (s, 9H), 1.40 (t, ^{3}J = 7.1 Hz, 3H), 4.38 (q, ^{3}J = 7.1 Hz, 2H), 5.19 (s, 2H), 6.85 (d, ^{3}J = 8.6 Hz, 1H), 7.17 (dd, ^{3}J = 8.6 Hz, ^{4}J = 2.3 Hz, 1H), 7.40 (d, ^{4}J = 2.3 Hz, 1H), 7.54 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 2H), 8.07 (d, ^{3}J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.5, 31.5, 34.4, 61.1, 70.5, 113.9, 122.9, 124.6, 126.8, 127.8, 130.0, 130.2, 142.0, 145.5, 151.7, 166.5 ppm.

6-Bromo-5-indanol (**42o**): 5-Indanol (**44**) (271 mg, 2.02 mmol, 1.0 eq) was dissolved in 5 mL dry DMF. A solution of NBS (360 mg, 2.02 mmol, 1.0 eq) in 3 mL dry DMF was added slowly and the resulting mixture was stirred for four hours at room temperature. Ethyl acetate (30 mL) was added and the mixture washed once with 5% $Na_2S_2O_3$ solution (30 mL) and twice with water (30 mL each). The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent removed under reduced pressure. Column chromatography in hex/EA (19:1) afforded the pure product as a brown liquid (344 mg, 80%). ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.98 – 2.16 (m, 2H), 2.83 (t, ^{3}J = 7.4 Hz, 4H), 5.33 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.28 (s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 26.1, 32.1, 32.9, 107.6, 112.0, 127.2, 137.9, 146.0, 150.6 ppm.

N-(5-Indanyl)-4-formylbenzamide (**47**): 4-Formylbenzoic acid (**45**, 166 mg, 1.10 mmol, 1.1 eq), EDC hydrochloride (250 mg, 1.30 mmol, 1.3 eq), and DMAP (25 mg, 201 μmol, 0.2 eq) were suspended in 7 mL dry CH_2Cl_2. A solution of 5-aminoindane (**46**, 134 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq) in 3 mL dry CH_2Cl_2 was added and the mixture heated to reflux for 30 minutes. After cooling, diluted HCl was added and the product extracted three times with CH_2Cl_2. The combined organic layers were then dried over Na_2SO_4, the solvent evaporated and the crude product purified by column chromatography in a gradient of hex/EA (3:1 to 3:2) to afford the product as a pale yellow solid (168 mg, 63%). ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.10 (p, ^{3}J = 7.5 Hz, 2H), 2.79 – 3.02 (m, 4H), 7.21 (d, ^{3}J = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (d, ^{3}J = 7.7 Hz,

1H), 7.59 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.94 – 8.06 (m, 4H), 10.09 (s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 25.8, 32.6, 33.2, 117.1, 118.7, 124.8, 127.9, 130.1, 135.7, 138.4, 140.5, 141.4, 145.6, 164.6, 191.6 ppm.

Ethyl 4-phenylbutanoate (**49**): Preparation according to general procedure a using 4-phenylbutanoic acid (**48**). Yield: 96%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.25 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.89 – 2.04 (m, 2H), 2.32 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.66 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.15 - 7.22 (m, 3H), 7.25 – 7.32 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 26.7, 33.8, 35.3, 60.4, 126.1, 128.5, 128.6, 141.6, 173.7 ppm.

Ethyl 4-(4-formylphenyl)butanoate (**50**): Preparation according to general procedure f using **49**. Yield: 18%. Brown oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.25 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.98 (tt, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 2H), 2.33 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.73 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.34 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H), 7.81 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 9.96 (s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 26.2, 33.7, 35.4, 60.7, 129.3, 130.2, 134.7, 149.2, 173.6, 192.4 ppm.

Ethyl 4-(4-[hydroxymethyl]phenyl)butanoate (**51**): Preparation according to general procedure g using **50**. Yield: 55%. Brown oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.17 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.80 (tt, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 2H), 2.27 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.56 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.45 (s, 2H), 5.10 (br s, 1H), 7.13 (d, ^3J = 8.0 Hz, 2H), 7.22 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 26.4, 32.9, 34.0, 59.7, 62.8, 126.6, 128.0, 139.7, 140.1, 172.7 ppm.

Ethyl 4-(4-[chloromethyl]phenyl)butanoate (**52**): Preparation according to general procedure h using **51**. Yield: 41%. Pale yellow oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.25 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.86 – 2.04 (m, 2H), 2.32 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.65 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.12 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.57 (s, 2H), 7.14 - 7.21 (m, 2H), 7.27 – 7.34 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 26.5, 33.7, 34.9, 46.3, 60.4, 128.8, 129.0, 135.3, 142.0, 173.5 ppm.

Ethyl 4-(4-[{(5-indanyl)oxy}methyl]phenyl)butanoate (**53**): Preparation according to general procedure c using **52** and 5-indanol (**44**). Yield: 82%. Colorless oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.26 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.97 (p, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.08 (p, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.33 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.67 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.79 – 2.96 (m, 4H), 4.14 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.77 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H), 6.88 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 7.12 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 7.20 (d, ^3J = 8.1 Hz, 2H), 7.36 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 26.0, 26.6, 32.1, 33.3, 33.8, 35.0, 60.4, 70.3, 111.1, 113.0, 124.9, 127.8, 128.8, 135.2, 136.5, 141.3, 145.8, 158.0, 173.6 ppm.

5-Indanylcarbaldehyde (**55**): Preparation according to general procedure f using indane (**54**). Yield: 60%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.13 (p, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.97 (t, ^3J = 7.5 Hz, 4H), 7.36 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.65 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 9.95 (s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 25.5, 32.5, 33.3, 124.9, 125.3, 129.0, 135.4, 145.4, 152.2, 192.5 ppm.

5-Indanylmethanol (**56**): Preparation according to general procedure g using **55**. Yield: 59%. Yellow solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.91 (br s, 1H), 2.10 (p, ^3J = 7.3 Hz, 2H), 2.92 (t, ^3J = 7.4 Hz, 4H), 4.64 (s, 2H), 7.13 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.17 – 7.27 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 25.6, 32.7, 32.9, 65.6, 123.4, 124.5, 125.3, 139.0, 143.9, 144.8 ppm.

5-(Chloromethyl)indane (**57**): Preparation according to general procedure h using **56**. Yield: 80%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.08 (p, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 – 2.96 (m, 4H), 4.58 (s, 2H), 7.15 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.21 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 25.6, 32.8, 32.9, 46.9, 124.7, 124.9, 126.8, 135.5, 144.9, 145.1 ppm.

Methyl 4-([5-indanyl]methoxy)benzoate (**58**): Preparation according to general procedure c with methyl 4-hydroxybenzoate (**62**) and **57**. Yield: 90%. White solid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.99 (p, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.4 Hz, 4H), 3.78 (s, 3H), 4.96 (s, 2H), 6.85 – 6.93 (m, 2H), 7.08 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.14 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.86 – 7.93 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR

(75 MHz, $CDCl_3$): δ = 25.6, 32.7, 32.9, 51.9, 70.5, 114.5, 122.8, 123.9, 124.6, 125.8, 131.7, 134.1, 144.6, 144.9, 162.7 166.9 ppm.

2-(Chloromethyl)-1,1'-biphenyl (**60**): Preparation according to general procedure h using [1,1'-biphenyl]-2ylmethanol (**59**). Yield: 58%. Colorless liquid. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.54 (s, 2H), 7.27 – 7.34 (m, 1H), 7.34 – 7.50 (m, 7H), 7.52 – 7.59 (m, 1H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 44.6, 127.6, 128.1, 128.5, 128.7, 129.3, 130.5, 130.7, 135.1, 140.3, 142.2 ppm.

Methyl 4-([{1,1'-biphenyl}-2-yl]methoxy)benzoate (**61**): Preparation according to general procedure c using **60** and **62**. Yield: 93%. Colorless oil. ^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.89 (s, 3H), 5.02 (s, 2H), 6.84 – 6.93 (m, 2H), 7.32 – 7.49 (m, 8H), 7.57 – 7.68 (m, 1H), 7.93 – 8.03 (m, 2H) ppm. ^{13}C-NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 51.9, 68.3, 114.5, 122.9, 127.5, 127.8, 128.4, 128.4, 129.2, 129.3, 130.3, 131.6, 133.5, 140.4, 142.1, 162.4, 166.9 ppm.

Methods for in Vitro Characterization

Hybrid reporter gene assays for PPARα/γ/δ, LXRα/β, RXRα/β/γ, RARα/β/γ, FXR, VDR, CAR and PXR

Plasmids: The Gal4-fusion receptor plasmids pFA-CMV-hPPARα-LBD[1], pFA-CMV-hPPARγ-LBD[1], pFA-CMV-hPPARδ-LBD[1], pFA-CMV-hLXRα-LBD[2], pFA-CMV-hLXRβ-LBD[2], pFA-CMV-hRXRα-LBD[3], pFA-CMV-hRXRβ-LBD[3], pFA-CMV-hRXRγ-LBD[3], pFA-CMV-hRARα-LBD[3], pFA-CMV-hRARβ-LBD[3], pFA-CMV-hRARγ-LBD[3], pFA-CMV-hFXR-LBD[2], pFA-CMV-hVDR-LBD[3], pFA-CMV-hCAR-LBD[3] and pFA-CMV-hPXR-LBD[3] coding for the hinge region and ligand binding domain (LBD) of the canonical isoform of the respective nuclear receptor have been reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth.

Assay procedure: HEK293T cells were 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_2. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ($3 \cdot 10^4$ 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 the corresponding Gal4-fusion nuclear receptor plasmid. 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (12-14 h) incubation with the test compounds, 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 (PPARα: GW7647; PPARγ: pioglitazone; PPARδ: L165,041; LXRα/β: T0901317; RXRα/β/γ: bexarotene; RARα/β/γ: tretinoin; FXR: GW4064; VDR: calcitriol; CAR: CITCO; PXR: SR12813). All hybrid assays were validated with the above-mentioned reference agonists which yielded EC_{50} values in agreement with literature.

Reporter gene assays for the human full-length heterodimers RXR-PPARγ and RXR-LXR

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_2. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ($3 \cdot 10^4$ 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 the reporter RXR-PPARγ responsive construct PPRE1-pGL3 or the RXR-LXR responsive construct ABCA1-pGL3 as well as pRL-SV40 (Promega). 5 h after transfection, medium was changed to Opti-MEM supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), now additionally containing 0.1% DMSO and the respective test compound or 0.1% DMSO alone as untreated control. Each concentration was tested in duplicates and each experiment was repeated independently at least three times. Following overnight (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.

RXR target gene quantification (quantitative real-time PCR)

HepG2 cells were incubated with compound **28** (1 and 10 µM), bexarotene (1 µM), or 0.1% DMSO alone as untreated control for 8 h, harvested, washed with cold phosphate buffered saline (PBS) and then directly used for RNA extraction with the Total RNA Mini Kit (R6834-02, Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, USA). One microgram of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Thermo Fischer Scientific, Inc.) according to the manufacturer's protocol. RXR target gene expression was evaluated by quantitative real time PCR analysis with a StepOnePlus™ System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using PowerSYBRGreen (Life Technologies; 12.5 µL per well). The following primers were used:

Table S2: Primers Used for RXR Target Gene Quantification.

Gene	Forward Primer (5' → 3')	Reverse Primer (5' → 3')
GAPDH	ATA TGA TTC CAC CCA TGG CA	GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC
ADIPOQ	TGG CTA TGC TCA CAG TCT CAC ATC	CTC TGT GCC TCT GGT TCC ACA A
ANGPTL4	ATT CTT TCC AGC GGC TTC TG	GAG GAC TGG AGA CGC GGA G
APOE	GGT CGC TTT TGG GAT TAC CT	CTC CAG TTC CGA TTT GT

Each sample was set up in duplicates and repeated in four independent experiments. The expression was quantified by the comparative ΔΔCt method and glycerinealdehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) served as reference gene. The obtained ΔCt values were compared to the mean ΔCt of the negative control. Results (expressed as mean fold activation ± SEM; n = 4): ADIPOQ: DMSO: 106 ± 21%; bexarotene (1 µM): 382 ± 144%; **28** (1 µM): 553 ± 122%; **28** (10 µM): 344 ± 72%. ANGPTL4: DMSO: 103 ± 14%; bexarotene (1 µM): 234 ± 44%; **28** (1 µM): 258 ± 14%; **28** (10 µM): 216 ± 47%. APOE: DMSO: 103 ± 14%; bexarotene (1 µM): 176 ± 29%; **28** (1 µM): 151 ± 30%; **28** (10 µM): 200 ± 18%.

Isothermal titration calorimetry (ITC)

Isothermal titration calorimetry (ITC) was conducted on an Affinity ITC (TA Instruments Affinity ITC). Recombinant RXRα ligand binding domain protein (100 µM) and **3**, **4**, **28**, and bexarotene (**1**, 20 µM) were each dissolved in a HEPES buffer (25 mM; adjusted to pH 7.5 with KOH; further containing 150 mM KF, 10% glycerol (w/w), 1% DMSO (v/v) and 5 mM DTT). The ITC instrument was adjusted to a temperature of 25 °C and the stirring rate was set at 75 rpm. 190 µL of tested compound were filled into the reaction cell and RXRα ligand binding domain solution was titrated in 20 - 23 injections (inverse titration). The first injection had a reduced volume of 1.0 µL and was followed by injections of 2.5 µL. An interval of 300 s was maintained between individual injections. The heats of dilution resulting from titrating RXRα ligand binding domain protein solution into the buffer solution were recorded in an additional ITC run and subtracted from the respective raw ITC data. ITC raw data was analyzed using

NanoAnalyze software package (version 3.7.5). An independent binding model was used to fit the reaction enthalpy (ΔH), binding affinity constant (K_d), and stoichiometry (n). Free energy change (ΔG) was calculated from the equation $\Delta G = -RT \ln K$ and the entropy (ΔS) was calculated from $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.

LogP Determination

LogP values of **3**, **4**, **28** and bexarotene were determined by HPLC analysis using a VWR Hitachi Chromaster System with DAD 5430. The HPLC column was a MultoHigh 100RP18 (4,6 mm I.D., 250 mm length, 5 µ particle size) from Chromatographie-Service GmbH (Langerwehe, Germany). A linear gradient was used with mobile phase A as 100% acetonitrile, and mobile phase B as 100% 10 mM ammonium acetate (adjusted to pH 7.4 with ammonium hydroxide and acetic acid). The gradient table was: 0 min/ 5% A, 2.0 min/ 5% A, 12.0 min/ 95% A, 20 min/ 95% A, 30 min/ 5% A, 35 min/ 5% A. Flow rate was 0.5 ml/min, and UV spectra were collected at 254 nm and 280 nm. The samples were dissolved in DMSO at 30 µM and 50 µL were injected.

The HPLC capacity factor k' was determined according to:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0},$$

Where t_R is the retention time and t_0 the retention time of the unretained reference compound (thiourea). The logP was calibrated to k' by running 11 reference compounds (see below) and plotting k' versus literature logP values.[5] All determinations were performed three times.

Reference compounds:

Table S3: List of Reference Compounds for LogP Determination.

Compound	t_R - t_0 [min.]	k'	logP (literature)	logP (calculated)	ΔlogP
Thiourea	0				
Levodopa	1.062	0.331979167	-2.39	-1.60	-0.79
Chloramphenicol	8.446	2.63921875	1.14	1.98	-0.84
Furosemide	6.972	2.17875	2.03	1.27	0.76
Phenytoin	9.392	2.935052083	2.47	2.44	0.03
Albendazole	10.550	3.296927083	2.7	3.00	-0.30
Propranolol	9.054	2.829479167	3.48	2.28	1.20
Amodiaquine	11.337	3.542760417	3.7	3.39	0.31
Lovastatin	14.311	4.4721875	4.26	4.83	-0.57
Amitriptyline	12.722	3.975625	4.92	4.06	0.86
Fenofibrate	16.129	5.040416667	5.3	5.71	-0.41
Clofazimine	20.525	6.414166667	7.6	7.84	-0.24
Bexarotene (**1**)	15.130	4.72817708		5.23	
3	8.143	2.5446875		1.84	
4	8.943	2.79479167		2.23	
28	8.542	2.66947917		2.03	

Aqueous solubility

Aqueous solubility of compounds **3**, **4**, **28** and bexarotene (**1**) was determined using Whatman Uniprep filters (Whatman plc, Maidstone, UK). 3 mg of each compound and 2 mL H_2O dest. were inserted into the Uniprep vessel and the mixture was shaken at 37 °C for 24 h. The mixture was then pressed through the Uniprep filter and the concentration of dissolved compound in filtrate was quantified by HPLC

(Waters 600 Controller and Waters 2487 Dual Absorbance Detector equipped with a MultoHigh100 Phenyl 5 µ 240+4 mm column, CS-Chromatographie Service GmbH) using external calibration.

WST-1 assay

WST-1 assay (Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz) was performed according to manufacturer's protocol and as described previously.[4] In brief, HepG2 cells were seeded in DMEM high glucose, supplemented with sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% FCS in 96-well plates ($3 \cdot 10^4$ cells/well). After 24 h, medium was changed to DMEM high glucose, supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 1% charcoal stripped FCS and cells were incubated with **3**, **4**, **28**, and bexarotene (final concentrations 1 µM, 10 µM, 30 µM, 50 µM and 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 35 min incubation, absorption (450 nm/ reference: 620 nm) was determined with a Tecan Infinite M200 (Tecan Deutschland GmbH). Each experiment was repeated three times in triplicates. Results are expressed as mean percent of untreated control ± SEM and the negative DMSO control was set to 100% cell viability.

Computational Methods

General

Calculations were conducted in Molecular Operating Environment (MOE,[6] v 2015.10, Chemical Computing Group Inc. Montreal, QC, Canada) and KNIME (KNIME AG, Zurich, Switzerland)[7] using default settings for each tool/function unless stated otherwise.

Pharmacophore Model

A pharmacophore model was developed based on the retinoid X receptor X-ray structure PDB code 4K6I. The protein-ligand complex was prepared in MOE. The complex was protonated using the *Protonate 3D*[8] function and complex energy was minimized using the *Energy Minimize* function with default settings. The *Pharmacophore Editor* tool was used to set pharmacophore features on the co-crystalized ligand bexarotene. The pharmacophore used for virtual screening consisted of two aromatic centroids, a hydrophobic atom and a bioisostere annotation for COO^- (O2) as illustrated in figure S1. In addition, excluded volume outlining the binding pocket was created. Poses invading the excluded volume were rejected.

Data set preparation

The Specs database[9] (version march 2016 (total of 212,452 unique compounds)) was used for screening. For library preparation, hydrogen atoms were added using the software package MOE. Only compounds containing an acidic functional group (including carboxylic acid, sulfonic acid or thiocarboxylic acid group) were collected, reducing the database to 6,298 compounds. Up to 250 3D conformers were generated per compound using the *Conformations node* (MOE; stochastic search algorithm, max. conformations: 250, energy window: 4.0, all other options default) in KNIME. In total, 46,059 conformers were generated with a median of 4 conformers per compound. Bexarotene and the corresponding pharmacophore model served as the reference for the database screening. On this account, a superimposition on bexarotene and shape-based filtering step of the filtered Specs conformer database was conducted. The ShaEP software was used to superimpose the conformers by the molecular electrostatic potential (MEP) field and volume overlap. This algorithm yielded a similarity index allowing a shape-based filtering step[10]. The 3,000 compounds (as a 3D conformer) with the highest similarity index to bexarotene were selected as the screening dataset.

Data set screening

The pharmacophore screening in the above described subset of the Specs library was realized using the *Pharmacophore Search* function in MOE with the pharmacophore model shown in figure S1. Within the 3000 screening compounds with high similarity to bexarotene, the screening retrieved a total of 29 hits. Those hits were manually inspected and 15 compounds (Figure S2) with maximum diversity were selected for *in vitro* characterization.

Molecular Docking

Docking was performed using MOE software suite (version 2018.0101, Chemical Computing Group Inc., Montreal, QC, Canada). X-ray structure of RXRα (PDB code 4K6I) was selected based on ligand similarity to bexarotene. Protonation state of the complex was adjusted using the Protonate3D tool.

Docking was performed using following settings from MOE Dock tool: Site: Ligand Atoms; Placement: Triangle Matcher; Score: London dG; Refinement: Induced Fit; Refinement Score: Alpha HB for compounds **27** and **28** and GBVI/WSA dG for compounds **3** and **4**. The top-ranked binding-mode was used. For the generation of the minimum energy conformation, the surrounding receptor was deleted and QM-based energy minimization was performed using the MOPAC engine built in MOE with the AM1 basis set. Pocket surfaces were colored violet for hydrophilic, white for neutral, and green for lipophilic areas.

Supporting References

(1) Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-Tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**, *72* (10), 881–887.

(2) Heitel, P.; Achenbach, J.; Moser, D.; Proschak, E.; Merk, D. DrugBank Screening Revealed Alitretinoin and Bexarotene as Liver X Receptor Modulators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *27* (5), 1193–1198.

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

(4) 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.

(5) The PubChem Project https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ (accessed Nov 5, 2018).

(6) Chemical Computing Group Inc. Molecular Operating Environment (MOE), 2015.10. 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7 2016.

(7) Berthold, M. R.; Cebron, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kotter, T.; Meinl, T.; Ohl, P.; Sieb, C.; Thiel, K.; Wiswedel, B. *KNIME: The Konstanz Information Miner*; Springer, 2007.

(8) Labute, P. Protonate3D: Assignment of Ionization States and Hydrogen Coordinates to Macromolecular Structures. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *75* (1), 187–205.

(9) The Specs.net chemistry database / Specs search engine website https://www.specs.net/snpage.php?snpageid=home (accessed Nov 5, 2018).

(10) Vainio, M. J.; Puranen, J. S.; Johnson, M. S. ShaEP: Molecular Overlay Based on Shape and Electrostatic Potential. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**.

16.4 Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses

Merk, D.; **Heitel, P.**; Faudone, G.; Schmidt, J.; Schubert-Zsilavecz, M. Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses. DE 10 2017 122 062.3, filed September 22, 2017

Merk, D.; **Heitel, P.**; Faudone, G.; Schmidt, J.; Schubert-Zsilavecz, M. Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses. PCT/EP2018/075797, filed September 24, 2018.

Das Patent „Dual Agonists of FXR and PPARδ and Their Uses“ wurde in einem deutschen Verfahren sowie internationalen Verfahren eingereicht. Dabei umschließt die internationale Anmeldung die deutsche und ist nachfolgend nachgedruckt.

DPMA Aktenzeichen: DE 10 2017 122062.3
PCT Application Number: PCT/EP2018/075797
Veröffentlichungsnummer: WO/2019/057969

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
28 March 2019 (28.03.2019)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2019/057969 A1

(51) International Patent Classification:
C07D 311/58 (2006.01) *C07C 237/44* (2006.01)
C07D 215/48 (2006.01) *C07D 307/54* (2006.01)
C07D 333/24 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
C07D 249/04 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
C07D 261/08 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
C07D 263/32 (2006.01) *A61K 31/341* (2006.01)
C07C 237/42 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2018/075797

(22) International Filing Date:
24 September 2018 (24.09.2018)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10 2017 122 062.3
22 September 2017 (22.09.2017) DE

(71) Applicant: **JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT** [DE/DE]; Theodor-W.-Adorno-Platz 1, 60323 Frankfurt am Main (DE).

(72) Inventors: **MERK, Daniel**; [redacted]. **HEITEL, Pascal**; [redacted] (DE). **FAUDONE, Giuseppe**; [redacted] (DE). **SCHMIDT, Jurema**; [redacted] (DE). **SCHUBERT-ZSILAVECZ, Manfred**; [redacted] (DE).

(74) Agent: **GRAHN, Sybilla M.**; Boehmert & Boehmert Anwaltspartnerschaft mbB, Pettenkoferstraße 22, 80336 München (DE).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report (Art. 21(3))*

WO 2019/057969 A1

(54) Title: DUAL AGONISTS OF FXR AND PPARδ AND THEIR USES

(57) Abstract: The present invention relates to small molecule compounds and their use as agonists of farnesoid X receptor (FXR) and/or peroxisome proliferator activated receptor delta (PPARδ). The present invention also relates to the use of said compounds in the treatment of metabolic diseases and respective methods of treatment.

Dual agonists of FXR and PPARδ and their uses

The present invention relates to small molecule compounds and their use as agonists of farnesoid X receptor (FXR) and/or peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARδ). The present invention also relates to the use of said compounds in the treatment of metabolic diseases and respective methods of treatment.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The farnesoid X receptor (FXR) or NR1H4 (nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4) is a nuclear receptor that is encoded by the *NR1H4* gene in humans. FXR is expressed at high levels in the liver and intestine. Chenodeoxycholic acid and other bile acids are natural ligands for FXR. Similar to other nuclear receptors, when activated, FXR translocates to the cell nucleus, forms a dimer (in this case a heterodimer with RXR) and binds to hormone response elements on DNA, which up- or down-regulates the expression of certain genes. One of the primary functions of FXR activation is the suppression of cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1), the rate-limiting enzyme in bile acid synthesis from cholesterol. FXR does not directly bind to the CYP7A1 promoter. Rather, FXR induces expression of small heterodimer partner (SHP), which then functions to inhibit transcription of the CYP7A1 gene. In this way, a negative feedback pathway is established in which synthesis of bile acids is inhibited when cellular levels are already high. FXR has also been found to be important in regulation of hepatic triglyceride levels and glucose homeostasis. Studies have also shown the FXR to regulate the expression and activity of epithelial transport proteins involved in fluid homeostasis in the intestine, such as the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR).

The natural bile acid, chenodeoxycholic acid, was identified in 1999 as the most active physiological ligand for the FXR, which is involved in many physiological and pathological processes. Obeticholic acid (abbreviated to OCA, trade name Ocaliva), is a semi-synthetic bile acid analogue which has the chemical structure 6α-ethyl-chenodeoxycholic acid. It is used as a drug to treat primary biliary cholangitis, and is undergoing development for several other liver diseases and related disorders. Obeticholic acid is undergoing development in

phase 2 and 3 studies for specific liver and gastrointestinal conditions, in particular, non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

Non-alcoholic steatohepatitis is a common cause of abnormal liver function with histological features of fatty liver, inflammation and fibrosis. It may progress to cirrhosis and is becoming an increasing indication for liver transplantation. It is increasing in prevalence. OCA is proposed to treat NASH. A phase 2 trial published in 2013 showed that administration of OCA at 25 mg or 50 mg daily for 6 weeks reduced markers of liver inflammation and fibrosis and increased insulin sensitivity.

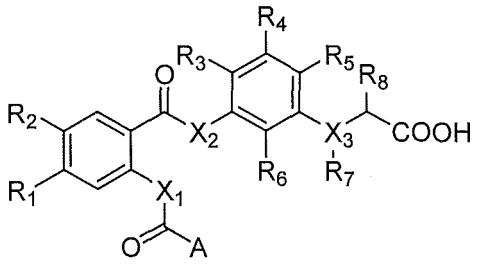
Peroxisome proliferator-activated receptor beta or delta (PPAR-β or PPAR-δ), also known as NR1C2 (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 2) is a nuclear receptor that in humans is encoded by the *PPARD* gene. This gene encodes a member of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family. PPARδ is a nuclear hormone receptor that governs a variety of biological processes and is involved in the development of several chronic diseases, including diabetes, obesity, atherosclerosis, and cancer. PPARδ may function as an integrator of transcription repression and nuclear receptor signaling. It activates transcription of a variety of target genes by binding to specific DNA elements. Well described target genes of PPARδ include PDK4, ANGPTL4, PLIN2, and CD36. PPARδ is an important regulator of lipid metabolism and insulin sensitivity in liver and peripheral tissues such as skeletal muscle. Knockout studies in mice also suggest a role of PPARδ in myelination of the corpus callosum, epidermal cell proliferation, and glucose and lipid metabolism. This protein has been shown to be involved in differentiation, lipid accumulation, directional sensing, polarization, and migration in keratinocytes.

Elafibranor is an experimental medication that is being studied and developed for the treatment of cardiometabolic diseases including diabetes, insulin resistance, dyslipidemia, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Elafibranor is a dual PPARα/δ agonist.

There is a need in the art for improved agonists and dual modulators of FXR and/or PPARδ.

SUMMARY OF THE INVENTION

According to the present invention this object is solved by providing a compound having general formula I



I

wherein

$\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each independently selected from CH_2 or NH,

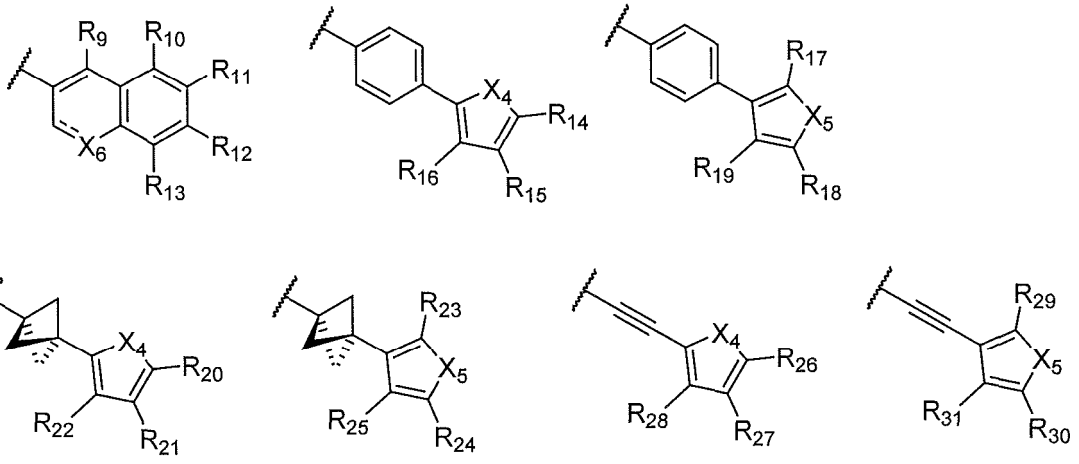
$\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), CF_3O, CF_3, OH, halogen, R_1 and R_2 can form a ring,

$\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

$\mathbf{X_3}$ is selected from CH, N or O,

A is selected from



wherein

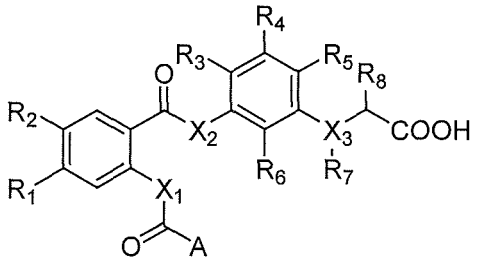
$\mathbf{R_9}$ to $\mathbf{R_{31}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{X_4}$ and $\mathbf{X_5}$ are each independently selected from CH, O or S, and

$\mathbf{X_6}$ is selected from CH, N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

According to the present invention this object is solved by providing a compound having general formula I



I

wherein

$\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each independently selected from CH_2 or NH,

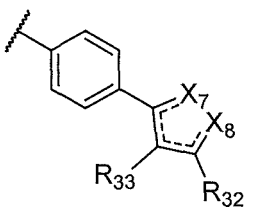
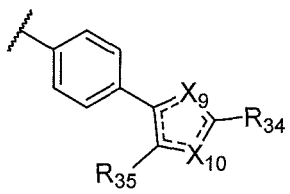
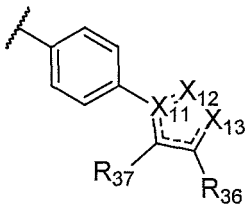
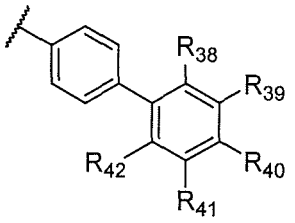
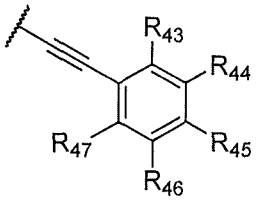
$\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), CF_3O, CF_3, OH, halogen, R_1 and R_2 can form a ring,

$\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

$\mathbf{X_3}$ is selected from CH, N or O,

A is selected from





and


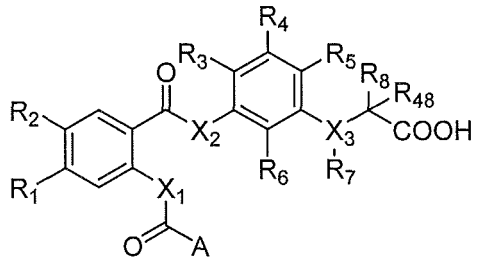
wherein

$\mathbf{R_{32}}$ to $\mathbf{R_{47}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen, and

$\mathbf{X_7}$ to $\mathbf{X_{13}}$ are each independently selected from CH, N or O, preferably N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

According to the present invention this object is solved by providing a compound having general formula Ia



Ia

wherein $\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$, $\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$, $\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$, $\mathbf{X_3}$ and **A** are as defined above, and
$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ and $\mathbf{R_{48}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen.

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

According to the present invention this object is solved by using a compound according to the present invention as an agonist of farnesoid X receptor (FXR) and/or peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARδ),
preferably as dual agonist of FXR and PPARδ.

According to the present invention this object is solved by a pharmaceutical composition comprising

(a) at least one compound according to the present invention,

(b) optionally, pharmaceutically acceptable excipient(s) and/or carrier.

According to the present invention this object is solved by providing the compound(s) or the pharmaceutical composition of the present invention for use as a medicament.

According to the present invention this object is solved by providing the compound(s) or the pharmaceutical composition of the present invention for use in a method of treatment of metabolic disease(s).

According to the present invention this object is solved by providing the compound(s) or the pharmaceutical composition of the present invention for use in a method of treatment of atherosclerosis and/or cardiovascular disease(s).

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

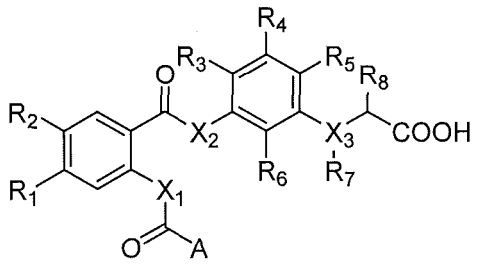
Before the present invention is described in more detail below, it is to be understood that this invention is not limited to the particular methodology, protocols and reagents described herein as these may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to limit the scope of the present invention which will be limited only by the appended claims. Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art. For the purpose of the present invention, all references cited herein are incorporated by reference in their entireties.

Concentrations, amounts, and other numerical data may be expressed or presented herein in a range format. It is to be understood that such a range format is used merely for convenience and brevity and thus should be interpreted flexibly to include not only the numerical values explicitly recited as the limits of the range, but also to include all the individual numerical values or sub-ranges encompassed within that range as if each numerical value and sub-range is explicitly recited. As an illustration, a numerical range of "0.03 to 60 mg per kg" should be interpreted to include not only the explicitly recited values of 0.03 to 60, but also include individual values and sub-ranges within the indicated range. Thus, included in this numerical range are individual values such as 0.03, 0.035, 0.04,0.045, ... 59 , 60 and sub-ranges such as from 14 to 20, from 14 to 30, from 15 to 25, from 19 to 25, from 20 to 25, from 20 to 30 and from 15 to 30, etc. This same principle applies to ranges reciting only one numerical value, such as “at least 0.03 mg per kg”. Furthermore, such an interpretation should apply regardless of the breadth of the range or the characteristics being described.

Agonists of FXR and/or PPARδ

As discussed above, the present invention provides a class of small molecule compounds and their use as agonists of FXR and/or PPARδ.

A compound of the present invention is a compound having the general formula I:



I

wherein

$\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each independently selected from CH_2 or NH,

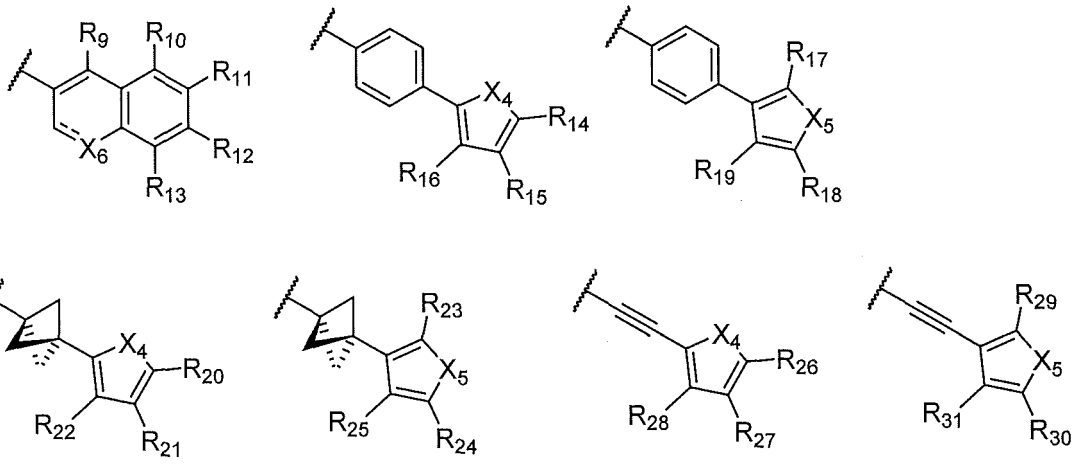
$\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), CF_3O, CF_3, OH, halogen, R_1 and R_2 can form a ring,

$\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

$\mathbf{X_3}$ is selected from CH, N or O,

A is selected from



wherein

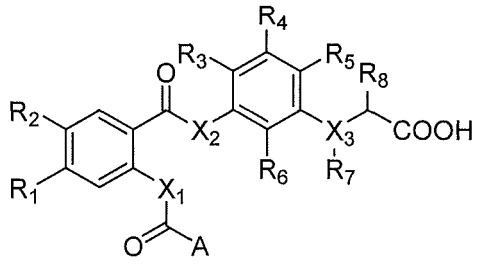
$\mathbf{R_9}$ to $\mathbf{R_{31}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{X_4}$ and $\mathbf{X_5}$ are each independently selected from CH, O or S, and

$\mathbf{X_6}$ is selected from CH, N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

A compound of the present invention is a compound having general formula I:



I

wherein

$\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each independently selected from CH_2 or NH,

$\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), CF_3O, CF_3, OH, halogen, R_1 and R_2 can form a ring,

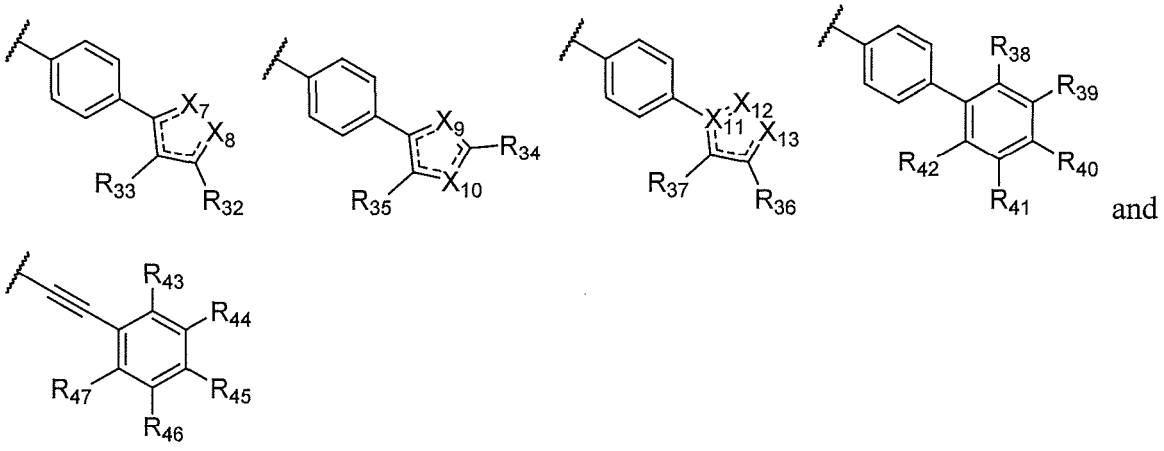
$\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

$\mathbf{X_3}$ is selected from CH, N or O,

and

A is selected from



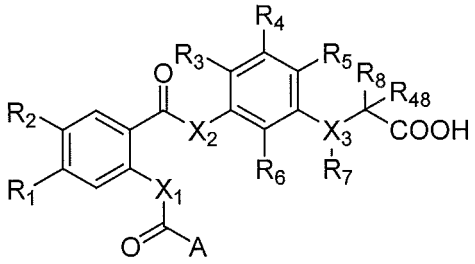
wherein

$\mathbf{R_{32}}$ to $\mathbf{R_{47}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen, and

$\mathbf{X_7}$ to $\mathbf{X_{13}}$ are each independently selected from CH, N or O, preferably N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

A compound of the present invention is a compound having general formula Ia



Ia

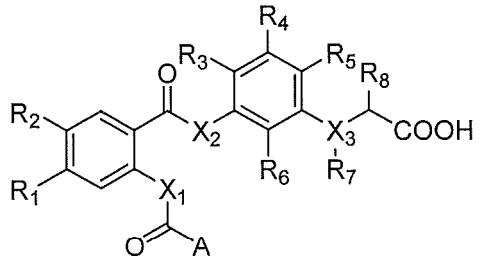
wherein $\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$, $\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$, $\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$, $\mathbf{X_3}$ and **A** are as defined in claim 1 or 2,

and

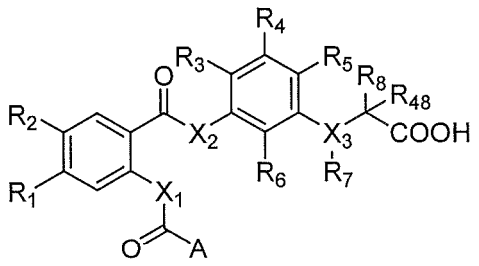
$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ and $\mathbf{R_{48}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

A compound of the present invention can be a compound having the general formula I or Ia:



I



Ia

wherein

$\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each independently selected from CH_2 or NH,

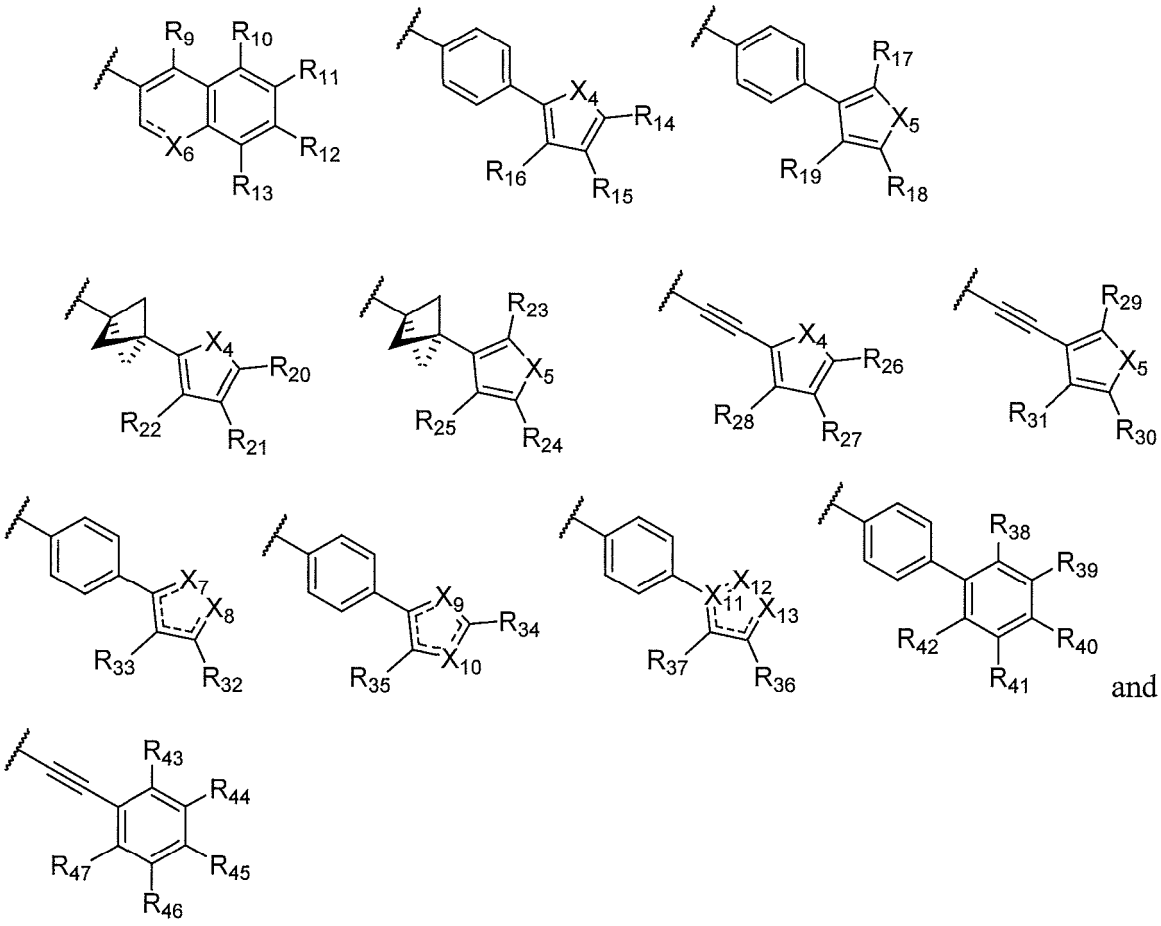
$\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), CF_3O, CF_3, OH, halogen, R_1 and R_2 can form a ring,

$\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ and $\mathbf{R_{48}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

$\mathbf{X_3}$ is selected from CH, N or O,

A is selected from



and

wherein

R_9 to **R_{47}** are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

X_4 and **X_5** are each independently selected from CH, O or S, and

X_6 is selected from CH, N or O,

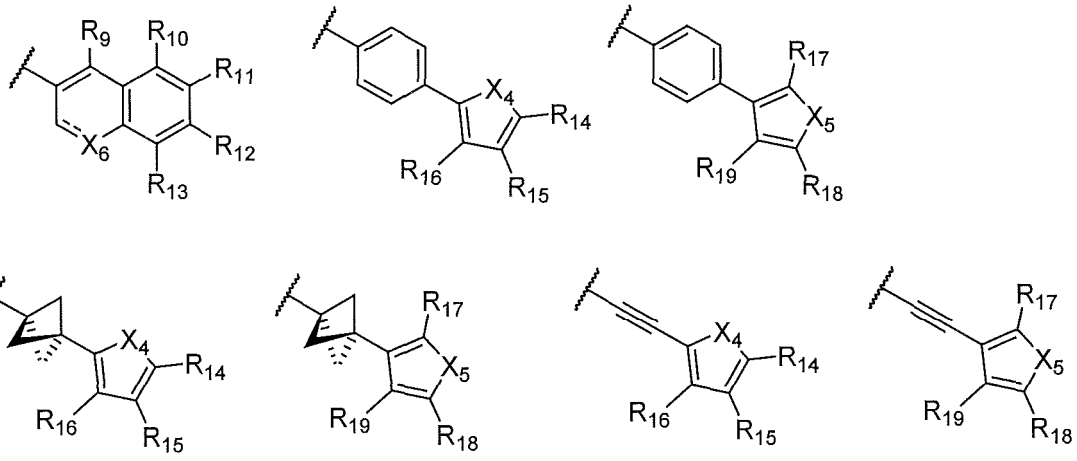
X_7 to **X_{13}** are each independently selected from CH, N or O, preferably N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

Examples for "C_1 to C_4 alkyl" are: methyl, ethyl, n-propyl, iso-propyl, n-butyl, iso-butyl, or tert-butyl.

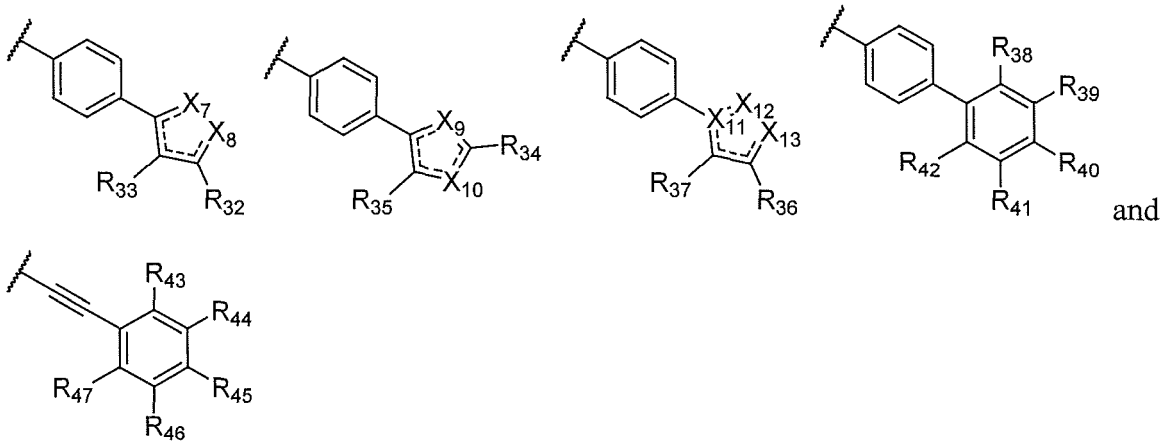
Examples for "C_1 to C_3 alkoxy" or "alkoxy" are: methoxy, ethoxy, or propoxy.

Preferably, the compounds of the present invention are compounds, wherein **A** is selected from



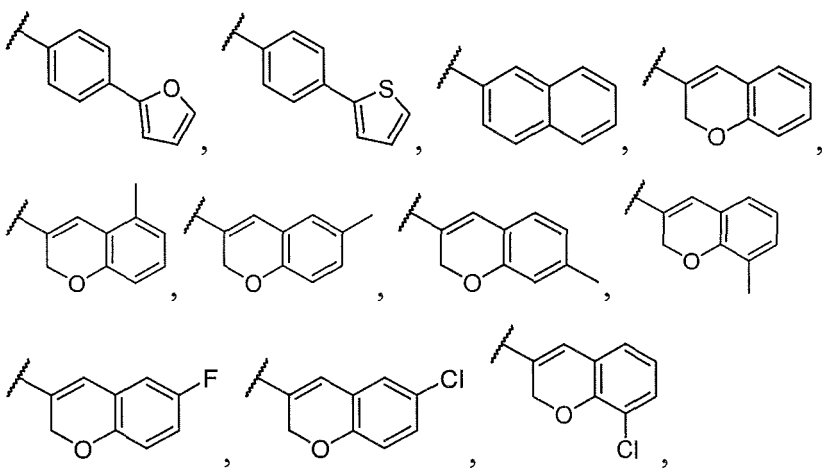
with $\mathbf{R_9}$ to $\mathbf{R_{31}}$ as defined above,

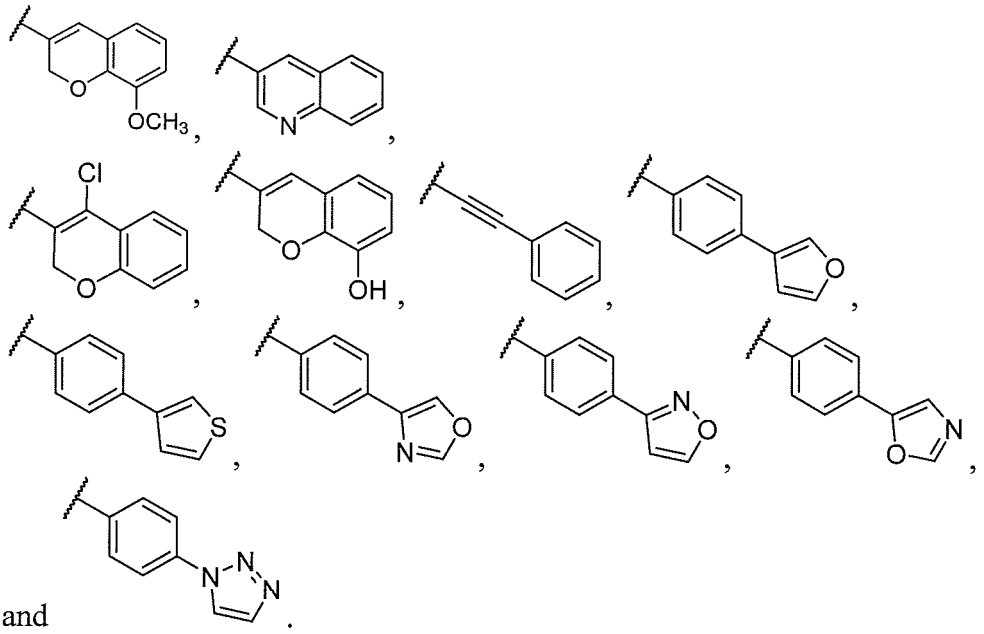
and/or wherein A is selected from



with $\mathbf{R_{32}}$ to $\mathbf{R_{47}}$ as defined above,

More preferably, A is selected from

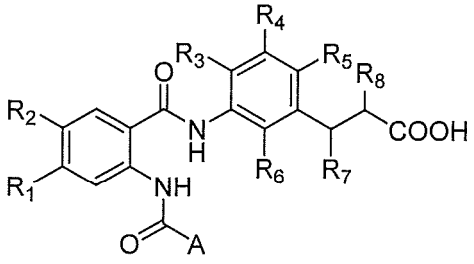




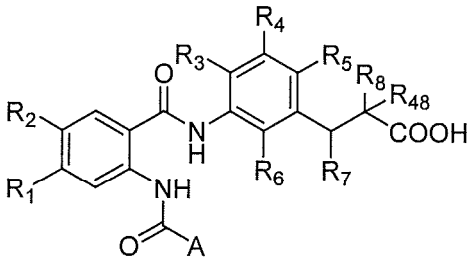
and .

Preferably, the compounds of the present invention are compounds, wherein $\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each NH and $\mathbf{X_3}$ is CH.

Said compounds have general formula II or IIa

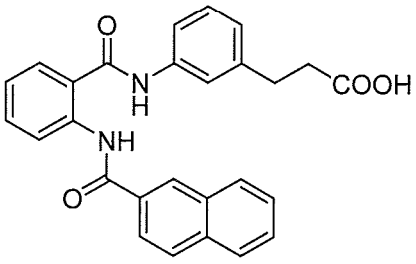


II

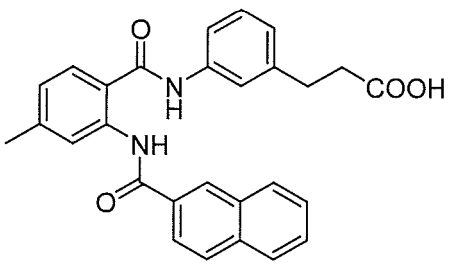


IIa

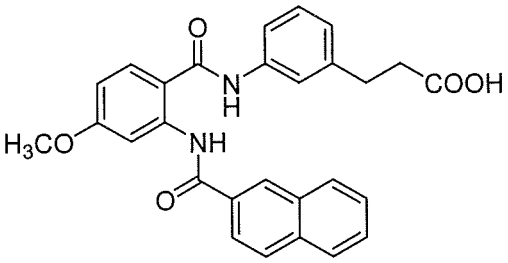
Preferably, the compounds of the present invention are compounds are selected from



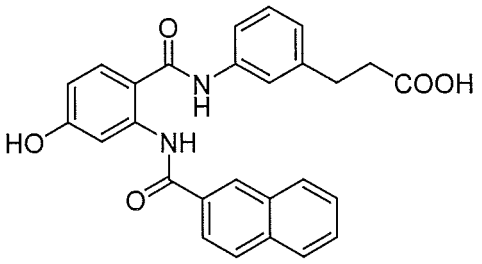
PH023 (1)



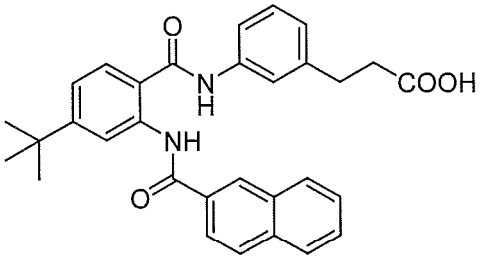
GF032 (2)



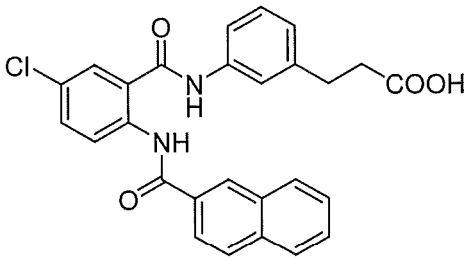
GF054 (5)



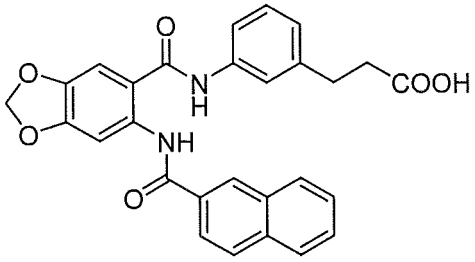
GF068 (6)



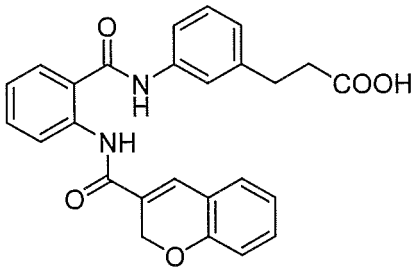
GF085 (7)



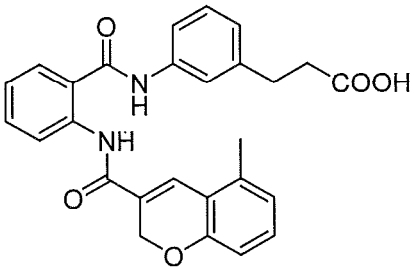
GF053 (8)



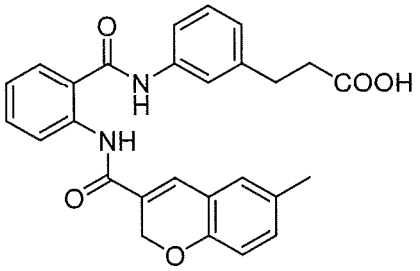
GF097 (12)



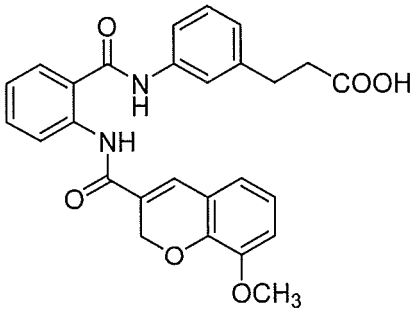
PH075 (13)



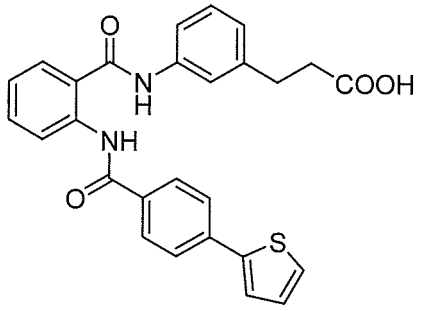
PH141 (14)



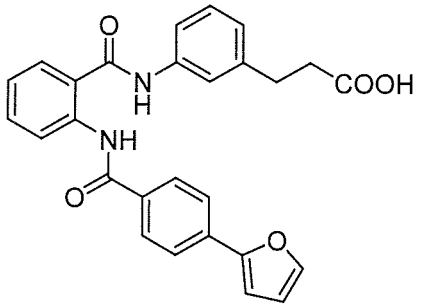
PH129 (15)



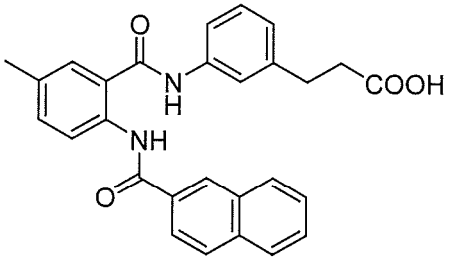
PH084 (21)



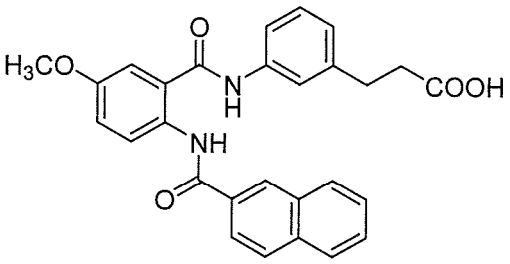
GF098 (24)



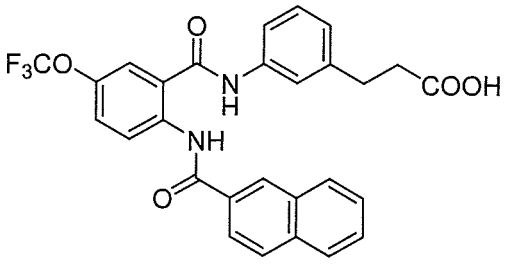
GF104 (23)



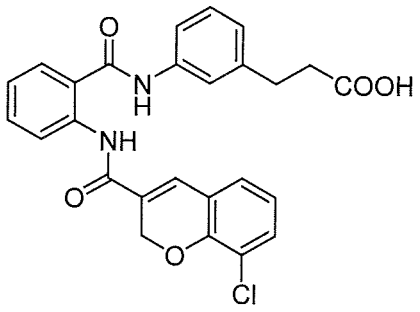
GF028 (3)



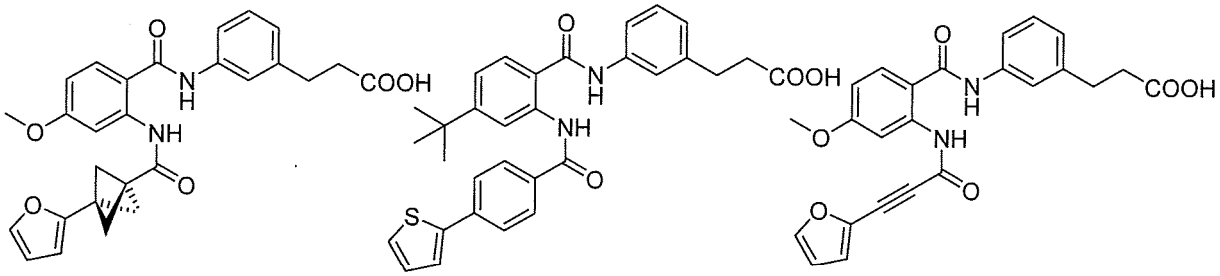
GF045 (9)

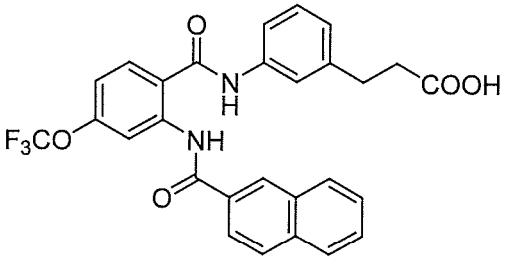


GF063 (10)

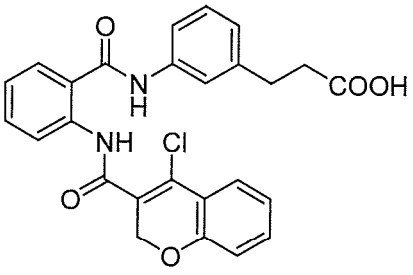


PH123 (20)

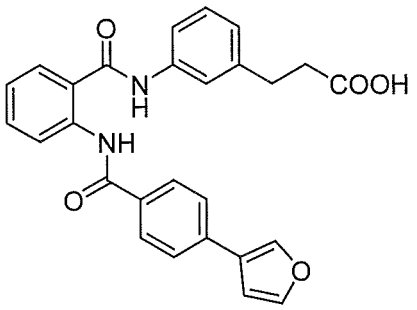




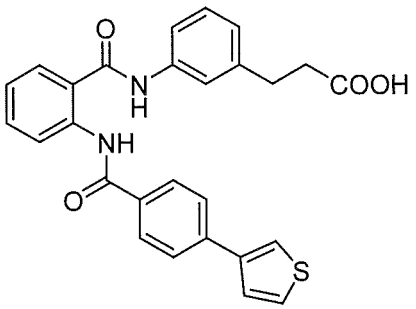
PH221 (34)



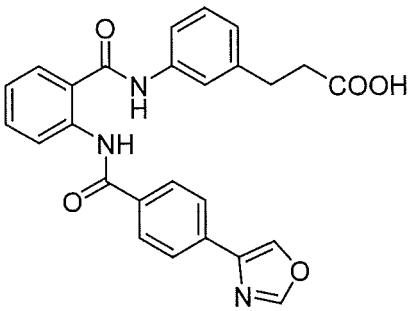
PH214 (35)



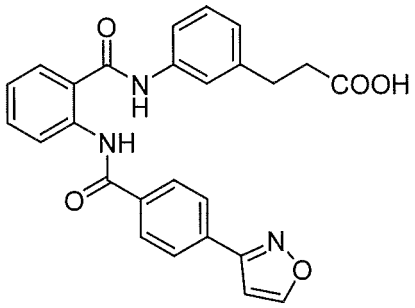
PH224 (38)



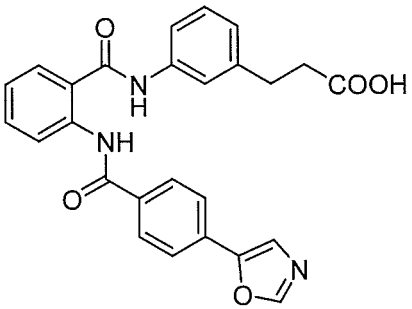
PH225 (39)



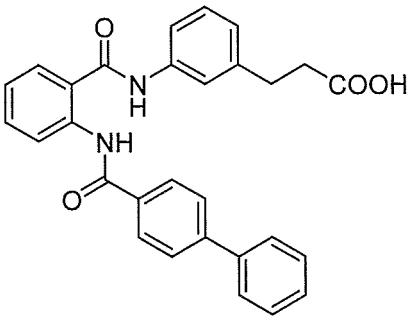
PH361 (40)



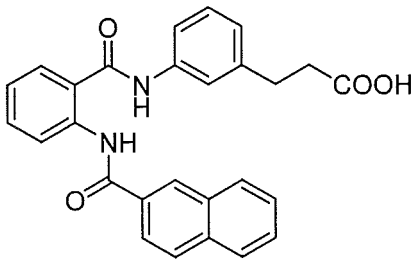
PH382 (41)



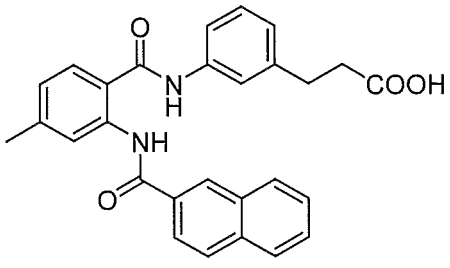
GFS008 (42)



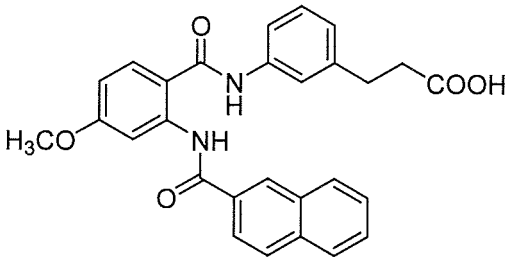
Preferably, the compounds of the present invention are compounds are selected from



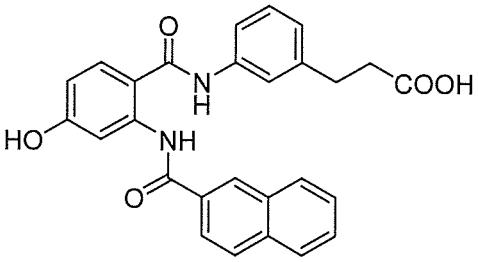
PH023 (1)



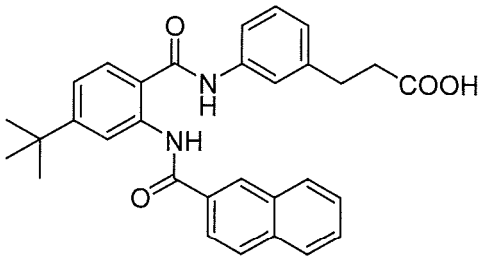
GF032 (2)



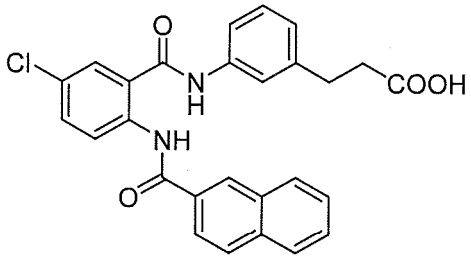
GF054 (5)



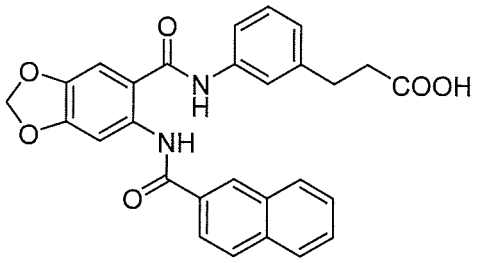
GF068 (6)



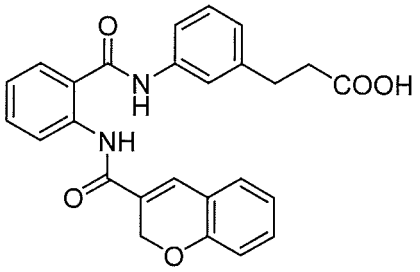
GF085 (7)



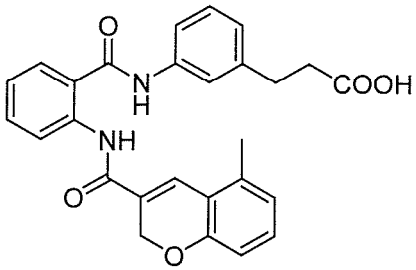
GF053 (8)



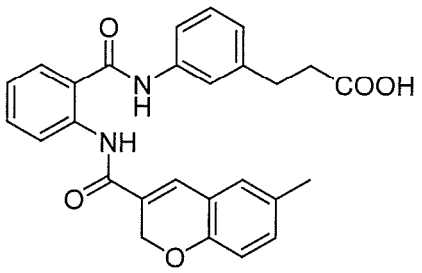
GF097 (12)



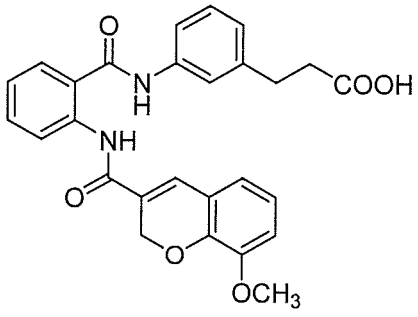
PH075 (13)



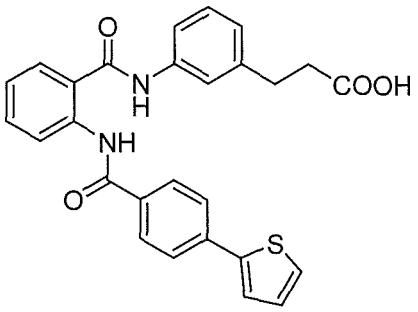
PH141 (14)



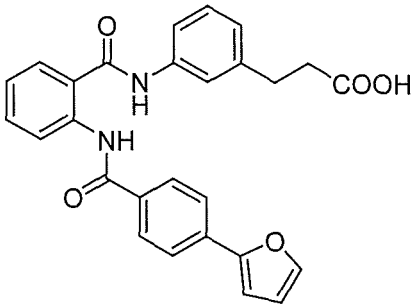
PH129 (15)



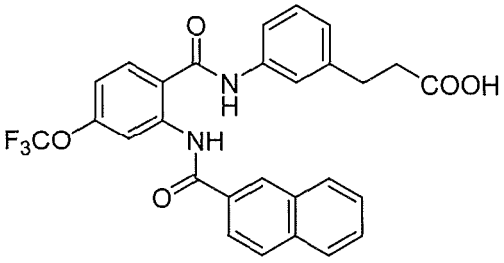
PH084 (21)



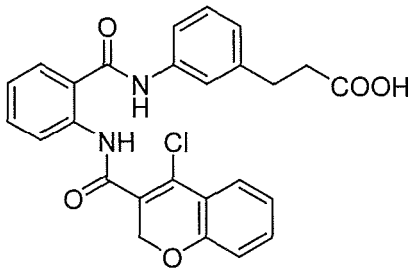
GF098 (24)



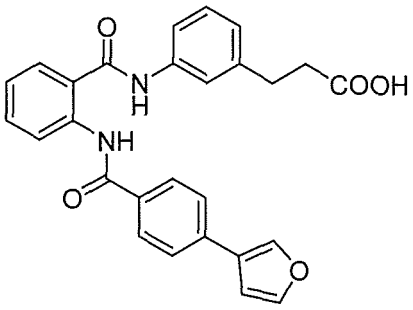
GF104 (23)



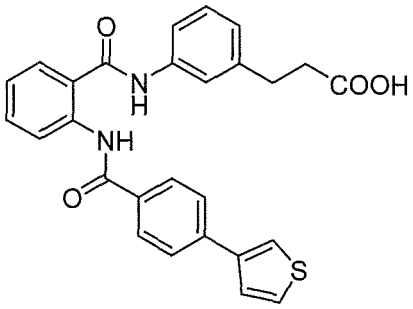
PH221 (34)



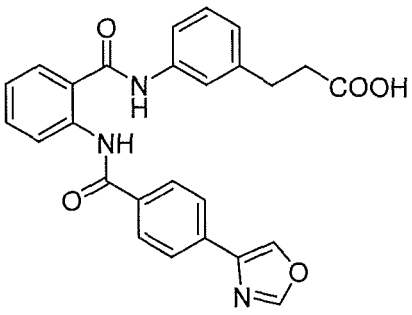
PH214 (35)



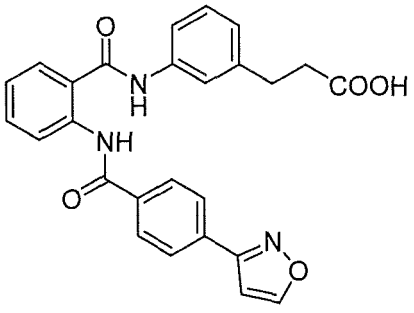
PH224 (38)



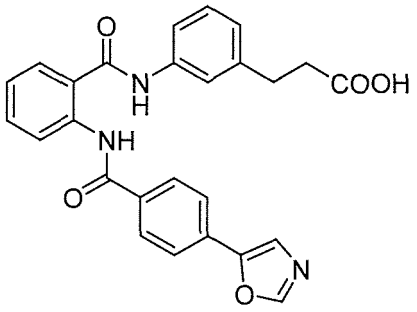
PH225 (39)



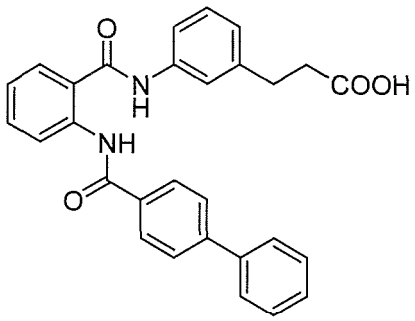
PH361 (40)



PH382 (41)



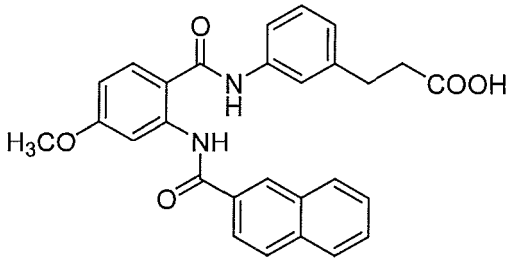
GFS008 (42)



Said compounds are preferably **dual agonists of FXR and PPARδ**. See below.

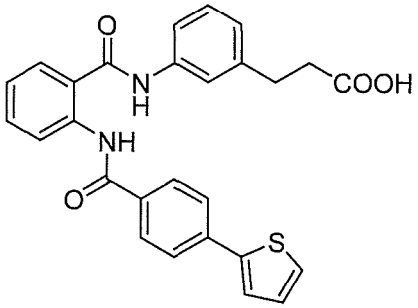
More preferably, the compounds of the present invention are selected from

Compound # 5 in Table 1 (see below):



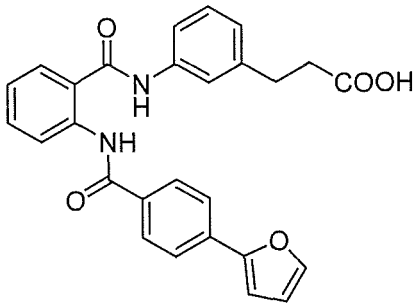
GF054

Compound # 24 in Table 1 (see below):



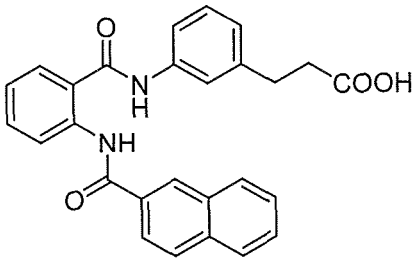
GF098

Compound # 23 in Table 1 (see below):



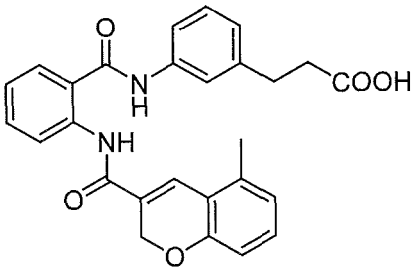
GF104

Compound # 1 in Table 1 (see below):



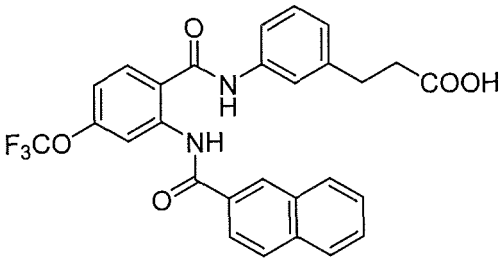
PH023

Compound # 14 in Table 1 (see below):



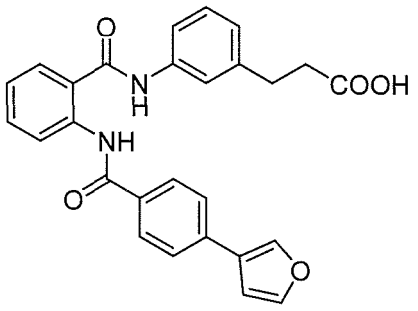
PH141

Compound # 34 in Table 1 (see below):



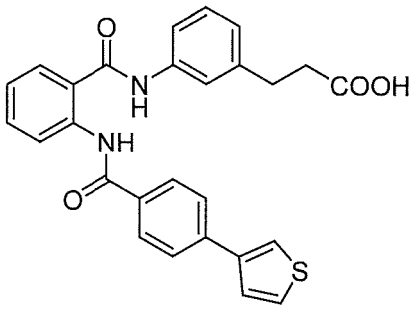
PH221

Compound # 38 in Table 1 (see below):



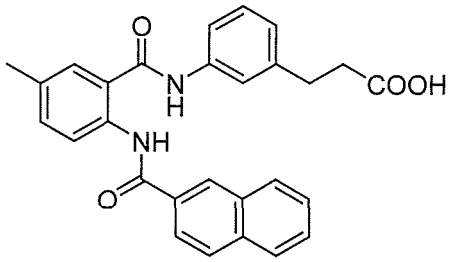
PH224

Compound # 39 in Table 1 (see below):

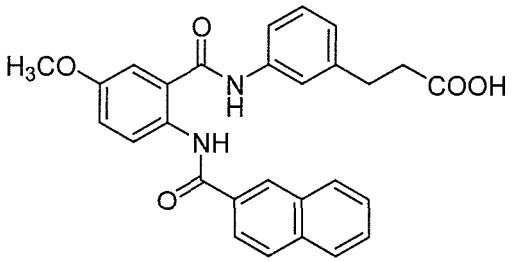


PH225

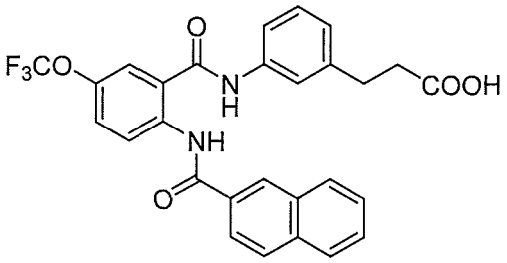
In one embodiment, the compounds of the present invention are compounds selected from



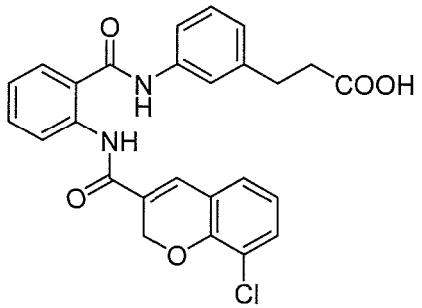
GF028 (3)



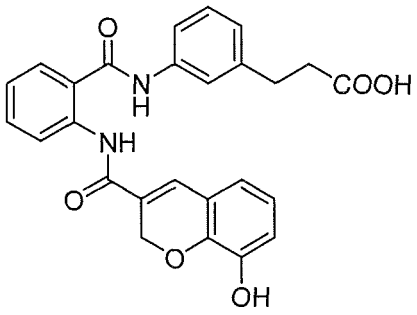
GF045 (9)



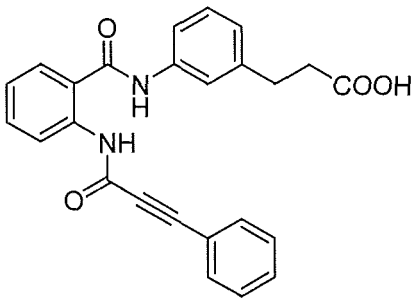
GF063 (10)



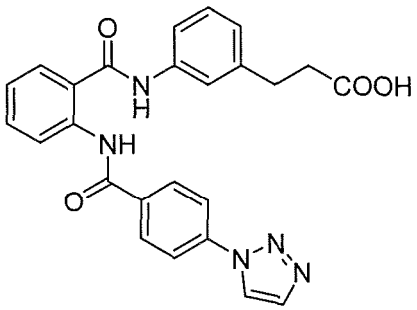
PH123 (20)



PH235 (36)



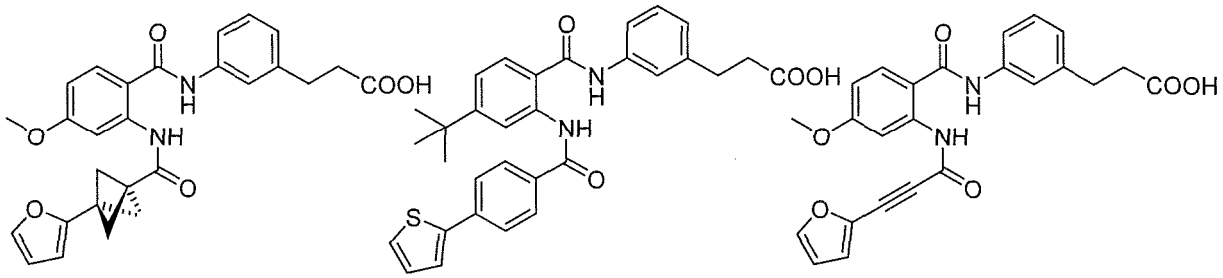
GFS009 (37)



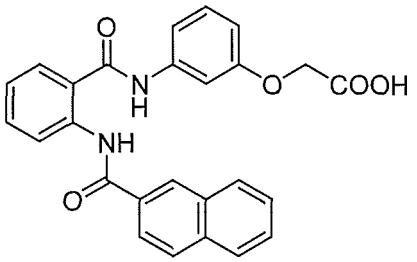
GFS011 (43)

Said compounds are preferably **agonists of PPARδ**. See below.

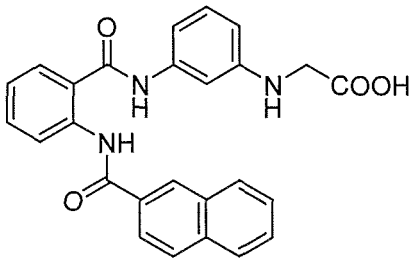
In one embodiment, the compounds of the present invention are compounds selected from



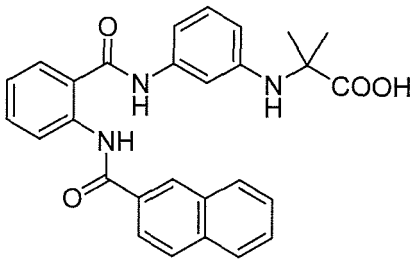
In one embodiment, the compounds of the present invention are compounds selected from



PH220 (31)

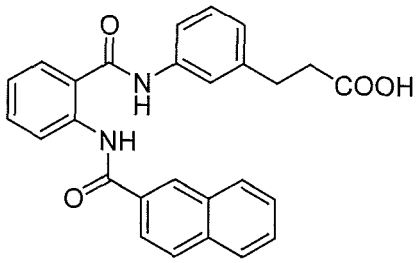


PH251 (32)

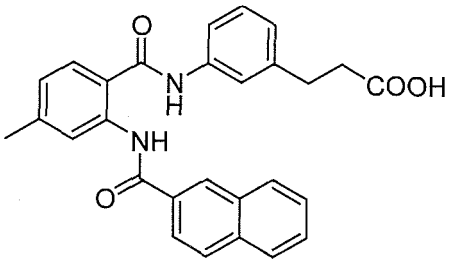


PH300 (33).

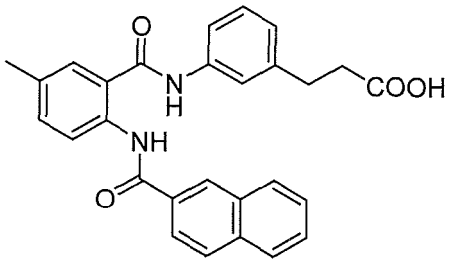
In one embodiment, the compounds of the present invention are compounds selected from



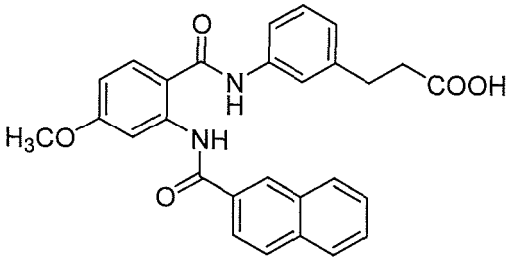
PH023 (1)



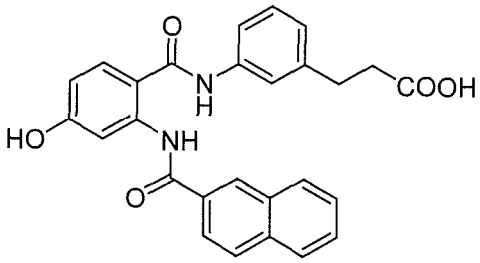
GF032 (2)



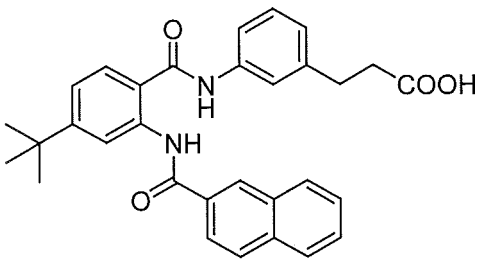
GF028 (3)



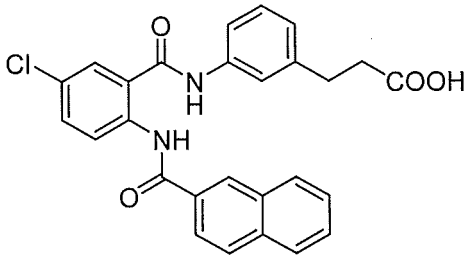
GF054 (5)



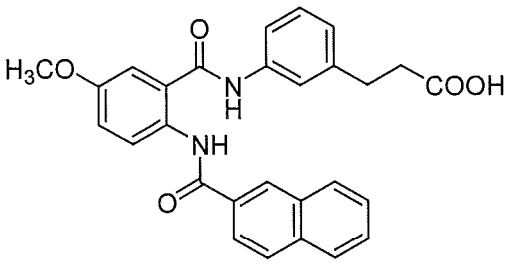
GF068 (6)



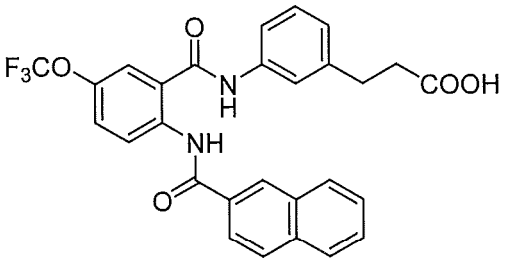
GF085 (7)



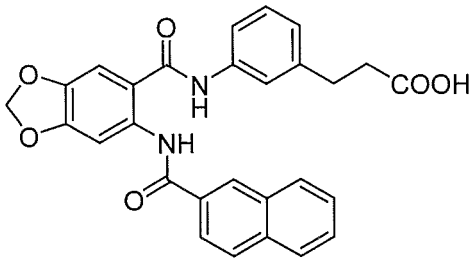
GF053 (8)



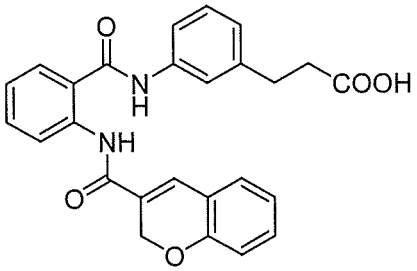
GF045 (9)



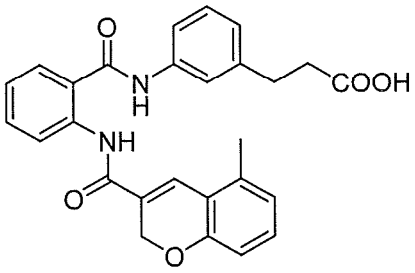
GF063 (10)



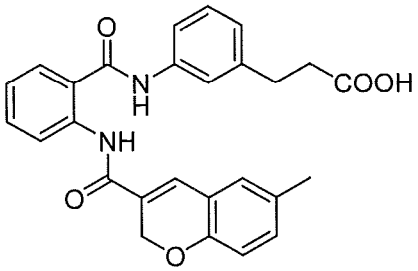
GF097 (12)



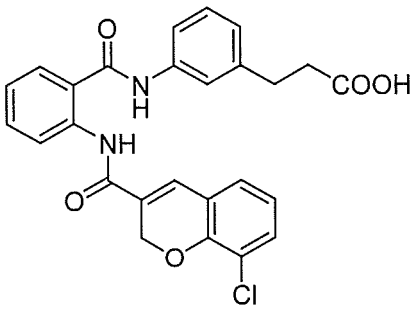
PH075 (13)



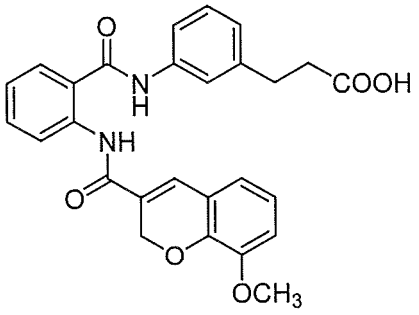
PH141 (14)



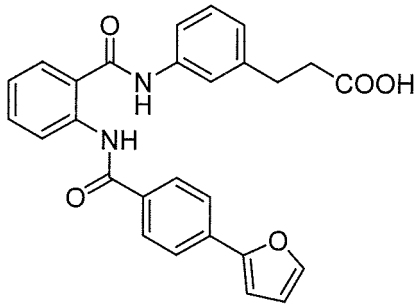
PH129 (15)



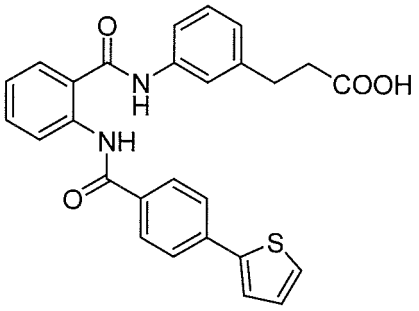
PH123 (20)



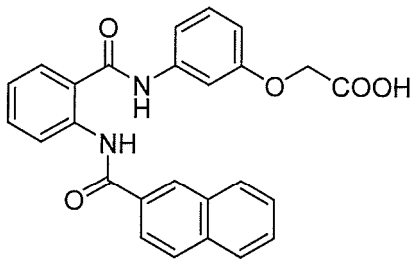
PH084 (21)



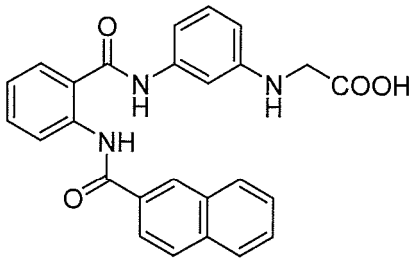
GF104 (23)



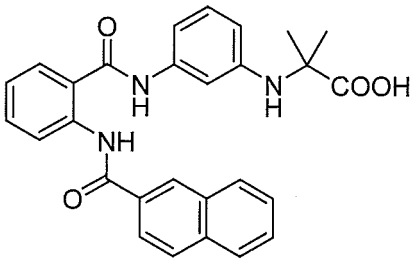
GF098 (24)



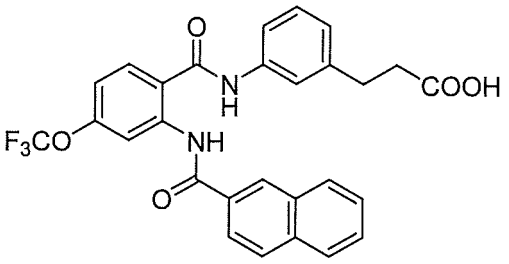
PH220 (31)



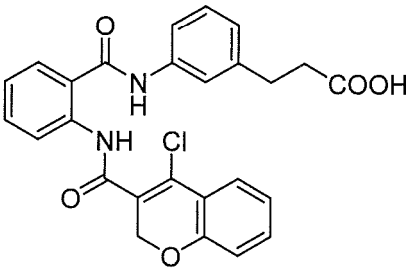
PH251 (32)



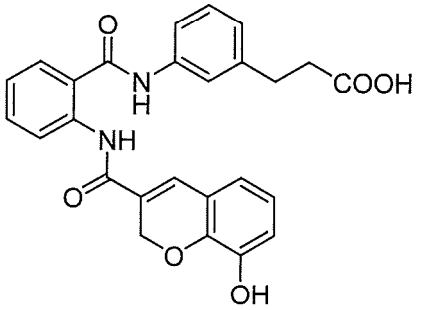
PH300 (33)



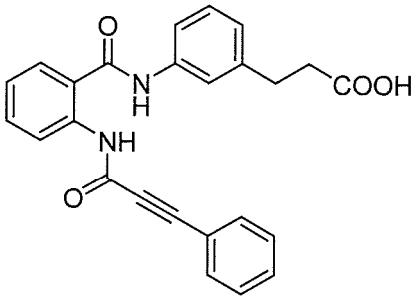
PH221 (34)



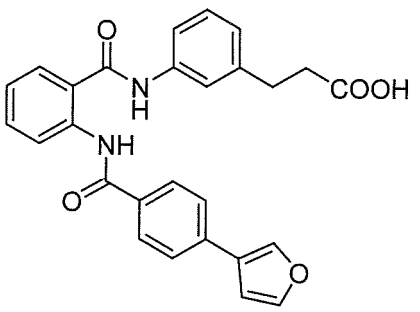
PH214 (35)



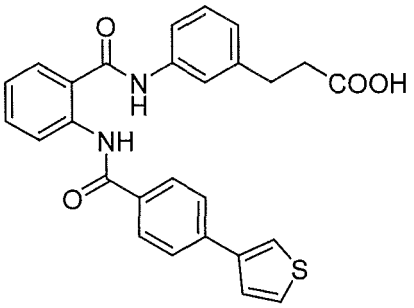
PH235 (36)



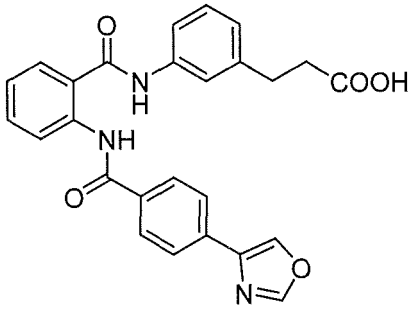
GFS009 (37)



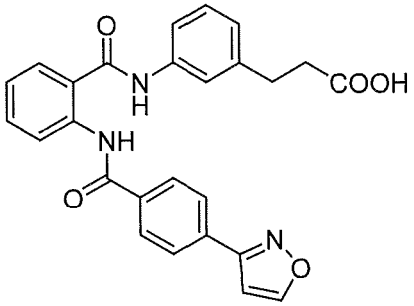
PH224 (38)



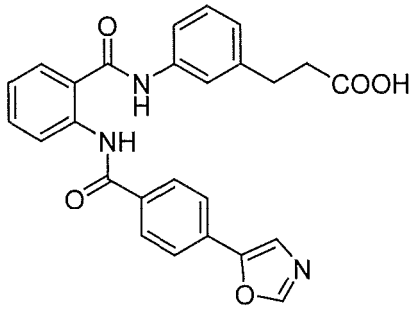
PH225 (39)



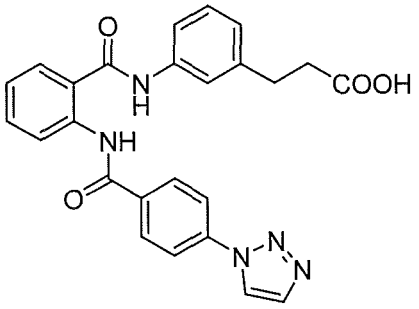
PH361 (40)



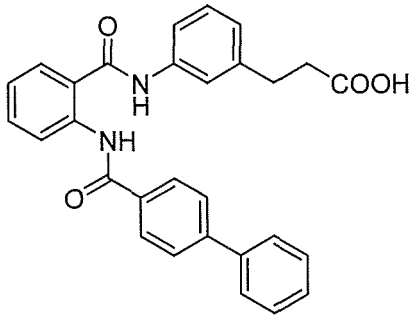
PH382 (41)

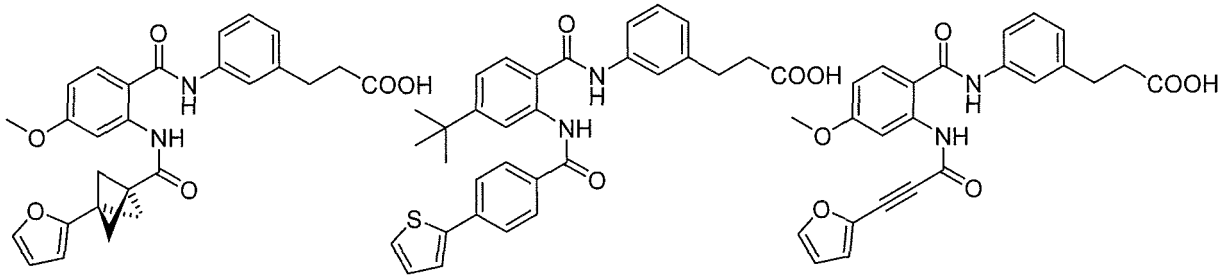


GFS008 (42)



GFS011 (43)





As discussed above, the present invention provides the use of the compounds of the present invention as agonists of farnesoid X receptor (FXR) and/or peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARδ).

Preferably, the compounds are dual agonists of FXR and PPARδ.

Agonists of the farnesoid X receptor (FXR), such as obeticholic acid, and agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARδ), such as elafibranor, are studied in phase 3 clinical trials for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Both agents revealed therapeutic efficacy and have been granted fast-track and breakthrough medication designation respectively by the FDA. Although both agents target nuclear receptors their efficacy is established mainly via different mechanisms and in different tissues.

Hepatic and intestinal FXR activation by obeticholic acid improves hepatic steatosis by reducing lipid synthesis and enhancing lipid degradation in the liver. Moreover, FXR activation has cell-protective and anti-inflammatory effects in the liver leading to reduced hepatic inflammation, reduced hepatocyte apoptosis and reduced liver damage from oxidative stress.

PPARδ activation by elafibranor improves hepatic fat content predominantly through peripheral effects because the receptor's expression is especially high in skeletal muscle. It leads to enhanced peripheral lipid utilization and an improved overall lipid profile which in turn has beneficial effects on liver health and reduces hepatic steatosis.

Thus, combining hepatic (FXR activation) and extrahepatic (PPARδ activation) anti-NASH activity establishes additive or synergistic efficacy due to the above discussed different mechanisms of action. Dual modulators of FXR and PPARδ, therefore, represent a novel superior therapeutic principle to treat non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and related metabolic disorders. Such dual modulators are presented in this invention.

The combination of two activities in a single drug molecule can produce a synergistic therapeutic efficacy. In contrast to the use of two selective drugs, a dual modulator is superior since it only comprises a single toxicity/side-effect potential and a single pharmacokinetic profile. Additionally, it requires only developmental costs for one compound.

Pharmaceutical compositions and medical uses

As discussed above, the present invention provides a pharmaceutical composition comprising

(a) at least one compound according to the present invention,

(b) optionally, pharmaceutically acceptable excipient(s) and/or carrier.

The pharmaceutical composition can optionally comprise further agent(s) and/or drug(s).

In one embodiment, the pharmaceutical composition of the present invention further comprises

(c) agent(s) or drug(s) for the treatment of metabolic disorder(s),

and/or

(d) agent(s) or drug(s) to treat non-alcoholic steatohepatitis.

Agent(s) or drug(s) for the treatment of metabolic disorder(s) can be PPAR agonist(s), SGLT2 inhibitor(s), incretin mimetic(s), metformin and/or HMG-CoA reductase inhibitor(s).

Agent(s) or drug(s) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis can be inhibitor(s) of the soluble epoxide hydrolase, inhibitor(s) of the apoptosis regulating kinase 1, and/or caspase inhibitor(s).

As discussed above, the present invention provides a compound according to the present invention or the pharmaceutical composition according to the present invention for use as a medicament.

As discussed above, the present invention provides a compound according to the present invention or the pharmaceutical composition according to the present invention for use in a method of treatment of a metabolic disease.

The metabolic disease is preferably selected from

non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD),
non-alcoholic steatohepatitis (NASH),
type 2 diabetes mellitus,
obesity,
dyslipidemia.

As discussed above, the present invention provides a compound according to the present invention or the pharmaceutical composition according to the present invention for use in a method of treatment of atherosclerosis and/or cardiovascular disease.

Preferably, the medical use of the present invention comprises the administration of a therapeutically effective amount of a compound of the present invention or of a pharmaceutical composition of the present invention.

Methods for treatment

The present invention provides a method of treatment of a metabolic disease.

Said treatment method comprises the step of

administering to a subject a therapeutically effective amount of at least one compound according to the invention or a pharmaceutical composition of the invention.

A "therapeutically effective amount" of a compound according to the invention preferably refers to the amount necessary to achieve the therapeutic outcome.

The dosage of the compounds according to the invention is carried out in the order of magnitude customary for FXR agonists and/or for PPARδ agonists. For example, the customary dose in the case of systemic therapy (p.o.) may be between 0.03 and 60 mg/kg body weight per day, (i. v.) may be between 0.03 and 60 mg/kg/h. In another embodiment, the customary dose in the case of systemic therapy (p.o.) is between 0.3 and 30 mg/kg per day, (i. v.) is between 0.3 and 30 mg/kg/h. The choice of the optimal dosage regime and duration of medication, particularly the optimal dose and manner of administration of the active compounds necessary in each case can be determined by a person skilled in the art on the basis of his/her expert knowledge.

Preferably, the metabolic disease is selected from

non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD),
non-alcoholic steatohepatitis (NASH),
type 2 diabetes mellitus,
obesity,
dyslipidemia.

In one embodiment, the treatment method of the invention comprises

administering to a subject a therapeutically effective amount of a compound according to the invention or a pharmaceutical composition of the invention

in combination with further agent(s) or drug(s),

such as agent(s) or drug(s) for the treatment of metabolic disorder(s), and/or agent(s) or drug(s) to treat non-alcoholic steatohepatitis.

as discussed above.

Agent(s) or drug(s) for the treatment of metabolic disorder(s) can be PPAR agonist(s), SGLT2 inhibitor(s), incretin mimetic(s), metformin and/or HMG-CoA reductase inhibitor(s).

Agent(s) or drug(s) for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis can be inhibitor(s) of the soluble epoxide hydrolase, inhibitor(s) of the apoptosis regulating kinase 1, and/or caspase inhibitor(s).

The present invention further provides a method of treatment of atherosclerosis, and/or a cardiovascular disease.

Said treatment method comprises the step of

administering to a subject a therapeutically effective amount of at least one compound according to the invention or a pharmaceutical composition of the invention.

A "therapeutically effective amount" of a compound according to the invention preferably refers to the amount necessary to achieve the therapeutic outcome.

The dosage of the compounds according to the invention is carried out in the order of magnitude customary for FXR agonists and/or for PPARδ agonists. For example, the customary dose in the case of systemic therapy (p.o.) may be between 0.03 and 60 mg/kg body weight per day, (i. v.) may be between 0.03 and 60 mg/kg/h. In another embodiment, the customary dose in the case of systemic therapy (p.o.) is between 0.3 and 30 mg/kg per day, (i. v.) is between 0.3 and 30 mg/kg/h. The choice of the optimal dosage regime and duration of medication, particularly the optimal dose and manner of administration of the active compounds necessary in each case can be determined by a person skilled in the art on the basis of his/her expert knowledge.

The following examples and drawings illustrate the present invention without, however, limiting the same thereto.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. *Structure of FXR and PPARδ agonists.*

Figure 2. *Pharmacological characteristics of FXR and PPARδ agonists.*
Shown are the metabolic stability (A), aqueous stability (B) and toxicity (C) of the five compounds GF054, GF098, GF104, PH023 and PH141, i.e. compounds # 10, 24, 23, 1 and 14 in Table 1 below.

EXAMPLES

EXAMPLE 1 Methods for *in vitro* characterization

1. Full length FXR transactivation assay

1.1 Plasmid

pcDNA3-hFXR contains the sequence of human FXR and was already published elsewhere (Steri *et al.*, 2012). pGL3basic (Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA) was used as a reporter plasmid, with a shortened construct of the promotor of the bile salt export protein (BSEP) cloned into the SacI/NheI cleavage site in front of the luciferase gene (Ananthanarayanan *et al.*, 2001). pRL-SV40 (Promega) was transfected as a control for normalization of transfection efficiency and cell growth. pSG5-hRXR was published elsewhere (Seuter *et al.*, 2007).

1.2 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 µg/mL) at 37 °C and 5% 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 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 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 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 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 Spark 10M 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 at 3 µM. EC_{50} and standard error of the mean values were calculated with the mean relative activation values of at least three independent experiments by OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) using a four parameter logistic regression. The assay was validated with FXR agonists chenodeoxycholic acid (EC_{50} = 18 ± 1 µM, 88 ± 3% rel. max. act.), obeticholic acid (EC_{50} = 0.16 ± 0.02 µM, 87 ± 3% rel. max. act.) and GW4064 (EC_{50} = 0.51 ± 0.16 µM, 3 µM defined as 100%) (Merk *et al.*, 2014).

2. Hybrid reporter gene assay for PPARδ

2.1 Plasmids

The Gal4-fusion receptor plasmid pFA-CMV-hPPARδ-LBD (Rau *et al.*, 2006) has been reported previously. pFR-Luc (Stratagene) was used as reporter plasmid and pRL-SV40 (Promega) for normalization of transfection efficiency and cell growth.

2.2 Assay procedure

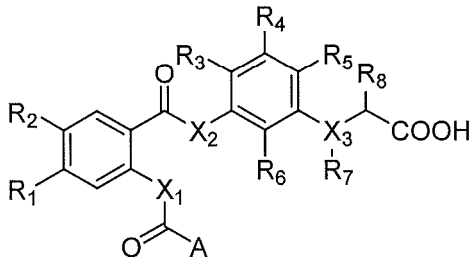
HEK293T cells were grown in DMEM high glucose, supplemented with 10% FCS, sodium pyruvate (1 mM), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) at 37 °C and 5% CO_2. The day before transfection, HEK293T cells were seeded in 96-well plates ($3 \cdot 10^4$ cells/well). Before transfection, medium 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-hPPARδ-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 duplicates 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 a Tecan Spark 10M 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 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 L165,041 at 1 µM. The hybrid assay was validated with the above mentioned reference agonist which yielded values in agreement with literature.

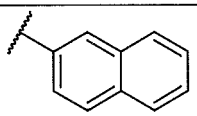
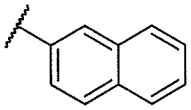
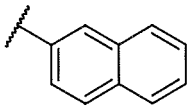
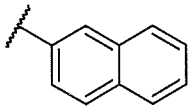
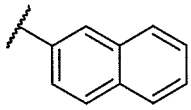
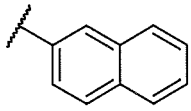
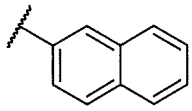
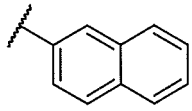
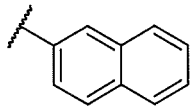
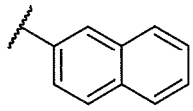
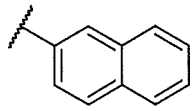
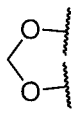
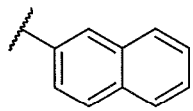
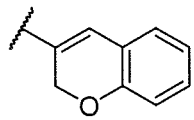
3. Results

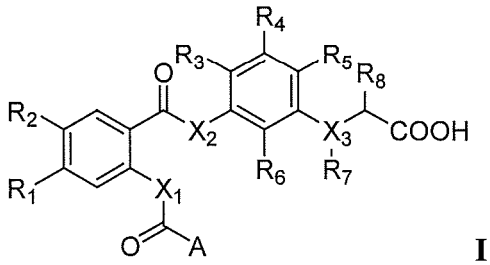
Table 1

Results expressed as mean ± SEM. n = 3-12; inactive – no activity at 10 µM if not else indicated.

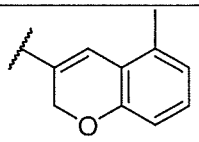
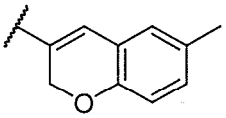
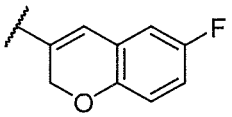
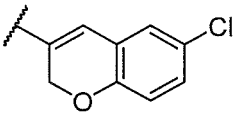
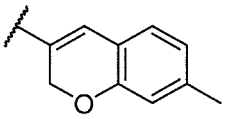
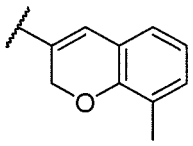
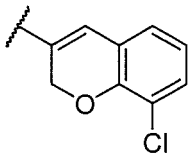
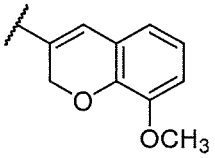
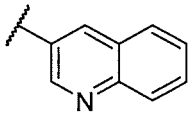
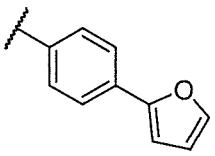
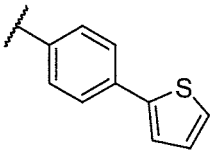


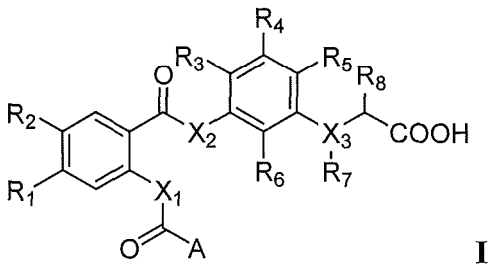
I

#	X_1, X_2	X_3	R_1,R_2	R_3-R_8	A	EC_{50} [μM] FXR	EC_{50} [μM] PPARδ
1 PH023	NH	CH	-H, -H	-H		2.6 ± 0.3	0.65 ± 0.03
2 GF032	NH	CH	-CH_3, -H	-H		1.5 ± 0.0	0.17 ± 0.02
3 GF028	NH	CH	-H, -CH_3	-H		-	0.21 ± 0.01
4	NH	CH	-Cl, -H	-H		-	1.9 ± 0.2
5 GF054	NH	CH	-OCH_3, -H	-H		11 ± 3	0.060 ± 0.005
6 GF068	NH	CH	-OH, -H	-H		4.5 ± 0.0	2.4 ± 0.1
7 GF085	NH	CH	-*t*Bu, -H	-H		0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.02
8 GF053	NH	CH	-H, -Cl	-H		2.6 ± 0.4	0.28 ± 0.03
9 GF045	NH	CH	-H, -OCH_3	-H		-	0.36 ± 0.01
10 GF063	NH	CH	-H, -OCF_3	-H		-	0.10 ± 0.01
11	NH	CH	-H, -OH	-H		-	10 ± 2
12 GF097	NH	CH		-H		5.7 ± 1.3	0.44 ± 0.10
13 PH075	NH	CH	-H, -H	-H		4.1 ± 0.8	1.2 ± 0.1

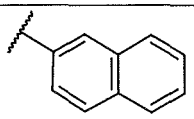
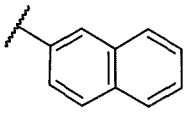
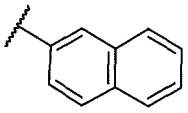
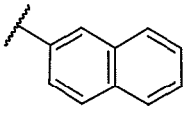
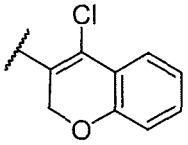
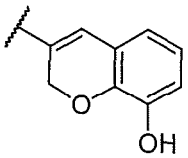
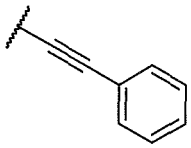
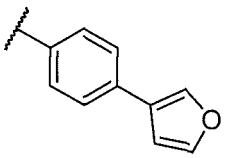
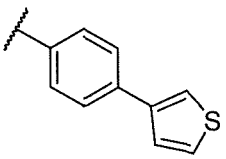
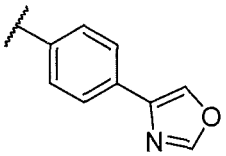


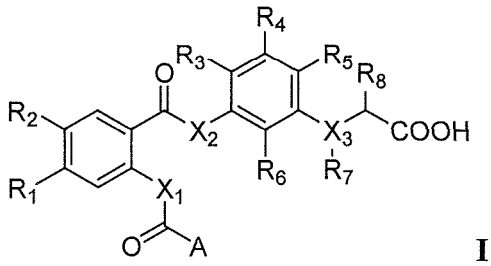
I

#	X_1, X_2	X_3	R_1,R_2	R_3-R_8	A	EC_{50} [µM] FXR	EC_{50} [µM] PPARδ
14 PH141	NH	CH	-H, -H	-H		4.3 ± 0.3	0.67 ± 0.04
15 PH129	NH	CH	-H, -H	-H		5.4 ± 0.1	1.5 ± 0.2
16	NH	CH	-H, -H	-H		-	2.6 ± 0.8
17	NH	CH	-H, -H	-H		-	1.6 ± 0.5
18	NH	CH	-H, -H	-H		-	1.1 ± 0.1
19	NH	CH	-H, -H	-H		-	1.2 ± 0.4
20 PH123	NH	CH	-H, -H	-H		-	0.91 ± 0.36
21 PH084	NH	CH	-H, -H	-H		2.8 ± 0.3	5.2 ± 0.3
22	NH	CH	-H, -H	-H		-	5.4 ± 0.2
23 GF104	NH	CH	-H, -H	-H		5.4 ± 0.0	0.20 ± 0.01
24 GF098	NH	CH	-H, -H	-H		1.7 ± 0.4	0.64 ± 0.06

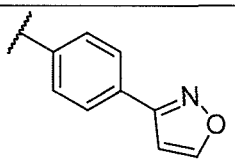
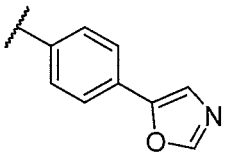
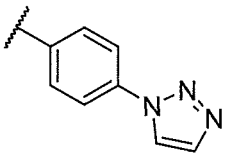


I

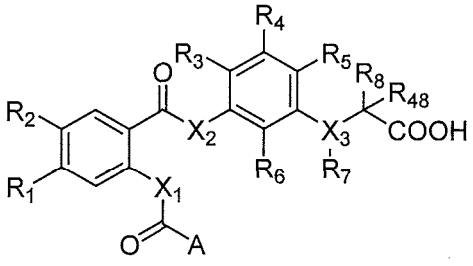
#	X_1, X_2	X_3	R_1,R_2	R_3-R_8	A	EC_{50} [μM] FXR	EC_{50} [μM] PPARδ
31 PH220	NH	O	-H, -H	-H (R_3- R_6 and R_8)		5.1 ± 1.3	10 ± 1
32 PH251	NH	N	-H, -H	-H		1.3 ± 0.1	3.5 ± 0.2
33** PH300	NH	N	-H, -H	R_3- R_7: -H, R_8 and R_{48}: ** -CH_3		0.45 ± 0.00	3.6 ± 0.2
34 PH221	NH	CH	-OCF_3, -H	-H		1.1 ± 0.1	0.38 ± 0.06
35 PH214	NH	CH	-H, -H	-H		11 ± 1	0.42 ± 0.01
36 PH235	NH	CH	-H, -H	-H		-	(7.8 ± 2.1%) @ 30 μM
37 GFS009	NH	CH	-H, -H	-H		- @ 3 μM	(7.5 ± 0.3%) @ 3 μM
38 PH224	NH	CH	-H, -H	-H		0.23 ± 0.00	2.4 ± 0.2
39 PH225	NH	CH	-H, -H	-H		0.65 ± 0.11	1.6 ± 0.3
40 PH361	NH	CH	-H, -H	-H		6.9 ± 0.3	12 ± 1



I

#	X_1, X_2	X_3	R_1,R_2	R_3-R_8	A	EC_{50} [μM] FXR	EC_{50} [μM] PPARδ
41 PH382	NH	CH	-H, -H	-H		6.8 ± 0.7	5.6 ± 0.4
42 GFS008	NH	CH	-H, -H	-H		15 ± 4	12 ± 1
43 GFS011	NH	CH	-H, -H	-H		-	(35 ± 1%) @ 30 μM

** here applies general formula Ia



Ia

EXAMPLE 2 Chemical synthesis

General procedure A: The amine (1.0 eq.) was dissolved in boiling ethanol (c = 0.2 M) and isatoic anhydride (2.0 eq.) was added. The mixture was heated for 1.5 hours under reflux, cooled to room temperature and filtered. Subsequently, the solvent was evaporated under reduced pressure and the product was isolated by column chromatography on silica.

General procedure B: The corresponding acid (1.0 eq.) was dissolved in a 20:1 (v/v) mixture of ethanol and concentrated sulfuric acid (c = 0.5 M) and heated to reflux for two hours. Then, the solution was neutralized with sodium carbonate and the crude product was extracted three

the solution was neutralized with sodium carbonate and the crude product was extracted three times with dichloromethane. The organic layers were combined, dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated. If required, the product was further purified by column chromatography on silica.

General procedure C1: A mixture of carboxylic acid (1.1 eq.), EDC (1.2 eq.), and 4-DMAP (0.2 eq.) were dissolved in dry dichloromethane (c = 0.2 M) under argon atmosphere. Then, a solution of the corresponding amine (1.0 eq.) in dry DCM (c = 0.4 M) was added slowly and the mixture heated to reflux for six hours. After cooling, the solvent was evaporated and the product purified by column chromatography on silica.

General procedure C2: If the acid chloride was not available commercially, a solution of the corresponding acid (1.3 eq.) in thionyl chloride (c = 1.0 M) was heated to reflux for two hours. Excessive thionyl chloride was removed by distillation and the acid chloride was washed twice with toluene, which was distilled off, as well. Subsequently, the acid chloride was redissolved in dry THF (c = 0.6 M) under argon atmosphere. Pyridine (3.0 eq.) and a solution of the corresponding amine (1.0 eq.) in dry THF (c = 1 M) were added and the mixture was heated to reflux for one hour. Then, 5% HCl was added and the product was extracted three times with EA. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvent removed by evaporation under reduced pressure. The product was purified by column chromatography on silica.

General procedure D1: The nitro compound (1.0 eq.) was dissolved in EA (c = 0.05 M). Palladium (10%) on charcoal (0.1 eq.) was added, the suspension flushed with argon and then stirred under hydrogen atmosphere overnight. On the next day, the charcoal was filtered off on celite or silica, the solvent was evaporated. If necessary, the product was further purified by column chromatography on silica.

General procedure D2: The nitroarene (1.0 eq) was dissolved in a 2:1 mixture of EA and acetic acid (c = 0.05 M). Then, iron turnings (5.0 eq.) were added. Alternatively, the reduction was carried out with 4.2 equivalents tin(II) chloride in THF/10% HCl (c = 0.1 M). The resulting suspension were stirred at 50 °C. After TLC had indicated complete reaction, the suspension was filtered over celite. Water was added to the filtrate and the crude product was extracted three times with EA. The combined organic layers were dried over sodium sulfate

and subsequently, the solvent was removed under reduced pressure. The pure product was obtained after column chromatography on silica.

General procedure E: To a solution of the ester (1.0 eq.) in THF (c = 0.05 M) was added an aqueous solution of lithium hydroxide (6.0 eq, c = 1.0 M). The resulting mixture was either heated to 50 °C or stirred at ambient temperature until TLC indicated complete conversion. Subsequently, the solution was acidified with 5% HCl and the product extracted three times with EA. If necessary, further purification was achieved by column chromatography on silica.

General procedure F: Chromenes were synthesized out of the corresponding salicylaldehyde (1.0 eq.), which was heated to reflux in acrylonitrile (c = 1 M) and 1,4-diazabicyclo[2.2.0]octane (0.2 eq.) for 15 hours under argon atmosphere. After cooling to room temperature, EA and 1 M NaOH (1:1) were added. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent removed by evaporation. Column chromatography provided the pure product.

General procedure G: Chromene-3-carbonitriles (1.0 eq.) were hydrolyzed to the respective carboxylic acid in a 0.2 M suspension of 10% NaOH under reflux for six hours. The obtained solution was then acidified with 10% HCl. If the product precipitated, it was filtered, washed with water and dried under vacuum. In the other case, the product was extracted three times with EA, dried over sodium sulfate and the solvent evaporated.

General procedure H: Methoxyaromatics (1.0 eq.) were dissolved in dry DCM (c = 0.03 M) at 0 °C under argon atmosphere. After careful addition of the Lewis acid, which was either 3.0 equivalents of aluminium chloride or a 1 M solution of BBr_3 (10 eq.), the solution was allow to warm to ambient temperature and stirred overnight. The reaction was terminated by addition of water followed by 5% HCl. The crude product was extracted three times with EA, dried over Na_2SO_4, and the solvent evaporated under reduced pressure. Column chromatography on silica provided the pure product.

General procedure I: To a solution of the aromatic compound (1.0 eq.) in acetic anhydride or acetic acid (c = 0.5 M) was dropped an ice-cold mixture of concentrated nitric acid (10 eq.) and glacial acetic acid (6 eq.) with catalytic amounts of concentrated sulfuric acid at 0 °C. The reaction was monitored by TLC. After complete conversion, the mixture was poured into an

ice-bath and the product extracted three times with EA. The combined organic layers were dried over sodium sulfate, the solvent removed, and the pure product obtained after column chromatography on silica.

General procedure J: The toluene (1.0 eq.) was added to a 1:1 (v/v) mixture of pyridine and water (c = 0.2 M) and heated to 100 °C. A 0.5 M aqueous solution of potassium permanganate (5.0 eq.) was dropped to the solution and the mixture stirred for additional four hours. The resulting suspension was filtered, acidified with 10% HCl, and the product extracted three times with EA. The organic layers were dried over Na_2SO_4, the solvent removed under reduced pressure and purified by column chromatography on silica.

General procedure K: To a solution of the toluene derivative (1.0 eq., c = 0.6 M) and copper(II) sulfate (3.0 eq.) in acetonitrile/water (1:1) was added ammonium persulfate (3.0 eq.). The mixture was heated to reflux for 30 minutes under vigorous stirring. The product was extracted three times with DCM, dried over Na_2SO_4, and the solvent evaporated. Further purification by column chromatography on silica provided the product.

General procedure L: The iodoarene (1.0 eq.) and sodium carbonate (3.0 eq.) were dissolved in a 4:1 mixture of 1,4-dioxane and water (c = 0.1 M) under argon atmosphere and degassed. A catalytic amount of $Pd(PPh_3)_4$ (5.0 mol-%) and boronic acid (1.2 eq.) were added. The mixture was heated to reflux for 2 hours and cooled to room temperature. The product was extracted three times with EA after addition of 5% HCl, dried over sodium sulfate, and purified by column chromatography on silica.

General procedure M: The chromenone (1.0 eq.) was dissolved in dry DMF (2.5 eq.) under argon atmosphere and 2.0 equivalents of $POCl_3$ were added. The mixture was heated to 60 °C for 6 hours. The reaction was quenched with ice-cold water and the product extracted three times with ethyl acetate. After drying over sodium sulfate, the solvent was evaporated and the product processed without further purification.

General procedure N: Fresh silver oxide was prepared by adding a solution of silver nitrate (2.2 eq.) in 10 mL water dropwisely to a solution of sodium hydroxide (4.0 eq.) in 10 mL water and 20 mL EtOH. Subsequently, a solution of the aldehyde (1.0 eq.) in 5 mL EtOH was added and the resulting mixture stirred for 75 minutes at 85 °C. The suspension was filtered

after cooling to room temperature, and the residue rinsed three times with a 1:1 (v/v) mixture of EtOH and water. The filtrate's ethanol was evaporated under reduced pressure and the product acidified with 5% HCl, extracted three times with ethyl acetate and purified by column chromatography on silica.

General procedure O: Under argon atmosphere, the bromoarene (1.0 eq.) and copper(I) cyanide (1.0 eq.) were suspended in dry DMF (0.5 mL/mmol) and heated to 150 °C for one hour. Subsequently, 2.7 mL/mmol toluene were added and the mixture heated to reflux for 60 minutes under stirring. After cooling to room temperature, water was added and the product extracted once with EA, dried over sodium sulfate, and the solvent removed under vacuum. Purification by column chromatography afforded the pure product.

General procedure P: 55% sulfuric acid (5 mL) was added to the nitrile (1.0 eq.) and the suspension was heated to reflux for 15 hours. After cooling to ambient temperature, the product was extracted three times with EA. The combined organic layers were extracted three times with 1 M NaOH (10 mL). The product was obtained after reacidification with 10% HCl and extraction with EA (3x). The organic layer was dried over Na_2SO_4, and the solvent removed under reduced pressure.

General procedure Q: The corresponding alcohol or amine (1.0 eq.), alkyl bromide (0.5 – 1.4 eq.) and 1.2 equivalents of potassium carbonate were suspended in dry DMF (4 mL/mmol) and stirred under argon atmosphere for 16 hours. Ethyl acetate (30 mL) was added and the product washed three times with water (30 mL). The organic layer was dried over sodium sulfate and the solvent evaporated. Column chromatography on silica afforded the pure product.

General procedure R: A solution of bromine (1.0 eq.) in glacial acetic acid (9 mL/mmol) was added dropwisely to a solution of the ketone (1.0 eq.) in glacial acetic acid (5 ml/mmol) and stirred for 17 hours. Water and 5% sodium thiosulfate solution (20 mL and 10 mL respectively) were added and the product three times extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and the solvent removed under reduced pressure. The product was not further purified.

General procedure S: The bromoacetophenone (1.0 eq.) and ammonium formate (3.0 eq.) were dissolved in formic acid (5 mL) and DMF (2 mL) and heated to reflux for 5 hours. After cooling to ambient temperature, the solution was neutralized with $NaHCO_3$ solution and ethyl acetate was added (50 mL). Phases were separated and the organic layer washed two more times with water. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and the solvent evaporated. The product was purified by column chromatography on silica.

General procedure T: The amine (2.0 eq.) was dissolved in 2 mL water at 0 °C. Then, a solution of potassium carbonate (2.0 eq.) in 3 mL water was added dropwisely and stirred for 15 minutes after complete addition. THF (10 mL), methanol (3 mL), and *p*-toluenesulfonyl chloride (1.0 eq.) were added (the latter in portions). The mixture was next allowed to warm to room temperature and stirred for another three hours. Water was added (30 mL) and the product extracted twice with ethyl acetate (30 mL). The solvent was evaporated after drying over sodium sulfate.

General procedure U: The iodoarene (1.0 eq.), acrolein diethyl acetal (3.0 eq.), palladium(II) acetate (3 mol-%), potassium carbonate (2.5 eq.), tetrabutylammonium acetate (2.0 eq.) and potassium chloride (1.0 eq.) were suspended in dry DMF (2 mL) and heated in the microwave reactor to 90 °C for two hours. 3 mL 5% HCl and 10 mL THF were added and the mixture stirred for one hour at room temperature. Ethyl acetate was added (40 mL) and the product was three times with 20 mL water, dried over sodium sulfate. The solvent was evaporated and the product purified by column chromatography on silica.

General procedure V: The acryl aldehyde derivative (1.0 eq.), *N*-hydroxyl-*p*-toluenesulfonamide (4.0 eq.) and K_2CO_3 (6.0 eq.) were dissolved in methanol (12 mL/mmol) and water (8 mL/mmol) and stirred at room temperature until TLC indicated complete consumption of starting material. The solution was then heated to reflux for 21 hours. Ethyl acetate (30 mL) was added and the product washed with diluted HCl twice and water (20 mL each) once. The organic layer was dried over sodium sulfate and the solvent removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica.

3-(3-[2-Aminobenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure A. Yield: 98%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.81 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 6.30 (br s, 2H), 6.58 (ddd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, ^4J = 1.1 Hz,

1H), 6.74 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 6.94 (d, ^3J = 7.7, Hz, 1H), 7.12-7.32 (m, 2H), 7.48-7.65 (m, 3H), 9.92 (s, 1H), 12.10 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, DMSO-d6): δ = 30.5, 35.2, 114.7, 115.3, 116.4, 118.4, 120.4, 123.3, 128.4, 128.7, 132.1, 139.2, 141.2, 149.7, 167.8, 173.7 ppm.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure C2. Yield: 24%. White solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.24 - 7.35 (m, 2H), 7.56 - 7.70 (m, 5H), 7.92 - 8.04 (m, 3H), 8.05 - 8.12 (m, 2H), 8.49 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 11.80 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, DMSO-d6): δ = 30.4, 35.2, 118.9, 120.9, 121.6, 123.3, 123.4, 123.5, 124.2, 127.1, 127.7, 127.9, 128.1, 128.6, 128.6, 129.0, 129.1, 131.9, 132.2, 132.2, 134.4, 138.5, 138.6, 141.4, 164.8, 167.4, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 437.13 ([M-H]$^-$).

2H-Chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedures F and G in a sequential one-pot manner. Yield: 52%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 4.90 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.84 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 6.95 (ddd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.26 (ddd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 7.5 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 12.83 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, DMSO-d6): δ = 64.1, 115.7, 120.8, 121.7, 123.4, 129.1, 131.8, 132.3, 154.4, 165.5 ppm.

Ethyl 3-(2-Aminobenzamido)phenylacetate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 98%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, CDCl3): δ = 1.26 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.62 (s, 2H), 4.16 (q, ^3J = 7.2 Hz, 2H), 5.50 (br s, 2H), 6.65 - 6.77 (m, 2H), 7.06 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.25 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.31 (dd, ^3J = 8.1, 8.1 Hz, 1H), 7.45 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.47-7.53 (m, 2H), 7.79 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, CDCl3): δ = 14.3, 41.4, 61.1, 116.3, 117.0, 117.7, 119.4, 121.4, 125.5, 127.3, 129.4, 132.9, 135.2, 138.3, 149.1, 167.7, 171.6 ppm.

Ethyl 3-(2-[2H-Chromene-3-carboxamido]benzamido)phenylacetate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 37%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.18 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.66 (s, 2H), 4.08 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.99 (d, ^4J = 0.8 Hz, 2H), 6.88 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 6.97 (ddd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 7.04 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.22-7.38 (m, 5H), 7.59 (ddd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.90 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 8.28 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.28 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, DMSO-d6): δ = 14.1, 40.5, 60.3, 64.2, 115.7,

119.5, 120.9, 121.7, 121.9, 123.3, 123.4, 125.2, 127.1, 127.9, 128.6, 128.8, 129.0, 131.5, 132.1, 134.9, 137.8, 138.1, 138.6, 154.2, 162.7, 167.2, 171.0 ppm.

3-(2-[2H-Chromene-3-carboxamido]benzamido)phenylacetic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 3.57 (s, 2H), 4.99 (d, ^4J = 0.9 Hz, 2H), 6.88 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 6.98 (ddd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.04 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.24 - 7.38 (m, 5H), 7.52 - 7.68 (m, 3H), 7.90 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 8.29 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.31 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, DMSO-d6): δ = 40.9, 64.2, 115.7, 119.5, 120.9, 121.6, 121.9, 121.9, 123.2, 123.3, 125.3, 127.1, 127.9, 128.5, 128.9, 129.0, 131.5, 132.1, 135.5, 138.2, 138.5, 154.2, 162.7, 167.2, 172.6 ppm. **ESI-MS**: m/z = 383.16 [M-COOH]$^-$, 427.14 ([M-H]$^-$).

Ethyl 3-(3-Aminophenyl)propanoate: Preparation according to general procedure A. Yield: 93%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (400 MHz, CDCl3): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.59 (t, ^3J = 7.9 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.9 Hz, 2H), 3.62 (br s, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.50-6.56 (m, 2H), 6.60 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.07 (dd, ^3J = 8.1, 8.1 Hz, 3H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, CDCl3): δ = 14.4, 31.1, 36.0, 65.0, 113.2, 115.2, 118.7, 129.5, 142.0, 146.6, 173.2 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-Nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 103% yield (did not dry completely despite vigorous attempts). Brown oil. **^{1}H-NMR** (400 MHz, CDCl3): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.0 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.11 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (t, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.41 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.45 (br s, 1H), 7.56-7.65 (m, 2H), 7.66-7.76 (m, 2H), 8.08 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, CDCl3): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 60.7, 118.5, 120.4, 124.8, 125.2, 128.8, 129.4, 130.9, 133.0, 134.0, 137.7, 141.9, 146.4, 164.5, 173.0 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-Aminobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 82%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, CDCl3): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.63 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.51 (br s, 2H), 6.64 - 6.77 (m, 2H), 6.98 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.20-7.31 (m, 2H), 7.41 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.43-7.49 (m, 2H), 7.79 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, CDCl3): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 60.6, 116.3, 116.9, 117.6, 118.6, 120.5, 124.6, 127.3, 129.3, 132.9, 138.1, 141.8, 149.1, 167.7, 173.0 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{2H-Chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 62%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.99 (d, ^4J = 1.1 Hz, 2H), 6.87 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 6.94-7.05 (m,

2H), 7.23-7.33 (m, 4H), 7.35 (s, 1H), 7.54-7.63 (m, 3H), 7.89 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 8.30 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.45 (br s, 1H), 11.31 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 14.1, 30.4, 35.0, 59.9, 64.2, 115.7, 118.9, 120.9, 120.9, 121.6, 121.9, 123.3, 123.4, 124.2, 127.1, 127.9, 128.6, 128.9, 129.0, 131.6, 132.1, 138.2, 138.6, 141.0, 154.2, 162.7, 167.2, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{2H-Chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 100%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 5.00 (s, 2H), 6.87 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 6.92 – 7.08 (m, 2H), 7.20-7.32 (m, 4H), 7.35 (s, 1H), 7.52-7.67 (m, 3H), 7.90 (d, ^3J = 7.2 Hz, 1H), 8.31 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.34 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 30.4, 35.1, 64.2, 115.8, 118.9, 120.9, 120.9, 121.6, 122.0, 123.1, 123.3, 124.2, 127.1, 127.9, 128.6, 128.9, 129.0, 131.6, 132.1, 138.2, 138.6, 141.4, 154.3, 162.7, 167.2, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 383.16 [M-COOH]$^-$, 427.14 ([M-H]$^-$).

8-Methoxy-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 43%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 3.77 (s, 3H), 4.85 (d, ^4J = 1.3 Hz, 2H), 6.87 (dd, ^3J = 7.6 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 6.95 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 7.07 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 55.8, 63.5, 103.2, 115.9, 116.7, 120.3, 120.8, 122.1, 139.2, 143.0, 147.7 ppm.

8-Methoxy-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 92%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 3.76 (s, 3H), 4.87 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.85-6.96 (m, 2H), 7.01 (dd, ^3J = 7.2 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.42 (dd, ^4J = 1.3, 1.3 Hz, 1H), 12.84 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 55.7, 64.0, 115.1, 120.8, 121.5, 121.5, 123.5, 132.5, 143.4, 147.6, 165.5 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{8-Methoxy-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 65%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.97 (s, 2H), 6.85 – 6.98 (m, 2H), 6.97 – 7.04 (m, 2H), 7.28 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.51 – 7.64 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.2 Hz, 1H), 8.29 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.31 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): δ = 14.1, 30.4, 35.0, 55.7, 59.9, 64.1, 114.8, 118.9, 120.5, 120.8, 121.6, 121.6, 123.3, 123.4, 124.2, 127.2, 128.1, 128.6, 129.0, 132.1, 138.2, 138.6, 141.0, 143.2, 147.6, 147.6, 162.7, 167.1, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{8-Methoxy-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 97%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400

MHz, DMSO-d6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 4.96 (s, 2H), 6.87 – 6.95 (m, 2H), 6.99 – 7.04 (m, 2H), 7.23 – 7.30 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.53 – 7.63 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1H), 8.29 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.31 (s, 1H), 12.11 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): δ = 30.4, 35.1, 55.7, 64.1, 114.9, 118.9, 120.6, 120.9, 121.6, 121.7, 123.2, 124.2, 127.2, 128.1, 128.6, 129.0, 132.1, 138.2, 138.6, 141.4, 143.2, 147.6, 147.6, 162.7, 167.2, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 471.21 ([M-H]$^-$).

7-Methyl-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 73%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 2.26 (s, 3H), 4.83 (d, ^4J = 1.3 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.82 (dd, ^3J = 7.7 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 7.15 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 21.3, 63.6, 101.8, 116.5, 116.9, 117.7, 123.1, 128.6, 139.0, 143.3, 153.9 ppm.

7-Methyl-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 93%. White solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 2.25 (s, 3H), 4.87 (d, ^4J = 1.2 Hz, 2H), 6.68 (s, 1H), 6.77 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.19 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 12.74 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 21.2, 64.2, 116.2, 118.3, 122.2, 122.6, 129.0, 132.5, 142.3, 154.5, 165.6 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{7-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 52%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.27 (s, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.96 (d, ^4J = 0.8 Hz, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.80 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.19 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.23 – 7.30 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.52 – 7.65 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.29 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.27 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ 14.1, 21.2, 30.3, 35.0, 59.9, 64.2, 116.2, 118.3, 118.9, 120.9, 121.5, 122.7, 123.2, 123.3, 124.2, 125.9, 128.0, 128.6, 128.7, 128.9, 132.1, 138.2, 138.6, 141.0, 141.9, 154.2, 162.7, 167.2, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{7-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.27 (s, 3H), 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.96 (d, ^4J = 0.9 Hz, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.80 (dd, ^3J = 7.6 Hz, ^4J = 0.6 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.19 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.23 – 7.31 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.53 – 7.63 (m, 3H), 7.89 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 8.30 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.29 (s, 1H), 12.18 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ 21.2, 30.4, 35.2, 64.2, 116.2, 118.3, 118.9, 120.9, 121.5, 122.7, 123.1, 123.3, 124.2, 125.9, 128.1, 128.6, 128.7, 129.0, 132.1, 138.3, 138.5, 141.4, 141.9, 154.2, 162.7, 167.2, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 455.21 ([M-H]$^-$).

6-Chloro-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 61%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 4.91 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.92 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 7.34 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H), 7.37 (d, ^4J = 2.6 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 63.8, 104.7, 116.3, 118.0, 121.5, 125.8, 127.8, 131.9, 137.7, 152.6 ppm.

6-Chloro-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 70%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 4.92 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.86 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H), 7.38 – 7.47 (m, 2H), 12.97 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 64.5, 117.5, 122.6, 124.8, 125.3, 128.3, 131.1, 131.1, 153.2, 165.3 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{6-Chloro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 84%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.02 (d, ^4J = 0.9 Hz, 2H), 6.90 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.22 – 7.31 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 7.42 (d, ^3J = 2.6 Hz, 1H), 7.53 – 7.62 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 6.9 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.28 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 59.8, 64.5, 117.4, 118.9, 120.8, 121.7, 122.6, 123.4, 123.5, 124.2, 125.4, 126.7, 127.9, 128.5, 128.6, 128.9, 130.8, 132.1, 138.0, 138.5, 141.0, 152.9, 162.4, 167.1, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{6-Chloro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 72%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 5.02 (d, ^4J = 1.1 Hz, 2H), 6.90 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.25 – 7.31 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 7.43 (dd, ^3J = 2.7 Hz, 1H), 7.51 – 7.65 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.47 (s, 1H), 11.28 (s, 1H), 12.13 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 64.5, 117.5, 118.9, 120.8, 121.7, 122.6, 123.4, 123.5, 124.2, 125.4, 126.8, 128.0, 128.5, 128.6, 129.0, 130.8, 132.1, 138.0, 138.5, 141.4, 152.9, 162.4, 167.1, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 475.05 ([M-H]$^-$).

6-Fluoro-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 76%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 4.88 (d, ^4J = 1.3 Hz, 2H), 6.89 – 6.97 (m, 1H), 7.12 – 7.21 (m, 2H), 7.54 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 63.8, 105.0, 114.5, 116.4, 117.7, 119.0, 121.2, 138.1, 150.2, 156.9 ppm.

6-Fluoro-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 85%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 4.89 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H),

6.86 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 4.6 Hz, 1H), 7.08 (ddd, ^3J = 8.7, 8.7 Hz, ^4J = 3.1 Hz, 1H), 7.23 (dd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 3.1 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 12.92 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 64.3, 114.9, 116.9, 117.9, 122.1, 125.0, 131.4, 150.6, 156.9, 165.3 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{6-Fluoro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 90%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.98 (d, ^4J = 1.0 Hz, 2H), 6.90 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 4.6 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.10 (ddd, ^3J = 8.7, 8.7 Hz, ^4J = 3.1 Hz, 1H), 7.20 – 7.31 (m, 3H), 7.33 (s, 1H), 7.53 – 7.63 (m, 3H), 7.89 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.29 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 64.3, 114.6, 117.0, 117.6, 118.9, 120.8, 121.7, 122.1, 123.4, 123.5, 124.2, 127.1, 128.6, 128.9, 132.1, 138.0 , 138.5, 141.0, 150.3, 156.9, 162.4, 167.1, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{6-Fluoro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 62%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.99 (d, ^4J = 1.1 Hz, 2H), 6.90 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 4.6 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (ddd, ^3J = 8.7, 8.7 Hz, ^4J = 3.1 Hz, 1H), 7.24 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 3.1 Hz, 1H), 7.26 – 7.31 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.53 – 7.63 (m, 3H), 7.89 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.30 (s, 1H), 12.09 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 64.4, 114.7, 117.0, 117.6, 118.9, 120.9, 121.7, 122.2, 123.4, 123.5, 124.2, 124.9, 127.2, 128.7, 129.0, 132.1, 138.0 , 138.5, 141.4, 150.4, 156.9, 162.5, 167.1, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 459.08 ([M-H]$^-$).

8-Chloro-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 35%. White solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 5.02 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 7.02 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.25 (dd, ^3J = 7.6 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.45 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): 64.3, 104.4, 116.3, 120.2, 121.6, 122.9, 127.6, 132.7, 138.2, 149.4 ppm.

8-Chloro-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 88%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 5.03 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.96 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.30 (dd, ^3J = 7.6 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.45 (t, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 12.95 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): 65.0, 119.8, 122.3, 122.4, 124.4, 127.9, 131.4, 131.8, 149.9, 165.2 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{8-chloro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 89%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400

MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.12 (d, ^4J = 1.0 Hz, 2H), 6.91 – 7.05 (m, 2H), 7.22 – 7.34 (m, 3H), 7.37 (s, 1H), 7.40 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.52 – 7.67 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.29 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): 14.1, 30.3, 35.0, 59.8, 65.0, 118.9, 119.8, 120.9, 121.7, 122.5, 122.5, 123.5, 123.5, 124.2, 127.1, 127.6, 127.9, 128.6, 129.0, 131.5, 132.1, 137.9, 138.5, 141.0, 149.7, 162.3, 167.1, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{8-Chloro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 97%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 5.12 (d, ^4J = 1.2 Hz, 2H), 6.98 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.32 (m, 3H), 7.37 (s, 1H), 7.39 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.52 – 7.64 (m, 3H), 7.90 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 8.28 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 10.47 (s, 1H), 11.32 (s, 1H), 12.10 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): 30.4, 35.1, 65.0, 118.9, 119.8, 120.9, 121.7, 122.5, 122.5, 123.4, 123.5, 124.2, 127.2, 127.7, 128.0, 128.6, 129.0, 131.6, 132.1, 138.0, 138.5, 141.4, 149.7, 162.4, 167.1, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 475.06 ([M-H]$^-$).

6-Methyl-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 72%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.27 (s, 3H), 4.77 (d, ^4J = 1.3 Hz, 2H), 6.77 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 6.90 (d, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.07 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): 20.5, 64.5, 103.4, 116.4, 116.7, 120.0, 128.8, 132.0, 133.5, 139.1, 152.3 ppm.

6-Methyl-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 40%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.21 (s, 3H), 4.85 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.74 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 7.07 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.12 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 12.73 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): 20.0, 64.1, 115.4, 120.7, 123.5, 129.2, 130.6, 132.2, 132.4, 152.3, 165.5 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{6-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 94%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.95 (s, 2H), 6.77 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.08 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.23 -7.33 (m, 3H), 7.48 – 7.66 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.2 Hz, 1H), 8.30 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.30 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): 14.0, 20.0, 30.3, 35.0, 59.8, 64.1, 115.5, 119.0, 120.7, 120.9,

121.5, 123.1, 123.3, 124.2, 127.1, 128.0, 128.6, 129.0, 129.0, 130.7, 132.0, 132.1, 138.2, 138.5, 141.0, 152.1, 162.7, 167.2, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{6-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 96%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.23 (s, 3H), 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.95 (d, ^4J = 1.0 Hz, 2H), 6.77 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.07 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 7.21 – 7.33 (m, 3H), 7.52 – 7.64 (m, 3H), 7.90 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 8.31 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.32 (s, 1H), 12.13 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): 20.0, 30.4, 35.1, 64.1, 115.5, 119.0, 120.7, 120.9, 121.5, 123.1, 123.3, 124.2, 127.2, 128.1, 128.6, 129.0, 129.0, 130.8, 132.0, 132.1, 138.2, 138.5, 141.4, 152.1, 162.7, 167.2, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 455.10 ([M-H]$^-$).

8-Methyl-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 83%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.19 (s, 3H), 4.83 (d, ^4J = 1.3 Hz, 2H), 6.87 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 6.95 (dd, ^3J = 7.5 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.14 (dd, ^3J = 7.4 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 7.16 (dd, ^4J = 1.1, 1.1 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): 15.5, 64.5, 103.0, 116.7, 119.7, 121.9, 126.2, 126.3, 134.4, 139.4, 152.5 ppm.

8-Methyl-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 79%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.12 (s, 3H), 4.92 (d, ^4J = 1.4 Hz, 2H), 6.85 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.14 (d, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.42 (dd, ^4J = 1.3, 1.3 Hz, 1H), 12.82 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): 15.2, 64.2, 120.4, 121.2, 123.1, 124.6, 126.8, 132.7, 133.2, 152.5, 165.6 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{8-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 99%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.87 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.10 – 7.20 (m, 2H), 7.21 – 7.30 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.53 – 7.65 (m, 3H), 7.89 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 8.31 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.30 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): 14.1, 15.2, 30.3, 35.0, 59.8, 64.2, 119.0, 120.4, 120.9, 121.3, 121.5, 123.1, 123.3, 124.2, 124.6, 126.5, 126.7, 128.3, 128.6, 128.9, 132.1, 132.9, 138.2, 138.5, 141.0, 152.2, 162.6, 167.2, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{8-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 88%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.14 (s, 3H), 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 5.01 (d, ^4J = 0.9 Hz, 2H), 6.87 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.11 – 7.18 (m,

2H), 7.23 – 7.32 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.53 – 7.65 (m, 3H), 7.90 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.31 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.31 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): 15.3, 30.4, 35.1, 64.2, 118.9, 120.4, 120.9, 121.3, 121.5, 123.1, 123.3, 124.2, 124.6, 126.6, 126.7, 128.4, 128.6, 129.0, 132.1, 132.9, 138.2, 138.5, 141.4, 152.3, 162.7, 167.2, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 455.11 ([M-H]$^-$).

Ethyl 3-(3-[2-{Quinoline-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 78%. White solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.59 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.02 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.17 (d, ^3J = 7.3 Hz, 1H), 7.21 – 7.29 (m, 1H), 7.34 (ddd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.55 – 7.62 (m, 2H), 7.65 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.73 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.86 – 7.99 (m, 1H), 8.12 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.16 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.34 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 8.91 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 9.34 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H), 10.49 (s, 1H), 11.71 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 118.8, 120.7, 122.3, 123.9, 124.0, 124.6, 125.3, 126.5, 127.4, 127.7, 128.2, 128.6, 128.8, 128.9, 129.0, 129.3, 131.6, 132.0, 135.9, 137.8, 138.7, 141.0, 148.4, 148.7, 163.4, 167.0, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{Quinoline-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 45%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.52 (m, 2H), 2.81 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 6.99 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.25 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.55 – 7.67 (m, 3H), 7.72 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.86 – 7.96 (m, 2H), 8.11 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.15 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.36 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 8.90 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 9.34 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H), 10.53 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): 30.6, 35.5, 118.7, 120.8, 122.3, 123.9, 124.1, 124.6, 126.5, 127.4, 127.7, 128.6, 128.8, 129.1, 129.4, 131.7, 132.0, 135.9, 137.9, 138.7, 141.6, 148.4, 148.7, 163.5, 167.1, 173.9 ppm. **ESI-MS**: m/z = 438.07 ([M-H]$^-$).

2-Methoxy-6-methyl-benzaldehyde: Preparation according to general procedure K. Yield: 38%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.57 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.76 – 6.88 (m, 2H), 7.38 (dd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 10.65 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): 21.6, 55.9, 109.2, 124.2, 126.7, 134.6, 142.2, 163.3, 192.4 ppm.

2-Hydroxy-6-methyl-benzaldehyde: Preparation according to general procedure H with aluminium(III) chloride. Yield: 69%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.61 (s, 3H), 6.71 (d, ^3J = 7.4 Hz, 1H), 6.81 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 7.37 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 10.32 (s, 1H), 11.90 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): 18.2, 116.3, 118.7, 122.0, 137.6, 142.3, 163.4, 195.5 ppm.

5-Methyl-2H-chromene-3-carbonitrile: Preparation according to general procedure F. Yield: 42%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 2.34 (s, 3H), 4.75 (s, 2H), 6.73 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 6.81 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 7.38 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): 18.5, 63.8, 102.9, 114.5, 116.9, 119.3, 124.1, 132.3, 136.4, 136.6, 154.8 ppm.

5-Methyl-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure G. Yield: 84%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 2.33 (s, 3H), 4.84 (d, ^4J = 0.7 Hz, 2H), 6.70 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 6.82 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.15 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 12.81 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): 18.0, 63.5, 113.7, 119.6, 123.2, 123.3, 129.3, 131.2, 136.7, 154.8, 165.6 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{5-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 88%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d6): δ = 1.15 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.92 (s, 2H), 6.73 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 6.84 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.00 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.16 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.23 – 7.32 (m, 2H), 7.52 – 7.63 (m, 3H), 7.70 (s, 1H), 7.90 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.30 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.48 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): 14.1, 17.8, 30.4, 35.1, 59.8, 63.4, 113.6, 118.7, 119.7, 120.7, 121.4, 123.3, 123.3, 123.4, 124.1, 125.1, 126.8, 128.6, 128.9, 131.0, 132.1, 136.3, 138.2, 138.6, 141.0, 154.5, 162.7, 167.2, 172.0 ppm.

3-(3-[2-{5-Methyl-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 91%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.37 (s, 3H), 2.53 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 4.93 (d, ^4J = 0.9 Hz, 2H), 6.73 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 6.83 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.24 – 7.30 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.57 – 7.63 (m, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.91 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 8.31 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 10.47 (s, 1H), 11.49 (s, 1H), 12.15 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): 17.9, 30.5, 35.2, 63.4, 113.7, 118.6, 119.7, 120.7, 121.4, 123.3, 123.3, 123.4, 124.1, 125.2, 126.8, 128.6, 128.9, 131.0, 132.1, 136.4, 138.2, 138.7, 141.4, 154.5, 162.8, 167.2, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 455.16 ([M-H]$^-$).

Ethyl 3-(3-[5-Methyl-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1 with dicyclohexylcarbodiimide instead of EDC. Yield: 58%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.49 (s, 3H), 2.64 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.96 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.03 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.29

(dd, ^3J = 7.8, 7.6 Hz, 1H), 7.35 – 7.52 (m, 5H), 8.04 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 21.6, 31.0, 35.9, 60.6, 118.5, 120.5, 125.0, 125.3, 129.3, 129.4, 131.3, 133.2, 137.6, 142.0, 144.1, 145.8, 164.7, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 379.16 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-5-methylbenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1 in 95%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.64 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.96 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.14 (br s, 2H), 6.66 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 6.98 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.08 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.24 – 7.31 (m, 2H), 7.41 – 7.47 (m, 2H), 7.81 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 20.5, 31.1, 36.0, 60.6, 116.8, 118.1, 118.5, 120.5, 124.5, 126.5, 127.4, 129.3, 133.8, 138.2, 141.8, 146.4, 167.6, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 349.21 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-methylbenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 64%. White solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.8, Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 8.7, 7.6 Hz, 1H), 7.45 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.55 – 7.61 (m, 2H), 7.61 – 7.69 (m, 2H), 7.75 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.93 – 8.04 (m, 2H), 8.07 (d, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.35 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H), 8.53 (d, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 10.45 (s, 1H), 11.64 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 20.5, 30.3, 35.0, 59.8, 118.9, 120.8, 121.8, 123.4, 124.1, 127.0, 127.6, 127.7, 127.7, 128.0, 128.5, 128.6, 129.0, 129.2, 131.9, 132.2, 132.5, 132.6, 134.4, 136.1, 138.6, 141.0, 164.6, 167.3, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 503.26 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-methylbenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 90%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.45 (s, 3H), 2.50 – 2.62 (m, 2H), 2.87 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.05 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.50 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.64 – 7.73 (m, 3H), 7.81 (s, 1H), 8.01 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 8.06 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.11 – 8.17 (m, 2H), 8.40 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H), 10.53 (s, 1H), 11.72 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 20.5, 30.5, 35.4, 118.8, 120.8, 121.7, 123.4, 123.5, 124.1, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.6, 129.1, 129.3, 132.0, 132.2, 132.6, 132.6, 134.4, 136.1, 138.6, 141.5, 164.6, 167.4, 173.8 ppm. **ESI-MS**: m/z = 451.24 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[4-Methyl-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 66%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.11 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.53 (m, 4H), 7.65 (s, 1H), 7.86 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 21.3, 31.0, 35.9, 60.6,

118.4, 120.4, 125.1, 128.6, 129.4, 129.4, 130.3, 134.4, 134.4, 137.7, 141.9, 146.6, 164.6, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 379.16 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-4-methylbenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 97%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.63 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.98 (br s, 2H), 6.50 – 6.57 (m, 2H), 6.98 (ddd, ^3J = 7.5 Hz, ^4J = 1.6, 1.1 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.35 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 7.38 – 7.43 (m, 1H), 7.44 (dd, ^4J = 1.7, 1.7 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 21.6, 31.1, 36.0, 60.6, 113.8, 118.1, 118.4, 118.5, 120.5, 124.4, 127.2, 129.3, 138.3, 141.8, 143.6, 149.1, 167.6, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 349.20 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-methylbenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 84%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.17 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.65 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.90 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.08 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.05 (d, ^3J = 7.8, Hz, 1H), 7.17 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 8.7, 7.6 Hz, 1H), 7.59 – 7.66 (m, 2H), 7.66 – 7.75 (m, 2H), 7.93 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.02 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 8.04 – 8.09 (m, 1H), 8.11 – 8.19 (m, 2H), 8.47 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.58 (d, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 10.49 (s, 1H), 12.06 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 21.4, 30.3, 35.0, 59.8, 119.1, 119.7, 121.0, 121.6, 123.4, 123.9, 124.2, 127.0, 127.7, 127.7, 128.1, 128.6, 128.6, 128.9, 129.0, 132.0, 132.2, 134.4, 138.5, 139.1, 141.0, 142.5, 164.6, 167.4, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 503.26 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-methylbenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 84%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.48 (s, 3H), 2.59 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.88 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.06 (d, ^3J = 7.7, Hz, 1H), 7.17 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.61 – 7.66 (m, 2H), 7.67 – 7.73 (m, 2H), 7.93 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.02 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 8.06 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.12 – 8.18 (m, 2H), 8.47 (d, ^4J = 0.6 Hz, 1H), 8.58 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 12.08 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 21.5, 30.5, 35.3, 119.0, 119.7, 121.1, 121.6, 123.4, 123.9, 124.2, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.7, 129.0, 129.1, 132.0, 132.2, 134.4, 138.5, 139.0, 141.5, 142.6, 164.6, 167.5, 173.8 ppm. **ESI-MS**: m/z = 451.24 $[M-Na]^-$.

Ethyl 3-(3-[5-Methoxy-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 40%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.20 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.52 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 4.06 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.82 – 6.90 (m, 2H), 6.92 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.16 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.27 –

7.37 (m, 2H), 7.92 (d, ^3J = 9.1 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.2, 30.8, 35.7, 56.3, 60.6, 113.6, 115.2, 118.5, 120.3, 124.8, 127.0, 129.1, 135.3, 137.8, 138.4, 141.5, 163.8, 164.9, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 371.17 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-5-methoxybenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 47%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.12 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.58 (br s, 2H), 6.69 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H), 6.89 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 6.96 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.05 (d, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 7.25 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.39 – 7.45 (m, 2H), 8.19 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 56.1, 60.6, 112.4, 118.4, 118.5, 119.5, 119.8, 120.5, 124.5, 129.2, 138.2, 141.7, 141.9, 151.8, 167.2, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 365.18 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-methoxybenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1 Yield: 92%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.59 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 4.02 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.23 (dd, ^3J = 9.0 Hz, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 8.6, 7.7 Hz, 1H), 7.42 (d, ^4J = 2.8 Hz, 1H), 7.54 – 7.59 (m, 2H), 7.59 – 7.67 (m, 2H), 7.95 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 8.00 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 8.07 (d, ^3J = 8.2 Hz, 2H), 8.19 – 8.30 (m, 1H), 8.52 (d, ^4J = 1.0 Hz, 1H) 10.45 (s, 1H), 11.32 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 55.6, 59.8, 113.9, 117.4, 118.8, 118.9, 120.7, 120.8, 123.6, 124.0, 124.1, 127.0, 127.7, 127.7, 128.0, 128.5, 128.6, 129.0, 132.2, 134.3, 138.5, 138.6, 141.0, 155.1, 164.6, 166.7, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 519.23 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-methoxybenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 91%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.53 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 7.00 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.23 (dd, ^3J = 9.0 Hz, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.43 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.54 – 7.68 (m, 4H), 7.95 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 8.00 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.04 – 8.10 (m, 2H), 8.26 (d, ^3J = 9.0 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.34 (s, 1H), 12.14 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 55.6, 113.9, 117.4, 118.8, 120.8, 123.6, 124.0, 124.1, 125.9, 127.0, 127.7, 127.8, 128.0, 128.5, 128.6, 129.0, 131.2, 132.0, 132.2, 134.3, 138.6, 141.4, 155.1, 164.6, 166.8, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 467.24 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-hydroxybenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure H with boron tribromide. Yield: 22%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.43 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.70 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 6.87 (d, ^3J = 7.7, Hz, 1H), 6.93 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.8 Hz, 1H), 7.11 – 7.17 (m, 2H), 7.44– 7.56 (m,

4H), 7.84 (d, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.89 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.95 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 7.99 (d, ^3J = 8.8 Hz, 1H), 8.40 (s, 1H), 9.66 (br s, 1H), 10.32 (s, 1H), 11.04 (s, 1H), 12.03 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 115.3, 118.4, 118.5, 120.5, 123.6, 124.0, 124.3, 126.7, 127.0, 127.7, 127.7, 127.9, 128.4, 128.6, 129.0, 129.5, 132.1, 132.2, 134.3, 138.8, 141.4, 153.6, 164.6, 167.0, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 477.15 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[5-Chloro-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 45%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.20 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.52 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.05 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.94 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.17 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.24 – 7.33 (m, 2H), 7.40 – 7.47 (m, 2H), 7.90 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.2, 30.8, 35.7, 60.6, 118.6, 120.5, 125.2, 126.0, 128.9, 129.2, 130.5, 134.2, 137.4, 140.4, 141.6, 144.3, 163.4, 173.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 399.10 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-5-chlorobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D2 with iron turnings. Yield: 61%. White solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.91 (t, ^3J = 77.8 Hz, 2H), 4.11 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.36 (br s, 2H), 6.62 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1H), 6.96 (d, ^3J = 7.4 Hz, 1H), 7.15 (dd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.20 – 7.27 (m, 1H), 7.37 – 7.41 (m, 2H), 7.42 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.8, 60.6, 117.4, 118.8, 118.8, 120.7, 121.3, 124.7, 127.1, 129.2, 132.5, 137.9, 141.7, 147.3, 166.6, 173.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 369.12 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-chlorobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 60%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.02 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.28 (dd, ^3J = 8.5, 7.8 Hz, 1H), 7.54 – 7.60 (m, 2H), 7.62 (ddd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.66 (ddd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.70 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H), 7.96 (dd, ^3J = 8.6, Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 7.98 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 8.01 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 – 8.11 (m, 2H), 8.45 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H), 8.54 (d, ^4J = 0.7 Hz, 1H), 10.58 (s, 1H), 11.67 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 59.9, 118.9, 120.9, 123.5, 123.5, 124.3, 125.3, 127.1, 127.3, 127.7, 128.0, 128.2, 128.6, 128.6, 128.7, 129.1, 131.6, 131.7, 132.2, 134.5, 137.3, 138.4, 141.1, 164.9, 165.8, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 523.18 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-chlorobenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 88%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54

(t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.28 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.58 – 7.68 (m, 3H), 7.71 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.92 – 8.00 (m, 2H), 8.01 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 – 8.12 (m, 2H), 8.45 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 10.60 (s, 1H), 11.68 (s, 1H), 12.16 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 118.9, 120.9, 123.5, 123.6, 124.4, 125.4, 127.1, 127.3, 127.8, 128.1, 128.2, 128.7, 128.7, 128.7, 129.1, 131.6, 131.8, 132.2, 134.5, 137.4, 138.4, 141.4, 164.9, 165.9, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 471.22 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[4-Methoxy-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 82%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.12 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.4 Hz, 1H), 7.17 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.23 – 7.31 (m, 1H), 7.47 (m, 4H), 7.63 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 56.3, 60.6, 109.9, 118.4, 119.4, 120.3, 125.1, 129.4, 129.9, 130.0, 137.8, 141.9, 148.0, 161.1, 164.3, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 395.16 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-4-methoxybenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 98%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.63 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.80 (br s, 2H), 6.19 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 6.28 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H), 6.97 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.35 – 7.45 (m, 3H), 7.65 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 31.1, 36.0, 55.4, 60.6, 101.1, 104.6, 109.4, 118.6, 120.5, 124.3, 129.0, 129.2, 138.3, 141.8, 151.3, 163.4, 167.4, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 365.18 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-methoxybenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 87%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.62 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.87 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (dd, ^3J = 8.1, 8.1 Hz, 1H), 7.54 – 7.60 (m, 2H), 7.60 – 7.71 (m, 2H), 7.98 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.99 – 8.05 (m, 2H), 8.08 – 8.13 (m, 2H), 8.35 (d, ^4J = 2.6 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 10.39 (s, 1H), 12.50 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.4, 35.1, 55.5, 59.9, 105.9, 108.5, 113.6, 119.3, 121.3, 123.3, 124.2, 127.1, 127.8, 127.9, 128.2, 128.6, 128.8, 129.2, 130.8, 131.9, 132.3, 134.5, 138.5, 141.0, 141.5, 162.3, 164.8, 167.5, 172.2 ppm. **ESI-MS**: m/z = 519.23 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-methoxybenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 86%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6):

δ = 2.56 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 6.87 (dd, ^3J = 8.8 Hz, ^4J = 2.6 Hz, 1H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.29 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.52 – 7.72 (m, 4H), 7.94 – 8.06 (m, 3H), 8.11 (dd, ^3J = 6.8, 6.8 Hz, 2H), 8.36 (d, ^4J = 2.5 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 12.17 (br s, 1H), 12.51 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 55.5, 105.9, 108.5, 113.6, 119.3, 121.3, 123.3, 124.2, 127.1, 127.7, 127.9, 128.2, 128.6, 128.8, 129.2, 130.7, 131.9, 132.2, 134.5, 138.5, 141.4, 141.5, 162.3, 164.8, 167.5, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 467.25 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-hydroxybenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure H with boron tribromide. Yield: 65%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 6.66 (dd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.00 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.57 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.60 – 7.70 (m, 2H), 7.91 (d, ^3J = 8.7 Hz, 1H), 7.98 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.11 (dd, ^3J = 8.3, 8.3 Hz, 2H), 8.26 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 11.42 (br s, 2H), 12.57 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.4, 107.1, 110.1, 111.7, 119.2, 121.2, 123.3, 124.1, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.7, 129.1, 130.8, 132.0, 132.3, 134.4, 138.5, 141.5, 141.7, 161.3, 164.6, 167.8, 172.1, 173.8 ppm. **ESI-MS**: m/z = 453.08 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-Nitro-5-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 68%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.10 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.03 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.36 – 7.47 (m, 4H), 7.78 (s, 1H), 8.18 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.8, 60.7, 118.6, 120.6, 121.9, 121.9, 125.6, 127.2, 129.5, 135.3, 137.3, 142.0, 143.8, 152.7, 152.7, 162.9, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 449.13 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-5-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 97%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.63 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.94 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.58 (br s, 2H), 6.74 (d, ^3J = 8.9 Hz, 1H), 7.00 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.14 (dd, ^3J = 8.9 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.33 (d, ^4J = 2.4 Hz, 1H), 7.39 – 7.44 (m, 2H), 7.82 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 60.7, 116.9, 118.8, 118.8, 120.5, 120.8, 120.8, 125.0, 126.3, 129.3, 137.7, 139.8, 141.9, 147.0, 166.4, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 419.13 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 64%. White solid. **^{1}H-NMR** (300

MHz, Acetone-d_6): δ = 1.17 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.64 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.08 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.10 (ddd, ^3J = 7.6 Hz, ^4J = 1.6, 1.1 Hz, 1H), 7.33 (dd, ^3J = 8.7, 7.6 Hz, 1H), 7.59 – 7.71 (m, 5H), 7.98 – 8.05 (m, 2H), 8.07 – 8.14 (m, 3H), 8.61 (d, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 8.97 (d, ^3J = 9.2 Hz, 1H), 9.96 (s, 1H), 12.19 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, Acetone-d_6): δ = 14.5, 31.6, 36.2, 60.7, 120.1, 121.5, 122.1, 122.3, 123.4, 123.7, 124.4, 125.8, 126.0, 127.9, 128.7, 129.0, 129.0, 129.6, 129.7, 130.1, 133.0, 133.7, 136.0, 139.2, 140.2, 142.7, 144.3, 165.8, 167.4, 172.8 ppm. **ESI-MS**: m/z = 573.19 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-5-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 97%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, Acetone-d_6): δ = 2.66 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.12 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.33 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.61 – 7.67 (m, 3H), 7.67 (s, 1H), 7.71 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.99 – 8.04 (m, 2H), 8.06 – 8.13 (m, 3H), 8.61 (s, 1H), 8.98 (d, ^3J = 9.2 Hz, 1H), 9.99 (s, 1H), 10.63 (br s, 1H), 12.22 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, Acetone-d_6): δ = 31.5, 35.7, 120.1, 121.5, 122.1, 122.3, 123.4, 123.6, 124.4, 125.8, 126.0, 127.9, 128.7, 129.0, 129.0, 129.6, 129.7, 130.1, 132.9, 133.7, 136.0, 139.2, 140.2, 142.8, 144.3, 165.7, 167.4, 173.8 ppm. **ESI-MS**: m/z = 521.04 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[4-Chloro-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 62%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.59 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.91 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.10 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.24 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.31 – 7.43 (m, 2H), 7.53 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 7.64 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.01 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 30.9, 35.8, 60.7, 118.6, 120.5, 125.0, 125.4, 129.4, 129.9, 131.2, 133.9, 136.8, 137.4, 141.9, 147.0, 163.5, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 399.09 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-4-chlorobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D2 with iron turnings. Yield: 92%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.12 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.34 (br s, 2H), 6.64 (dd, ^3J = 8.4 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 6.70 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 6.98 (d, ^3J = 7.4 Hz, 1H), 7.25 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 7.33 – 7.45 (m, 3H), 7.82 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 60.6, 114.8, 117.0, 117.1, 118.7, 120.7, 124.7, 128.6, 129.3, 137.9, 138.6, 141.8, 149.9, 167.0, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 345.14 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-chlorobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 56%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.59 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H),

4.02 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.28 (dd, ^3J = 8.4, 7.7 Hz, 1H), 7.38 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.54 – 7.61 (m, 2H), 7.61 – 7.70 (m, 2H), 7.94 – 8.05 (m, 3H), 8.06 – 8.13 (m, 2H), 8.54 (d, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 8.62 (d, ^4J = 2.2 Hz, 1H), 10.58 (s, 1H), 11.98 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 119.0, 120.8, 121.0, 121.5, 121.6, 123.5, 124.3, 127.1, 127.7, 128.0, 128.1, 128.6, 128.6, 129.1, 130.7, 132.2, 132.9, 134.5, 136.5, 138.4, 141.0, 141.0, 162.1, 166.4, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 523.17 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-chlorobenzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 82%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.03 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.29 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.40 (dd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 2.2 Hz, 1H), 7.54 – 7.61 (m, 2H), 7.63 (ddd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.67 (ddd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.96 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 7.99 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.10 (dd, ^3J = 8.5, 8.5 Hz, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.63 (d, ^4J = 2.1 Hz, 1H), 10.58 (s, 1H), 12.00 (s, 1H), 12.15 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 119.0, 120.7, 121.0, 121.4, 123.0, 123.4, 124.4, 127.2, 127.7, 128.1, 128.3, 128.7, 128.7, 129.1, 130.8, 131.5, 132.2, 134.5, 136.6, 138.3, 140.1, 141.4, 165.0, 166.5, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 471.01 $[M-H]^-$.

4-(tert-Butyl)-1-methyl-2-nitrobenzene: Preparation according to general procedure I. Yield: 52%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.34 (s, 9H), 2.56 (s, 3H), 7.26 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 7.52 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 7.97 (d, ^4J = 2.0 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 20.1, 31.2, 34.8, 121.6, 130.4, 130.7, 132.6, 149.2, 150.8 ppm. **ESI-MS:** not detectable.

4-(tert-Butyl)-2-nitrobenzoic acid: Preparation according to general procedure J. Yield: 18%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.32 (s, 9H), 7.79 – 7.82 (m, 2H), 7.90 (dd, ^4J = 1.3, 0.9 Hz, 1H), 13.71 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 30.5, 35.2, 120.4, 123.8, 129.5, 130.0, 149.1, 156.3, 165.5 ppm. **ESI-MS:** not detectable.

Ethyl 3-(3-[4-{tert-Butyl}-2-nitrobenzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 75%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.37 (s, 9H), 2.61 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.11 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.37 – 7.49 (m, 2H), 7.54 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 7.70 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 8.07 (d, ^4J = 1.5 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 31.1, 35.4, 35.9, 60.7, 118.4, 120.4, 121.8, 125.1, 128.5, 129.4, 130.2, 131.0, 137.8, 141.9, 146.6, 155.3, 164.7, 173.1 ppm. **ESI-MS:** m/z = 421.16 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-Amino-4-{tert-butyl}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 69%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.2 Hz, 3H), 1.30 (s, 9H), 2.63 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.40 (br s, 2H), 6.75 (d, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 6.77 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 6.98 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.38 – 7.43 (m, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.78 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.1, 31.1, 34.9, 36.0, 60.6, 113.9, 114.9, 115.1, 118.5, 120.5, 124.5, 127.1, 129.3, 138.2, 141.8, 148.5, 156.7, 167.5, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 391.22 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-{tert-butyl}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 97%. White solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.36 (s, 9H), 2.60 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.34 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.70 (m, 4H), 7.88 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H), 7.95 – 8.04 (m, 2H), 8.05 – 8.14 (m, 2H), 8.55 (d, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 8.62 (d, ^4J = 1.9 Hz, 1H), 10.42 (s, 1H), 11.87 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 30.8, 34.9, 35.0, 59.8, 118.3, 118.9, 120.4, 120.8, 123.4, 124.1, 125.1, 127.0, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.6, 128.8, 129.0, 132.0, 132.2, 134.4, 138.6, 138.6, 141.0, 155.2, 164.8, 167.3, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 545.28 $[M+Na]^+$.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-{tert-butyl}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 73%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.36 (s, 9H), 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 8.6, 7.8 Hz, 1H), 7.34 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H), 7.55 – 7.61 (m, 2H), 7.61 – 7.69 (m, 2H), 7.89 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.98 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.09 (dd, ^3J = 8.2, 8.2 Hz, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.62 (d, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 10.44 (s, 1H), 11.89 (s, 1H), 12.17 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 30.9, 34.9, 35.2, 118.3, 118.8, 120.4, 120.5, 120.8, 123.5, 124.1, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.6, 128.8, 129.1, 132.0, 132.2, 134.4, 138.6, 138.7, 141.4, 155.3, 164.8, 167.3, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 493.14 $[M-H]^-$.

6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxole-5-carboxylic acid: Preparation according to general procedure I. Yield: 76%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 6.28 (s, 2H), 7.30 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 13.63 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 103.9, 104.6, 108.2, 123.5, 143.1, 149.5, 150.8, 165.7 ppm. **ESI-MS:** m/z = 210.16 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[6-Nitrobenzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 59%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ

= 1.23 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.93 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.12 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.17 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 7.00 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.34 – 7.46 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.63 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 60.6, 103.8, 105.4, 107.8, 118.5, 120.5, 125.2, 129.4, 129.4, 137.6, 140.7, 142.0, 149.0, 152.4, 164.2, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 409.07 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[6-Aminobenzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 75%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.24 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.63 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 2.95 (t, ^3J = 7.8 Hz, 2H), 4.13 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.53 (br s, 2H), 5.91 (s, 2H), 6.23 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.96 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.34 – 7.39 (m, 1H), 7.40 – 7.43 (m, 1H), 7.62 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.4, 31.1, 36.0, 60.6, 98.5, 101.4, 105.7, 107.6, 118.6, 120.5, 124.4, 129.2, 138.3, 139.8, 141.8, 146.9, 151.7, 167.3, 173.0 ppm. **ESI-MS**: m/z = 379.11 $[M+Na]^+$.

Ethyl 3-(3-[6-{2-Naphthamido}benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamido]phenyl)-propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 84%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.02 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.18 (s, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.6, Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, 1H), 7.52 – 7.57 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.62 (ddd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.65 (ddd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.96 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 8.01 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.06 – 8.11 (m, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.53 (d, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 10.28 (s, 1H), 12.26 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 59.9, 102.2, 102.2, 108.1, 114.8, 119.2, 121.1, 123.3, 124.2, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.6, 129.1, 131.8, 132.2, 134.4, 135.6, 138.5, 141.0, 142.8, 150.1, 164.6, 167.0, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 509.20 $[M-H]^-$.

3-(3-[6-{2-Naphthamido}benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 87%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 6.18 (s, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.5, Hz, 1H), 7.28 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.52 – 7.69 (m, 5H), 7.96 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.01 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.06 – 8.12 (m, 2H), 8.20 (s, 1H), 8.53 (s, 1H), 10.29 (s, 1H), 12.15 (br s, 1H), 12.29 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 102.2, 102.2, 108.1, 114.7, 119.1, 121.2, 123.3, 124.2, 127.1, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.7, 129.1, 131.8, 132.2, 134.4, 135.7, 138.4, 141.4, 142.8, 150.1, 164.5, 167.0, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 481.06 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(2-Thienyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 90%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.19 (dd, ^3J = 5.0, 3.7 Hz, 1H), 7.26 – 7.32 (m, 2H), 7.56 (s, 1H), 7.58 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.62 (ddd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.65 (dd, ^3J = 5.1 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.68 (dd, ^3J = 3.6 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.86 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H), 7.93 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.95 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 8.49 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.74 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 59.9, 119.1, 121.0, 121.3, 122.9, 123.3, 124.3, 125.2, 125.6, 127.2, 128.0, 128.6, 128.8, 129.0, 132.3, 133.0, 137.1, 138.5, 138.7, 141.0, 142.0, 164.0, 167.4, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 497.18 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{4-(2-Thienyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 39%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 7.03 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.19 (dd, ^3J = 4.9, 3.8 Hz, 1H), 7.26 – 7.32 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.58 – 7.66 (m, 3H), 7.68 (d, ^3J = 3.5 Hz, 1H), 7.87 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H), 7.91 – 7.99 (m, 3H), 8.50 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.51 (s, 1H), 11.76 (s, 1H), 12.15 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 119.1, 121.1, 121.3, 122.8, 123.3, 124.3, 125.3, 125.6, 127.2, 128.0, 128.6, 128.8, 129.0, 132.3, 133.0, 137.1, 138.5, 138.7, 141.4, 142.1, 164.0, 167.4, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 469.06 $[M-H]^-$.

4-(2-Furyl)benzoic acid: Preparation according to general procedure L. Yield: 81%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.65 (dd, ^3J = 3.4, 1.8 Hz, 1H), 7.13 (dd, ^3J = 3.4 Hz, ^4J = 0.6 Hz, 1H), 7.78 – 7.86 (m, 3H), 7.90 (ddd, ^3J = 8.5 Hz, ^4J = 1.8, 1.8 Hz, 2H), 12.92 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 108.2, 112.4, 123.2, 129.2, 130.0, 134.0, 144.1, 152.1, 166.9 ppm. **ESI-MS**: m/z = 187.04 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(2-Furyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 48%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.65 (dd, ^3J = 3.4, 1.8 Hz, 1H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (dd, ^3J = 3.4 Hz, ^4J = 0.6 Hz, 1H), 7.24 – 7.34 (m, 2H), 7.54 – 7.66 (m, 3H), 7.83 (dd, ^3J = 1.7 Hz, ^4J = 0.6 Hz, 1H), 7.88 (d, ^3J = 8.6 Hz, 2H), 7.93 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.97 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H), 8.48 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 10.49 (s, 1H), 11.72 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 59.8, 108.0, 112.4, 119.1, 121.0, 121.4, 122.9, 123.3, 123.6, 124.2, 127.8, 128.6, 129.0, 132.2, 132.8, 133.3, 138.5, 138.6, 141.0, 144.0, 152.0, 164.1, 167.4, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 481.18 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{4-(2-Furyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 91%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 6.66 (dd, ^3J = 3.3, 1.8 Hz, 1H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.14 (d, ^3J = 3.3 Hz, 1H), 7.25 – 7.34 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.59 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.62 (ddd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.84 (dd, ^3J = 1.2 Hz, 1H), 7.89 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H), 7.93 (d, ^3J = 7.2 Hz, 1H), 7.97 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 8.48 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.51 (s, 1H), 11.73 (s, 1H), 12.15 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 108.1, 112.5, 119.0, 121.0, 121.3, 122.9, 123.3, 123.6, 124.2, 127.8, 128.6, 129.0, 132.3, 132.8, 133.4, 138.5, 138.7, 141.4, 144.0, 152.1, 164.1, 167.4, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 453.16 $[M-H]^-$.

4-(3-Furyl)benzoic acid: Preparation according to general procedure L. Yield: 86%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.04 (d, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 7.74 (d, ^4J = 8.3 Hz, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.94 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 8.32 (s, 1H), 12.88 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 108.7, 125.1, 125.5, 129.0, 129.9, 136.4, 140.7, 144.7, 167.1 ppm.

3-(3-[2-{4-(3-Furyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 65%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.05 (dd, ^3J = 1.9 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 7.25 – 7.33 (m, 2H), 7.49 – 7.69 (m, 3H), 7.79 (dd, ^4J = 1.7, 1.7 Hz, 1H), 7.82 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 7.93 (d, ^3J = 8.5 Hz, 3H), 8.33 (dd, ^3J = 1.4 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.50 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 10.49 (s, 1H), 11.73 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 108.6, 119.1, 121.0, 121.2, 122.7, 123.2, 124.2, 125.0, 125.8, 127.6, 128.6, 129.0, 132.2, 132.6, 135.6, 138.4, 138.7, 140.6, 141.0, 144.6, 164.2, 167.4, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{4-(3-Furyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.03 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.06 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.29 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.58 – 7.66 (m, 2H), 7.79 (dd, ^4J = 1.6, 1.6 Hz, 1H), 7.83 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 7.94 (d, ^3J = 8.4 Hz, 3H), 8.33 (s, 1H), 8.51 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.51 (s, 1H), 11.76 (s, 1H), 12.15 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 108.7, 119.0, 121.0, 121.2, 122.7, 123.2, 124.3, 125.0, 125.8, 127.7, 128.6, 129.0, 132.3, 132.6, 135.7, 138.5, 138.8, 140.6, 141.4, 144.7, 164.2, 167.5, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 453.08 $[M-H]^-$.

4-(3-Thienyl)benzoic acid: Preparation according to general procedure L. Yield: 90%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.64 (dd, ^3J = 5.1 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.69 (dd, ^3J = 5.0 Hz, ^4J = 2.9 Hz, 1H), 7.85 (ddd, ^3J = 8.7 Hz, ^4J = 1.8, 1.8 Hz, 2H), 7.97 (ddd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8, 1.8 Hz, 2H), 8.05 (dd, ^4J = 2.9, 1.4 Hz, 1H), 12.91 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 122.8, 126.0, 126.2, 127.5, 129.1, 130.0, 139.1, 140.3, 167.1 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(3-thienyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 44%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.24 – 7.36 (m, 2H), 7.52 – 7.73 (m, 5H), 7.89 – 8.00 (m, 5H), 8.06 (dd, ^3J = 2.8 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 8.51 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 0.8 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.74 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 119.1, 121.0, 121.2, 122.7, 122.7, 123.2, 124.2, 126.2, 126.3, 127.5, 127.7, 128.6, 129.0, 132.2, 132.7, 138.4, 138.4, 138.7, 140.3, 141.0, 164.2, 167.4, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{4-(3-Thienyl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.26 – 7.33 (m, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.57 – 7.65 (m, 2H), 7.65 – 7.71 (m, 2H), 7.91 – 7.99 (m, 5H), 8.06 (dd, ^3J = 2.8 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 8.51 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 10.52 (s, 1H), 11.77 (s, 1H), 11.89 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.2, 119.1, 121.1, 121.2, 122.7, 122.8, 123.2, 124.3, 126.2, 126.4, 127.5, 127.7, 128.6, 129.1, 132.3, 132.7, 138.4, 138.4, 138.8, 140.3, 141.5, 164.2, 167.5, 173.8 ppm. **ESI-MS**: m/z = 469.04 $[M-H]^-$.

4-Chloro-2H-chromene-3-carboxaldehyde: Preparation according to general procedure M. Yield: 97%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.00 (s, 2H), 6.90 (ddd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.1 Hz, ^5J = 0.3 Hz, 1H), 7.05 (ddd, ^3J = 7.8, 7.4 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 7.37 (ddd, ^3J = 8.2, 7.4 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.69 (dd, ^3J = 7.9, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 10.16 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 64.5, 116.8, 120.7, 122.3, 125.0, 126.7, 134.2, 143.4, 156.8, 187.9 ppm.

4-Chloro-2H-chromene-3-carboxylic acid: Preparation according to general procedure N. Yield: 45%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 4.97 (s, 2H), 6.96 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.10 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 7.38 (ddd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 7.63 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 13.39 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 66.2, 116.1, 120.9, 121.2, 122.3, 126.4, 132.5, 132.6, 155.0, 164.1 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{4-chloro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 38%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.84 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.96 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 0.7 Hz, 1H), 6.99 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.8. 7.8 Hz, 1H), 7.31 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.37 (ddd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.53 – 7.63 (m, 4H), 7.83 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 10.46 (s, 1H), 11.13 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.4, 35.0, 59.9, 66.6, 116.1, 118.7, 120.5, 120.6, 122.0, 122.3, 124.0, 124.1, 124.6, 125.8, 125.8, 125.9, 128.6, 128.9, 131.8, 132.2, 136.9, 138.6, 141.0, 154.5, 161.9, 166.7, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{4-Chloro-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 54%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.53 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.81 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 6.96 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 0.6 Hz, 1H), 7.00 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.10 (ddd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.31 (dd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.37 (ddd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.52 – 7.63 (m, 4H), 7.84 (d, ^3J = 7.1 Hz, 1H), 8.27 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 10.47 (s, 1H), 11.13 (s, 1H), 12.10 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 66.6, 116.1, 118.6, 120.5, 120.6, 122.0, 122.4, 122.4, 124.0, 124.1, 125.8, 125.8, 125.9, 128.6, 128.9, 131.9, 132.2, 136.9, 138.6, 141.4, 154.5, 161.9, 166.7, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 475.00 $[M-H]^-$.

2-Nitro-4-(trifluoromethoxy)benzonitrile: Preparation according to general procedure O. Yield: 92%. Yellow liquid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.66 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.00 (d, ^3J = 8.6 Hz, 1H), 8.18 (s, 1H). **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 106.3, 114.0, 117.9, 120.2, 125.6, 137.3, 152.3, 152.3 ppm.

2-Nitro-4-(trifluoromethoxy)benzoic acid: Preparation according to general procedure P. Yield: 45%. Cream solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6) δ = 7.74 (m, 1H), 7.96 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.02 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H). **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6) δ = 116.4, 119.8, 124.5, 128.1, 132.3, 149.0, 149.5, 164.8 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-nitro-4-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 61%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.22 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.60 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.92 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.10 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.22 – 7.30 (m, 1H), 7.38 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.54 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.67 (d, ^3J = 8.4 Hz, 1H), 7.91 (m, 2H) ppm. **^{13}C-**

NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.8, 60.7, 117.4, 118.6, 120.3, 120.5, 125.5, 125.9, 129.4, 130.5, 131.3, 137.4, 142.0, 147.3, 150.0, 163.3, 173.0 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-amino-4-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 90%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.17 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.56 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.88 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 4.06 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.84 (s, 2H), 6.46 – 6.54 (m, 2H), 6.93 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.16 – 7.24 (m, 1H), 7.32 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.42 (d, ^3J = 9.1 Hz, 1H), 7.69 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 31.0, 35.9, 60.6, 108.8, 109.0, 116.9, 118.7, 120.7, 124.9, 129.2, 129.3, 129.3, 137.8, 141.9, 150.2, 152.5, 166.7, 173.0 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{2-naphthamido}-4-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 20%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.12 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.3 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.0 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.4 Hz, 1H), 7.21 – 7.38 (m, 2H), 7.51 – 7.74 (m, 4H), 7.96 (d, ^3J = 8.5 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.05 – 8.16 (m, 3H), 8.55 (d, ^3J = 8.9 Hz, 2H), 10.60 (s, 1H), 11.98 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 30.3, 35.0, 59.9, 112.9, 115.0, 119.0, 120.0, 120.9, 121.8, 123.4, 124.4, 127.1, 127.7, 128.1, 128.3, 128.7, 128.7, 129.1, 131.3, 131.4, 132.2, 134.5, 138.4, 140.5, 141.1, 150.4, 165.1, 166.3, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{2-Naphthamido}-4-{trifluoromethoxy}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 56%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 7.03 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.24 – 7.37 (m, 2H), 7.53 – 7.72 (m, 4H), 7.96 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 8.05 – 8.16 (m, 3H), 8.52 – 8.61 (m, 2H), 10.62 (s, 1H), 12.01 (m, 2H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.2, 112.8, 115.0, 119.0, 120.1, 121.0, 121.7, 123.4, 124.4, 127.2, 127.8, 128.1, 128.3, 128.7, 128.7, 129.1, 131.3, 131.4, 132.2, 134.6, 138.4, 140.5, 141.5, 150.4, 165.1, 166.3, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 520.99 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-nitrophenoxyacetate: Preparation according to general procedure Q. Yield: 98%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.31 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 4.29 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.70 (s, 2H), 7.26 (ddd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 2.6, 0.9 Hz, 1H), 7.46 (dd, ^3J = 8.2, 8.2 Hz, 1H), 7.72 (dd, ^4J = 2.3, 2.3 Hz, 1H), 7.87 (ddd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.1, 0.9 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 61.9, 65.7, 109.2, 116.9, 121.9, 130.3, 149.3, 158.5, 168.1 ppm.

Ethyl 3-aminophenoxyacetate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 86%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.29 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.24 (br s, 2H), 4.26

(q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.57 (s, 2H), 6.29 – 6.39 (m, 3H), 7.02 – 7.10 (m, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 61.5, 65.6, 102.5, 104.8, 109.4, 130.4, 147.4, 159.2, 169.2 ppm.

Ethyl 3-(2-nitrobenzamido)phenoxyacetate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 66%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.28 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 4.24 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.59 (s, 2H), 6.70 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 7.10 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.22 (dd, ^3J = 8.2, 8.2 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.54 – 7.63 (m, 2H), 7.67 (d, ^3J = 6.9 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 8.06 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 61.6, 65.6, 107.1, 111.5, 113.7, 124.7, 128.8, 130.1, 130.9, 132.9, 134.0, 138.9, 146.4, 158.4, 164.6, 169.0 ppm.

Ethyl 3-(2-aminobenzamido)phenoxyacetate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 78%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.30 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 4.28 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.63 (s, 2H), 6.69 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 2.5 Hz, 1H), 6.72 – 6.79 (m, 2H), 7.11 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.21 – 7.29 (m, 2H), 7.36 (dd, ^4J = 2.2, 2.2 Hz, 1H), 7.47 (d, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 61.6, 65.6, 107.2, 110.9, 113.8, 117.0, 117.7, 118.2, 127.4, 130.0, 133.0, 139.3, 148.0, 158.5, 167.5, 169.1 ppm.

Ethyl 3-(2-[2-naphthamido]benzamido)phenoxyacetate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 65%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO): δ = 1.17 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 4.14 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.75 (s, 2H), 6.70 (dd, ^3J = 8.2 Hz, ^4J = 1.9 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 8.2, 8.2 Hz, 1H), 7.32 (ddd, ^3J = 7.7, 7.7 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.37 (d, ^3J = 8.1 Hz, 1H), 7.42 (dd, ^4J = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.59 – 7.70 (m, 3H), 7.91 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 7.97 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.10 (d, ^3J = 8.7 Hz, 2H), 8.45 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 11.68 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO): δ = 14.0, 60.6, 64.7, 107.4, 109.9, 113.8, 121.8, 123.5, 123.5, 123.7, 127.1, 127.7, 127.9, 128.1, 128.6, 129.0, 129.1, 129.5, 131.9, 132.2, 132.2, 134.4, 138.4, 139.8, 157.8, 164.8, 167.4, 168.7 ppm.

3-(2-[2-Naphthamido]benzamido)phenoxyacetic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 98%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO): δ = 4.67 (s, 2H), 6.70 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.0 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 8.4, 8.4 Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.43 (m, 2H), 7.57 – 7.70 (m, 3H), 7.92 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.98 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 8.01 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.06 – 8.14 (m, 2H), 8.47 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 10.55 (s, 1H), 11.71 (s, 1H), 13.01 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO): δ = 64.5, 107.3, 109.9, 113.6, 121.7, 123.4, 123.5, 123.6, 127.1, 127.7, 127.9,

128.1, 128.6, 129.0, 129.1, 129.5, 131.9, 132.2, 132.2, 134.4, 138.5, 139.8, 157.9, 164.8, 167.4, 170.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 438.93 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{8-hydroxy-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure H. Yield: 19%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.97 (d, ^4J = 1.2 Hz, 2H), 6.72 – 6.86 (m, 3H), 7.01 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.21 – 7.36 (m, 3H), 7.52 – 7.63 (m, 3H), 7.89 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 8.31 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 11.32 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d6): δ = 14.1, 30.4, 35.0, 59.9, 64.1, 118.8, 118.9, 119.2, 120.9, 121.5, 121.7, 121.8, 123.1, 123.3, 124.2, 127.0, 128.4, 128.6, 128.9, 132.1, 138.2, 138.5, 141.0, 142.0, 145.3, 162.7, 167.2, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{8-Hydroxy-2H-chromene-3-carboxamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 85%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d6): δ = 2.53 (t, ^3J = 7.7 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.96 (s, 2H), 6.72 – 6.87 (m, 3H), 7.01 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.21 – 7.30 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.48 – 7.65 (m, 3H), 7.90 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 8.31 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 10.48 (s, 1H), 11.34 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d6): δ = 30.6, 35.5, 64.1, 118.8, 118.8, 119.2, 120.9, 121.5, 121.8, 121.8, 123.1, 123.3, 124.2, 127.0, 128.5, 128.6, 129.0, 132.1, 138.3, 138.5, 141.6, 142.0, 145.3, 162.8, 167.2, 173.9 ppm. **ESI-MS**: m/z = 457.16 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-aminophenylglycinate: Preparation according to general procedure Q. Yield: 75%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.30 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.73 (br s, 3H), 3.86 (s, 2H), 4.24 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.94 (dd, ^4J = 2.2, 2.2 Hz, 1H), 6.05 (ddd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 2.2, 0.7 Hz, 1H), 6.11 (ddd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.1, 0.7 Hz, 1H), 6.97 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 45.9, 61.3, 99.9, 104.0, 105.8, 130.2, 147.6, 148.3, 171.3 ppm.

Ethyl (3-[2-nitrobenzamido]phenyl)glycinate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 93%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.30 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.93 (s, 2H), 4.24 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.47 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 6.83 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.12 – 7.21 (m, 2H), 7.57 (br s, 1H), 7.59 – 7.66 (m, 2H), 7.72 (d, ^3J = 7.4 Hz, 1H), 8.11 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 46.2, 61.7, 105.6, 110.3, 110.6, 124.9, 128.7, 130.1, 130.9, 133.1, 134.0, 138.6, 146.5, 147.4, 164.4, 170.8 ppm.

Ethyl (3-[2-aminobenzamido]phenyl)glycinate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 80%. Yellow oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.26 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.83 (s, 2H), 4.19 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 4.99 (s, 3H), 6.32 (ddd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.2, 0.7 Hz, 1H),

6.57 – 6.69 (m, 2H), 6.82 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.2 Hz, 1H), 6.95 (dd, ^4J = 2.1, 2.1 Hz, 1H), 7.09 (dd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.18 (dd, ^3J = 8.4, 7.2 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 7.41 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.1, 45.7, 61.3, 105.4, 108.9, 110.3, 116.6, 116.7, 117.3, 127.4, 129.6, 132.4, 139.0, 147.7, 148.7, 167.6, 171.2 ppm.

Ethyl (3-[2-aminobenzamido]phenyl)glycinate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 42%. Beige solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.15 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 3.86 (d, ^3J = 6.4 Hz, 2H), 4.08 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.13 (dd, ^3J = 6.4, 6.4 Hz, 1H), 6.34 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 6.90 – 7.12 (m, 3H), 7.30 (dd, ^3J = 7.1, 7.1 Hz, 1H), 7.57 – 7.71 (m, 3H), 7.92 (d, ^3J = 6.8 Hz, 1H), 7.95 – 8.05 (m, 2H), 8.10 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 8.47 – 8.58 (m, 2H), 10.34 (s, 1H), 11.87 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.1, 44.7, 60.2, 105.0, 108.4, 109.6, 121.4, 123.2, 123.3, 123.4, 127.0, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.9, 129.0, 129.1, 131.9, 132.1, 132.2, 134.4, 138.6, 139.2, 148.5, 164.7, 167.2, 171.2 ppm.

(3-[2-{2-Naphthamido}benzamido]phenyl)glycine: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 3.79 (s, 2H), 6.35 (dd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 6.99 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.06 (dd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.30 (ddd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 7.59 – 7.70 (m, 3H), 7.92 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.98 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.11 (d, ^3J = 8.3 Hz, 2H), 8.53 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 11.89 (s, 1H), 12.38 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 44.6, 104.9, 108.5, 109.4, 121.4, 123.2, 123.3, 123.4, 127.1, 127.7, 127.9, 128.1, 128.7, 128.9, 129.0, 129.2, 131.9, 132.1, 132.2, 134.4, 138.7, 139.2, 148.6, 164.7, 167.3, 172.6 ppm. **ESI-MS**: m/z = 438.21 $[M-H]^-$.

Ethyl 2-(3-aminophenyl)-2-methylpropionate: Preparation according to general procedure Q. Yield: 50%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.19 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.54 (s, 6H), 3.98 (br s, 3H), 4.17 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.99 (dd, ^4J = 2.2, 2.2 Hz, 1H), 6.05 (ddd, ^3J = 8.0 Hz, ^4J = 2.2, 0.7 Hz, 1H), 6.15 (ddd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 2.1, 0.7 Hz, 1H), 6.93 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.3, 26.4, 57.7, 61.4, 102.9, 106.6, 107.1, 130.0, 146.4, 146.7, 176.3 ppm.

Ethyl 2-methyl-2-([3-{2-nitrobenzamido}phenyl]amino)propionate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 54%. Brown oil. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.18 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.51 (s, 6H), 4.14 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.30 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 6.74 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 6.95 – 7.11 (m, 2H), 7.50 (dd, ^3J = 7.0, 7.0 Hz, 2H), 7.60 (dd, ^3J = 7.1, 7.1 Hz, 1H), 7.92 – 8.03 (m, 1H), 8.07 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ

= 14.2, 26.2, 57.6, 61.5, 107.7, 110.3, 111.5, 124.6, 128.7, 129.5, 130.6, 133.0, 133.9, 138.4, 146.2, 146.3, 164.5, 176.1 ppm.

Ethyl 2-([3-{2-aminobenzamido}phenyl]amino)-2-methylpropionate: Preparation according to general procedure D1. Yield: 64%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.20 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.56 (s, 6H), 4.18 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 5.01 (br s, 3H), 6.36 (ddd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 2.3, 0.8 Hz, 1H), 6.64 – 6.73 (m, 2H), 6.82 (ddd,^3J = 8.0 Hz, ^4J = 1.9, 0.7 Hz, 1H), 7.04 – 7.14 (m, 2H), 7.18 – 7.26 (m, 1H), 7.43 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.2, 26.2, 57.8, 61.5, 107.9, 110.7, 111.4, 116.8, 116.9, 117.6, 127.3, 129.5, 132.7, 138.8, 146.1, 148.9, 167.6, 176.0 ppm.

Ethyl 2-([3-{2-(2-naphthamido)benzamido}phenyl]amino)-2-methylpropionate: Preparation according to general procedure C2. Yield: 45%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.03 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 1.48 (s, 6H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.00 (s, 1H), 6.28 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.5 Hz, 1H), 6.86 (d,^3J = 8.0 Hz, 1H), 6.96 – 7.13 (m, 2H), 7.30 (dd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, 1H), 7.57 – 7.75 (m, 3H), 7.92 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.96 – 8.06 (m, 2H), 8.06 – 8.19 (m, 2H), 8.50 – 8.61 (m, 2H), 10.35 (s, 1H), 11.94 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 13.9, 25.9, 56.3, 60.4, 106.2, 109.3, 110.2, 121.3, 122.9, 123.3, 123.3, 127.0, 127.7, 127.8, 128.1, 128.6, 128.6, 129.0, 129.1, 131.8, 132.1, 132.2, 134.4, 138.7, 138.9, 146.8, 164.6, 167.2, 175.6 ppm.

2-([3-{2-(2-Naphthamido)benzamido}phenyl]amino)-2-methylpropionic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.47 (s, 6H), 6.31 (dd, ^3J = 8.1 Hz, ^4J = 1.6 Hz, 1H), 6.90 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 7.03 (dd, ^3J = 8.0, 8.0 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 7.30 (ddd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.60 – 7.69 (m, 3H), 7.92 (dd, ^3J = 7.8 Hz, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 7.99 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 8.02 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 8.07 – 8.15 (m, 2H), 8.53 – 8.59 (m, 2H), 10.39 (s, 1H), 11.98 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 25.9, 56.1, 106.5, 109.2, 110.1, 121.3, 122.9, 123.3, 123.4, 127.1, 127.7, 127.9, 128.2, 128.6, 128.7, 129.0, 129.2, 131.8, 132.2, 132.3, 134.5, 138.8, 138.9, 147.1, 164.6, 167.3, 177.4 ppm. **ESI-MS**: m/z = 466.24 $[M-H]^-$.

Methyl 4-(bromoacetyl)benzoate: Preparation according to general procedure R. Yield: 90%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 3.89 (s, 3H), 4.39 (s, 2H), 7.94 – 8.01 (m, 2H), 8.06 – 8.13 (m, 2H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.8, 52.7, 129.0, 130.2, 134.8, 137.3, 166.1, 191.0 ppm.

Methyl 4-(oxazol-4-yl)benzoate: Preparation according to general procedure S. Yield: 27%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.93 (s, 3H), 7.85 – 7.80 (m, 2H), 7.97 (d,

^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.04 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.06 – 8.12 (m, 2H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 52.3, 125.6, 129.8, 130.3, 135.1, 135.2, 139.8, 151.7, 166.9 ppm.

4-(Oxazol-4-yl)benzoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 99%. White solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.87 – 7.96 (m, 2H), 7.97 – 8.05 (m, 2H), 8.52 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.78 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 12.96 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 125.2, 129.9, 130.0, 134.9, 136.6, 138.4, 152.9, 167.0 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(oxazol-4-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 55%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.13 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.23 – 7.33 (m, 2H), 7.55 – 7.66 (m, 3H), 7.94 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.3 Hz, 1H), 7.99 (s, 4H), 8.45 – 8.55 (m, 2H), 8.75 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.76 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.4, 35.0, 59.9, 119.1, 121.0, 121.4, 122.9, 123.3, 124.2, 125.5, 127.7, 128.6, 129.0, 132.2, 133.7, 134.2, 136.5, 138.4, 138.5, 138.7, 141.0, 152.9, 164.2, 167.4, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{4-(Oxazol-4-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 68%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.24 – 7.34 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.57 – 7.66 (m, 2H), 7.93 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.99 (s, 4H), 8.47 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 8.53 (d, ^4J = 0.7 Hz, 1H), 8.77 (d, ^4J = 0.7 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.72 (s, 1H), 12.07 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 119.0, 121.0, 121.4, 123.0, 123.4, 124.2, 125.5, 127.8, 128.6, 129.0, 132.3, 133.7, 134.2, 136.5, 138.4, 138.5, 138.6, 141.4, 153.0, 164.2, 167.4, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 454.24 $[M-H]^-$.

N-Hydroxy-p-toluenesulfonamide: Preparation according to general procedure T. Yield: 42%. White solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.42 (s, 3H), 7.44 (dd, ^3J = 8.6 Hz, ^4J = 0.6 Hz, 2H), 7.70 – 7.78 (m, 2H), 9.49 (d, ^4J = 3.4 Hz, 1H), 9.55 (d, ^4J = 3.3 Hz, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 21.0, 128.1, 129.4, 134.5, 143.5 ppm.

4-([2E]-Propenal-3-yl)benzoic acid: Preparation according to general procedure U. Yield: 24%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 6.95 (dd, ^3J = 16.0, 7.7 Hz, 1H), 7.74 – 7.92 (m, 3H), 7.95 – 8.05 (m, 2H), 9.72 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 13.09 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 128.8, 129.8, 130.3, 132.6, 138.0, 151.5, 166.7, 194.5 ppm.

4-(Isoxazol-3-yl)benzoic acid: Preparation according to general procedure V. Yield: 20%. White solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 7.27 (d, ^4J = 1.8 Hz, 1H), 8.02 – 8.07 (m,

2H), 8.07 – 8.16 (m, 2H), 9.09 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 13.16 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 103.2, 126.9, 130.0, 132.1, 132.3, 160.3, 161.2, 166.8 ppm.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(isoxazol-3-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 41%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.13 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.36 (m, 2H), 7.52 – 7.68 (m, 3H), 7.93 (dd, ^3J = 7.9 Hz, ^4J = 1.4 Hz, 1H), 8.03 – 8.07 (m, 2H), 8.08 – 8.13 (m, 2H), 8.47 (dd, ^3J = 8.3 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 9.06 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 10.50 (s, 1H), 11.77 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 103.2, 119.1, 121.0, 121.5, 123.2, 123.5, 124.2, 127.2, 127.9, 128.6, 129.0, 131.6, 132.2, 135.8, 138.5, 138.5, 141.0, 160.3, 161.1, 164.0, 167.3, 172.1 ppm.

3-(3-[2-{4-(Isoxazol-3-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 95%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.55 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.25 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 7.26 – 7.35 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.57 – 7.67 (m, 2H), 7.94 (d, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 8.05 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 8.10 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 8.47 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 9.07 (d, ^4J = 1.7 Hz, 1H), 10.51 (s, 1H), 11.78 (s, 1H), 12.16 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 103.2, 119.0, 121.0, 121.5, 123.2, 123.5, 124.3, 127.2, 127.9, 128.6, 129.1, 131.6, 132.3, 135.8, 138.5, 138.5, 141.4, 160.3, 161.2, 164.0, 167.4, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 454.20 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(oxazol-5-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 77%. White solid**^{1}H-NMR** (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.14 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H). 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.86 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.22 – 7.36 (m, 2H), 7.54 – 7.67 (m, 3H), 7.86 (s, 1H), 7.92 (d, ^3J = 8.3 Hz, 3H), 8.02 (d, ^3J = 8.5 Hz, 2H), 8.45 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 8.53 (s, 1H), 10.49 (s, 1H), 11.72 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (75 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 119.0, 121.0, 121.5, 123.2, 123.4, 123.8, 124.2, 124.4, 128.0, 128.6, 129.0, 130.5, 132.2, 134.0, 138.5, 138.5, 141.0, 149.7, 152.6, 163.9, 167.3, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 482.26 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{4-(Oxazol-5-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 20%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.5 Hz, 1H), 7.26 – 7.34 (m, 2H), 7.55 (s, 1H), 7.59 (d, ^3J = 8.3 Hz, 1H), 7.63 (dd, ^3J = 7.9, 7.9 Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.93 (d, ^3J = 8.3 Hz, 3H), 8.02 (d, ^3J = 8.4 Hz, 2H), 8.46 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 8.54 (s, 1H),

10.51 (s, 1H), 11.74 (s, 1H), 12.21 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.1, 119.0, 121.0, 121.5, 123.1, 123.4, 123.9, 124.2, 124.4, 128.0, 128.6, 129.0, 130.5, 132.2, 134.0, 138.5, 138.5, 141.4, 149.7, 152.6, 163.9, 167.4, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 454.16 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{3-phenyl-2-propynamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 30%. Pale yellow solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.15 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.4 Hz, 2H), 4.04 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 6.99 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.26 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.32 (dd, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.48 (dd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, 2H), 7.51 – 7.67 (m, 6H), 7.79 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 8.03 (d, ^3J = 8.0 Hz, 1H), 10.44 (s, 1H), 11.15 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6) δ = 14.1, 30.4, 35.1, 59.9, 83.9, 84.7, 118.6, 119.3, 120.5, 122.7, 124.0, 124.4, 125.6, 128.6, 128.9, 129.0, 130.7, 131.7, 132.3, 136.4, 138.9, 141.0, 150.3, 166.5, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 439.31 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{3-Phenyl-2-propynamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 93%. Brown solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.82 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 7.00 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.27 (dd, ^3J = 7.8, 7.8 Hz, 1H), 7.32 (d, ^3J = 7.5, 7.5 Hz, 1H), 7.48 (dd, ^3J = 7.4, 7.4 Hz, 2H), 7.51 – 7.60 (m, 4H), 7.64 (d, ^3J = 7.2 Hz, 2H), 7.80 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 8.04 (d, ^3J = 7.9 Hz, 1H), 10.44 (s, 1H), 11.16 (s, 1H), 12.13 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6): δ = 30.4, 35.2, 83.9, 84.8, 118.5, 119.3, 120.5, 122.7, 124.0, 124.4, 125.6, 128.6, 128.9, 129.1, 130.7, 131.7, 132.4, 136.4, 138.9, 141.4, 150.3, 166.6, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 411.13 $[M-H]^-$.

Ethyl 3-(3-[2-{4-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoate: Preparation according to general procedure C1. Yield: 30%. Yellow solid. **^{1}H-NMR** (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 1.13 (t, ^3J = 7.1 Hz, 3H), 2.61 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 2.85 (t, ^3J = 7.5 Hz, 2H), 4.03 (q, ^3J = 7.1 Hz, 2H), 7.01 (d, ^3J = 7.7 Hz, 1H), 7.24 – 7.35 (m, 2H), 7.53 – 7.60 (m, 2H), 7.61 – 7.67 (m, 1H), 7.93 (dd, ^3J = 7.0 Hz, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 8.03 (d, ^4J = 1.1 Hz, 1H), 8.10 – 8.17 (m, 4H), 8.43 (d, ^3J = 8.2 Hz, 1H), 8.94 (d, ^4J = 0.9 Hz, 1H), 10.49 (s, 1H), 11.73 (s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 14.0, 30.3, 35.0, 59.8, 119.0, 120.2, 121.0, 121.6, 123.4, 123.5, 123.6, 124.2, 128.6, 128.9, 129.0, 132.2, 134.2, 134.7, 138.3, 138.5, 138.9, 141.0, 163.6, 167.3, 172.1 ppm. **ESI-MS**: m/z = 482.18 $[M-H]^-$.

3-(3-[2-{4-(1H-1,2,3-Triazol-1-yl)benzamido}benzamido]phenyl)propanoic acid: Preparation according to general procedure E. Yield: 93%. White solid. **^{1}H-NMR** (500 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.54 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 2.83 (t, ^3J = 7.6 Hz, 2H), 7.02 (d, ^3J = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (t, ^3J = 7.8 Hz, 1H), 7.32 (ddd, ^3J = 7.6, 7.6 Hz, ^4J = 1.0 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.59 (d, ^3J = 8.2 Hz,

1H), 7.61 – 7.67 (m, 1H), 7.94 (dd, ^{3}J = 7.7 Hz, ^{4}J = 1.0 Hz, 1H), 8.03 (d, ^{4}J = 1.1 Hz, 1H), 8.11 – 8.17 (m, 4H), 8.44 (d, ^{3}J = 8.2 Hz, 1H), 8.94 (d, ^{4}J = 1.1 Hz, 1H), 10.51 (s, 1H), 11.75 (s, 1H), 12.14 (br s, 1H) ppm. **^{13}C-NMR** (125 MHz, DMSO-d_6) δ = 30.4, 35.1, 119.0, 120.2, 121.0, 121.6, 123.4, 123.4, 123.6, 124.2, 128.6, 128.9, 129.1, 132.2, 134.2, 134.8, 138.4, 138.5, 139.0, 141.4, 163.6, 167.3, 173.7 ppm. **ESI-MS**: m/z = 454.17 $[M-H]^-$.

The features disclosed in the foregoing description, in the claims and/or in the accompanying drawings may, both separately and in any combination thereof, be material for realizing the invention in diverse forms thereof.

REFERENCES

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.

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.

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.

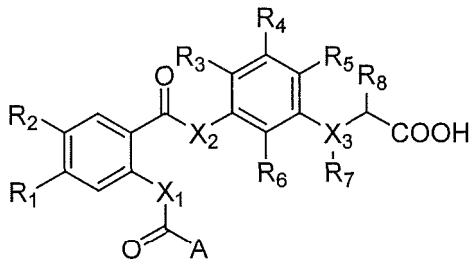
Rau, O.; Wurglics, M.; Paulke, A.; Zitzkowski, J.; Meindl, N.; Bock, A.; Dingermann, T.; Abdel-Tawab, M.; Schubert-Zsilavecz, M. Carnosic Acid and Carnosol, Phenolic Diterpene Compounds of the Labiate Herbs Rosemary and Sage, Are Activators of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Planta Med.* **2006**, *72* (10), 881–887.

Seuter, S.; Väisänen, S.; Rådmark, O.; Carlberg, C.; Steinhilber, D. Functional Characterization of Vitamin D Responding Regions in the Human 5-Lipoxygenase Gene. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771* (7), 864–872.

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.

Claims

1. A compound having the general formula I



I

wherein

$\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$ are each independently selected from CH_2 or NH,

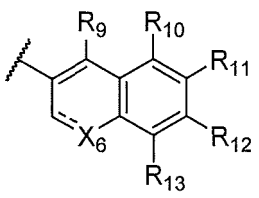
$\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), CF_3O, CF_3, OH, halogen, R_1 and R_2 can form a ring,

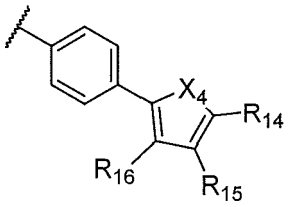
$\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

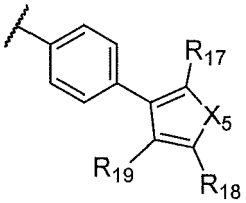
$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

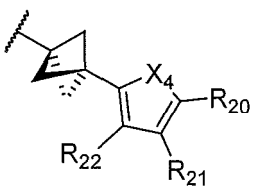
$\mathbf{X_3}$ is selected from CH, N or O,

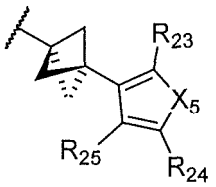
A is selected from

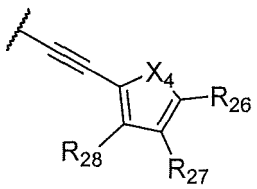


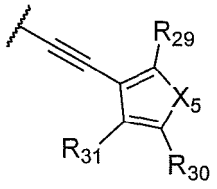












wherein

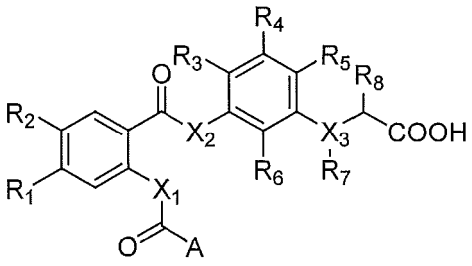
R_9 to **R_{31}** are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen,

X_4 and **X_5** are each independently selected from CH, O or S, and

X_6 is selected from CH, N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

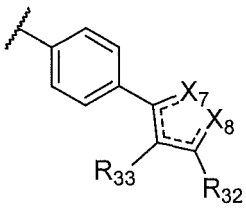
2. A compound having the general formula I

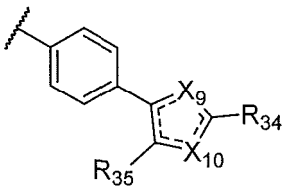


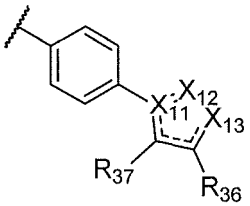
I

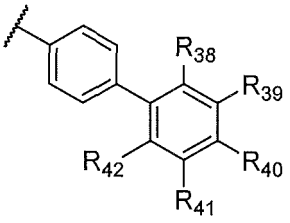
wherein **X_1** and **X_2**, **R_1** and **R_2**, **R_3** to **R_6**, **X_3** and **R_7** to **R_8** are as defined in claim 1, and

A is selected from

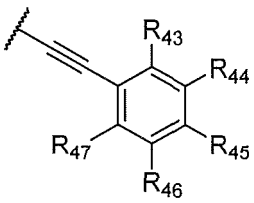








and



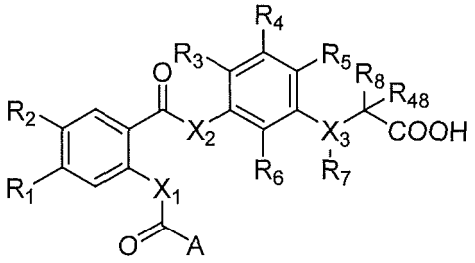
wherein

R_{32} to **R_{47}** are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_4 alkyl, alkoxy (preferably methoxy), halogen, and

X_7 to **X_{13}** are each independently selected from CH, N or O, preferably N or O,

or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

3. A compound having the general formula Ia



Ia

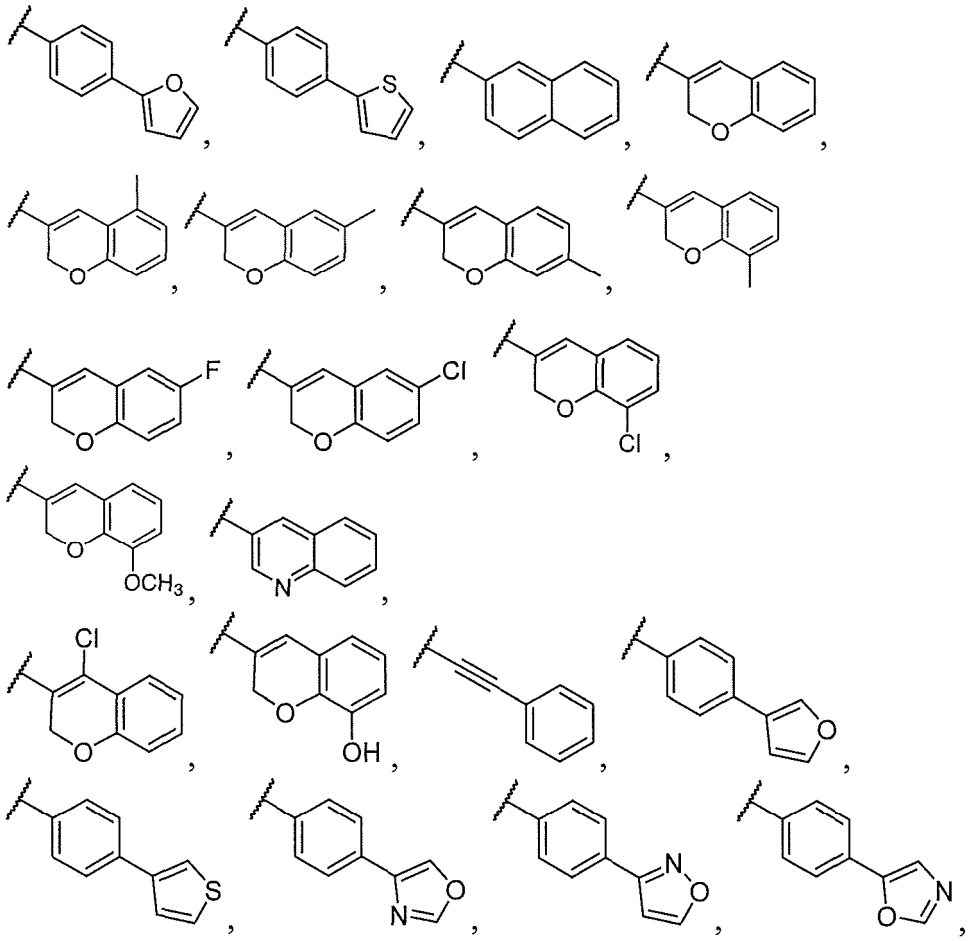
wherein $\mathbf{X_1}$ and $\mathbf{X_2}$, $\mathbf{R_1}$ and $\mathbf{R_2}$, $\mathbf{R_3}$ to $\mathbf{R_6}$, $\mathbf{X_3}$ and **A** are as defined in claim 1 or 2,

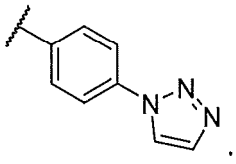
and

$\mathbf{R_7}$ and $\mathbf{R_8}$ and $\mathbf{R_{48}}$ are each independently selected from hydrogen, C_1 to C_3 alkyl, halogen,

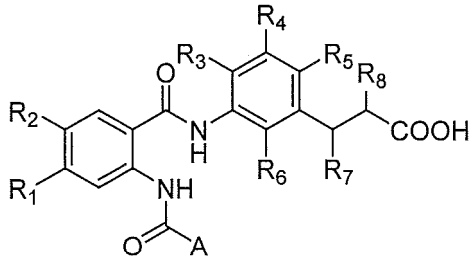
or a derivative or a pharmaceutically accepted salt thereof.

4. The compound of any one of claims 1 to 3, wherein **A** is selected from

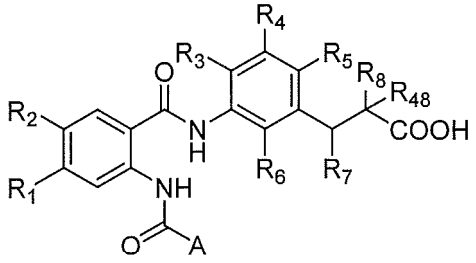


and  .

5. The compound of any one of claims 1 to 4, wherein X_1 and X_2 are each NH and X_3 is CH, having general formula II or IIa

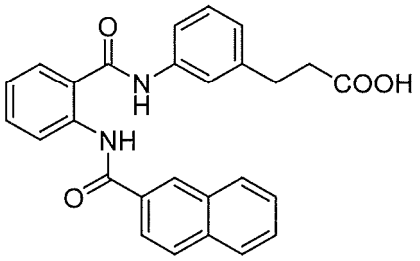


II

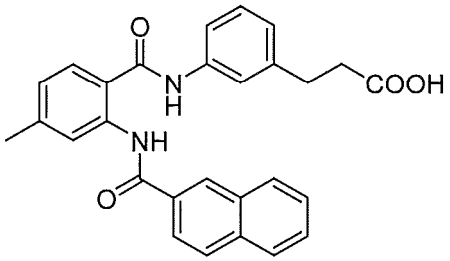


IIa

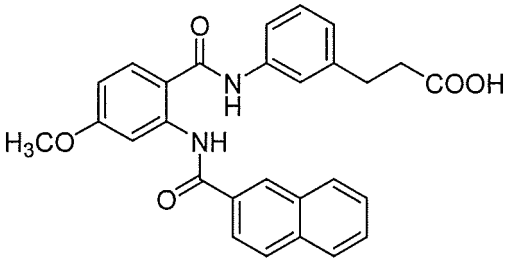
6. The compound of any one of claims 1 to 5 selected from



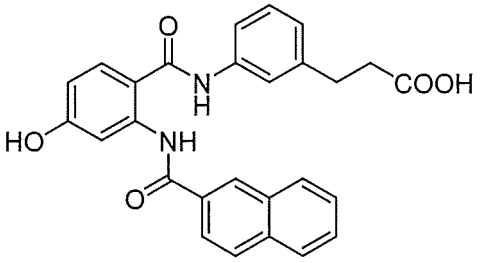
PH023 (1)



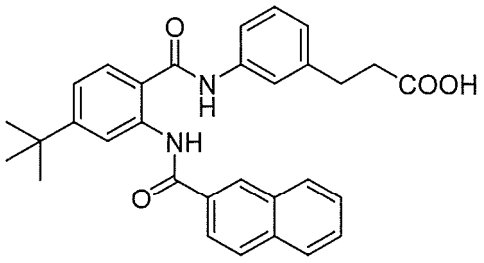
GF032 (2)



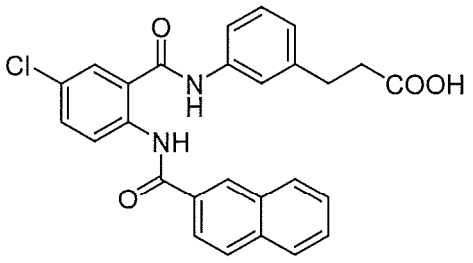
GF054 (5)



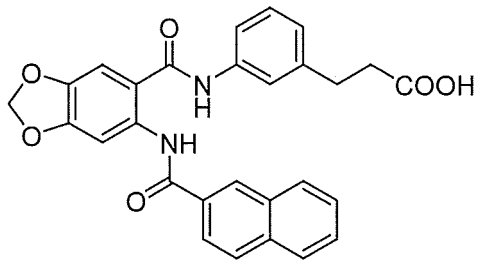
GF068 (6)



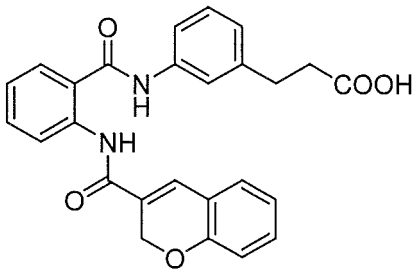
GF085 (7)



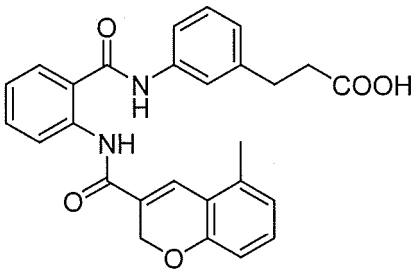
GF053 (8)



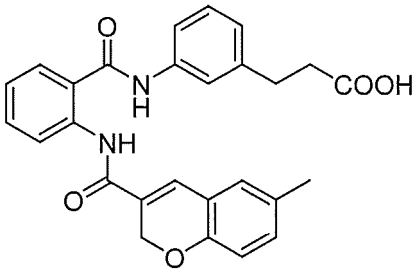
GF097 (12)



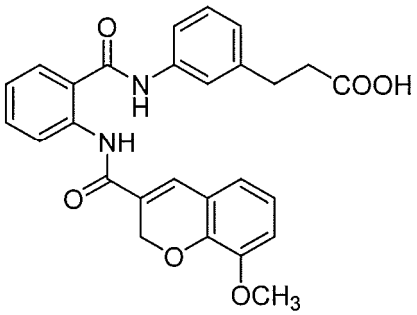
PH075 (13)



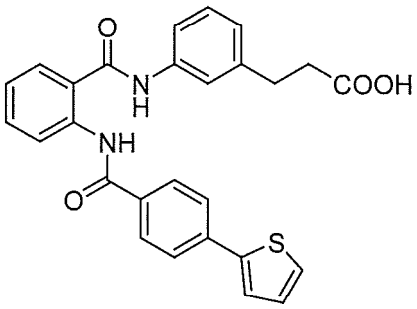
PH141 (14)



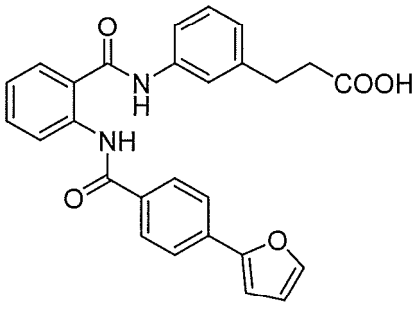
PH129 (15)



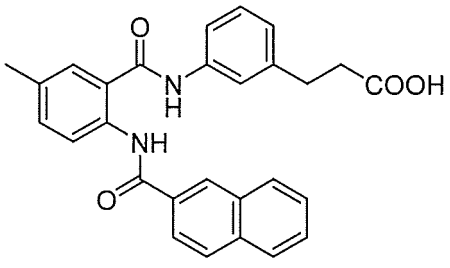
PH084 (21)



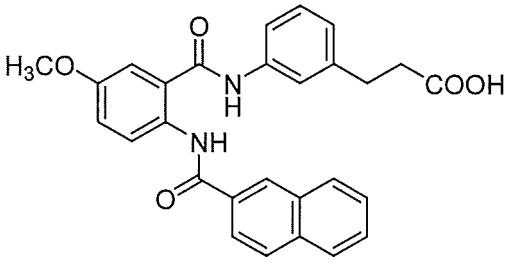
GF098 (24)



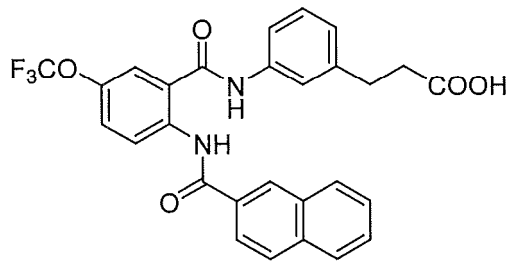
GF104 (23)



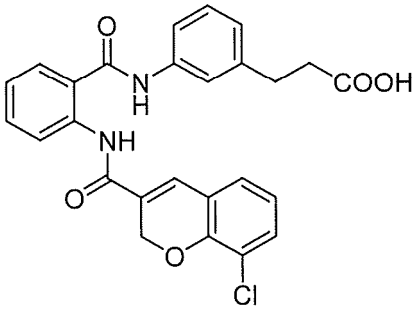
GF028 (3)



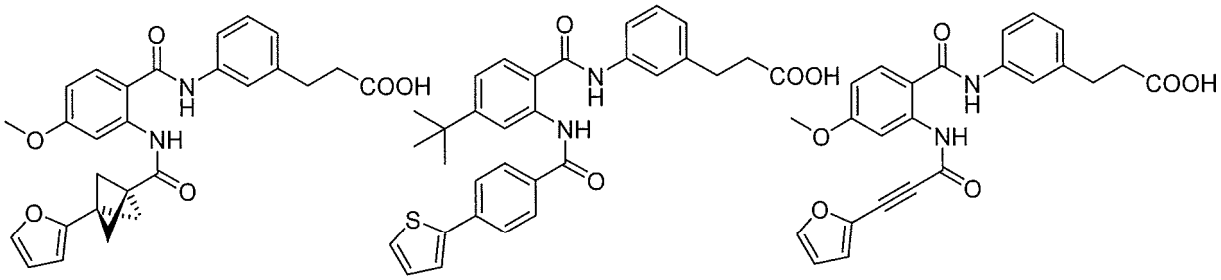
GF045 (9)

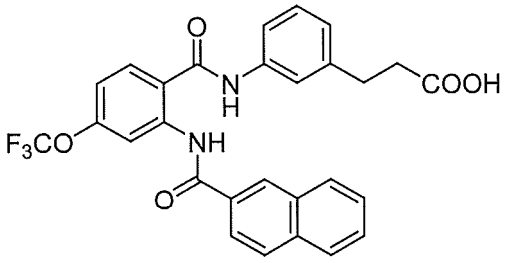


GF063 (10)

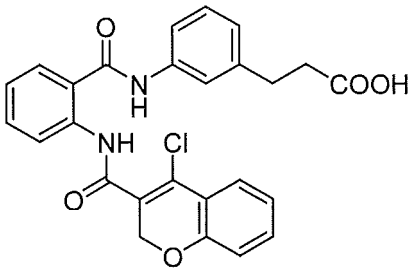


PH123 (20)

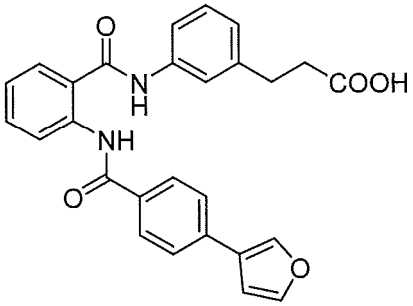




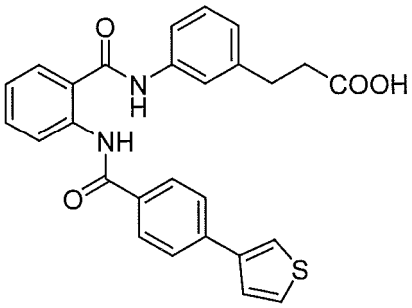
PH221 (34)



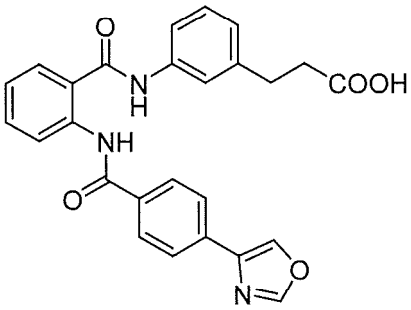
PH214 (35)



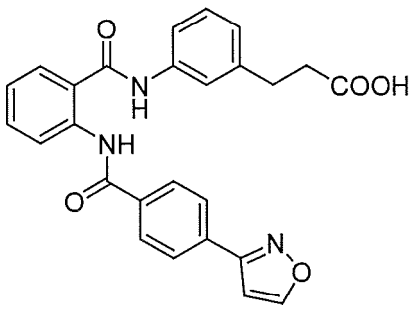
PH224 (38)



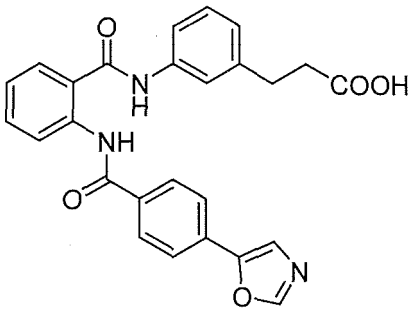
PH225 (39)



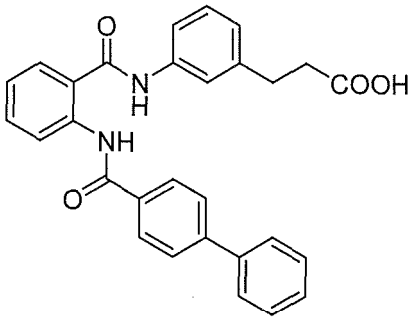
PH361 (40)



PH382 (41)

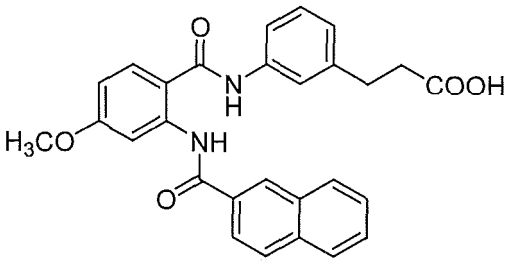


GFS008

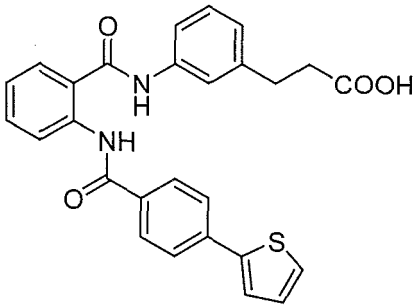


(42)

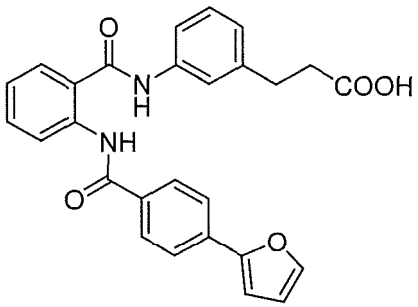
7. The compound of any one of claims 1 to 6 selected from



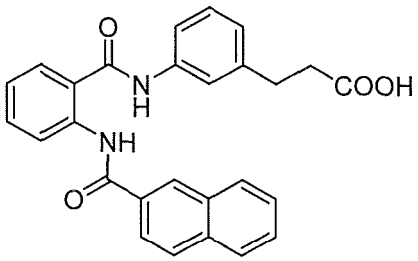
GF054



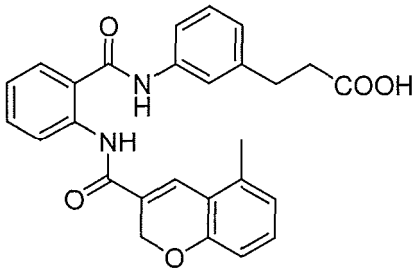
GF098



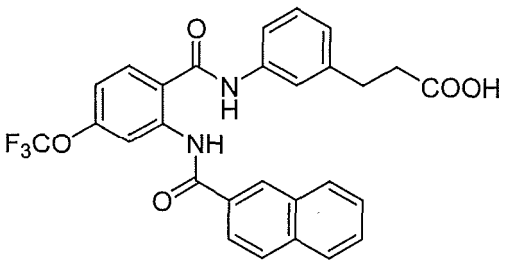
GF104



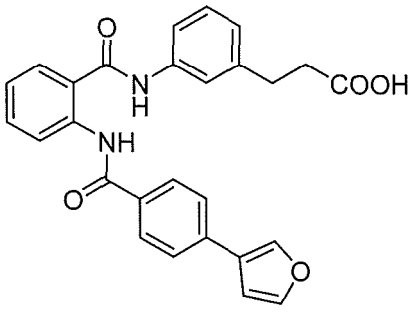
PH023



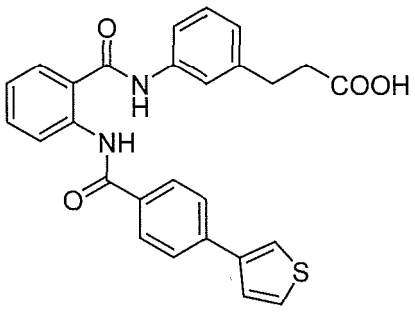
PH141



PH221

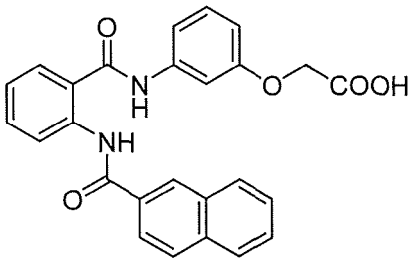


PH224

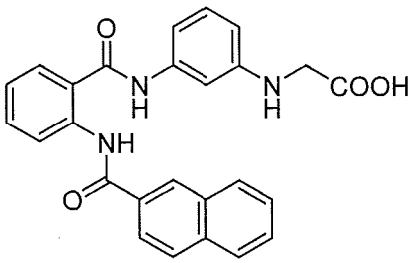


PH225

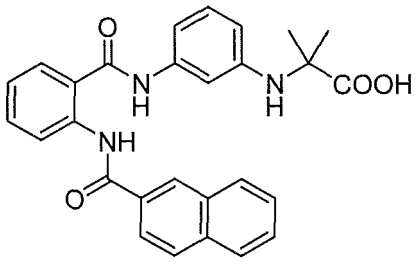
8. The compound of any one of claims 1 to 4 selected from



PH220 (31)



PH251 (32)



PH300 (33).

9. Use of a compound according to any one of claims 1 to 8 as an agonist of farnesoid X receptor (FXR) and/or peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARδ), preferably as dual agonist of FXR and PPARδ.

10. A pharmaceutical composition comprising

(a) at least one compound according to any one of claims 1 to 8,

(b) optionally, pharmaceutically acceptable excipient(s) and/or carrier.

11. The pharmaceutical composition of claim 10, further comprising

(c) agent(s) for the treatment of metabolic disorder(s), such as PPAR agonist(s), SGLT2 inhibitor(s), incretin mimetic(s), metformin and/or HMG-CoA reductase inhibitor(s);

and/or

(d) agent(s) to treat non-alcoholic steatohepatitis,
such as inhibitor(s) of the soluble epoxide hydrolase, inhibitor(s) of the apoptosis regulating kinase 1, and/or caspase inhibitor(s).

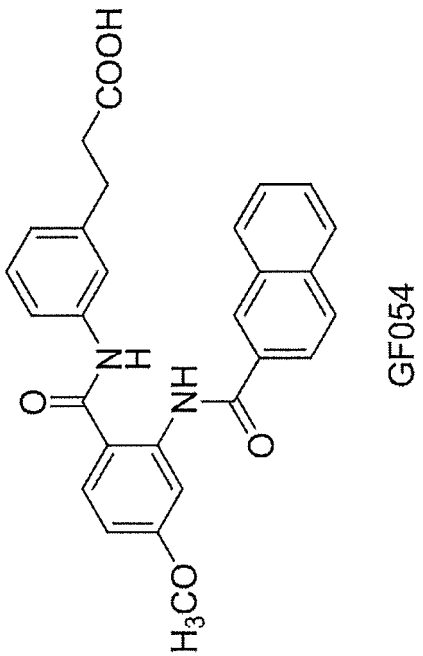
12. The compound according to any one of claims 1 to 8 or the pharmaceutical composition of claim 10 or 11 for use as a medicament.

13. The compound according to any one of claims 1 to 7 or the pharmaceutical composition of claim 10 or 11 for use in a method of treatment of a metabolic disease.

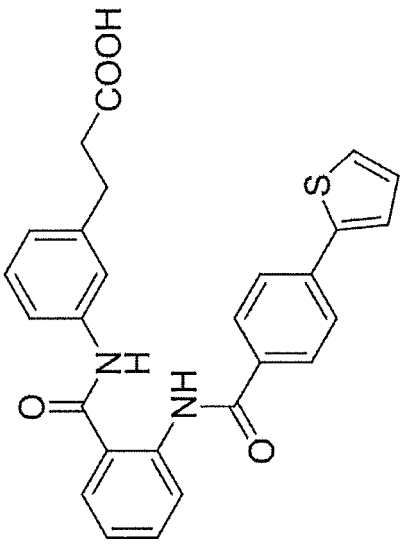
14. The compound or pharmaceutical composition for use according to claim 13, wherein the metabolic disease is selected from
non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD),
non-alcoholic steatohepatitis (NASH),
type 2 diabetes mellitus,
obesity,
dyslipidemia.

15. The compound according to any one of claims 1 to 8 or the pharmaceutical composition of claim 10 or 11 for use in a method of treatment of atherosclerosis and/or cardiovascular disease(s).

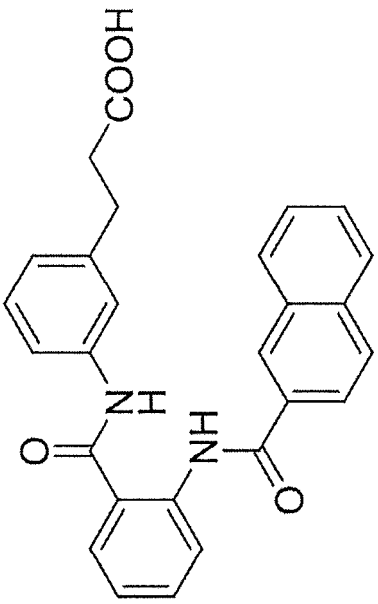
Figure 1 A



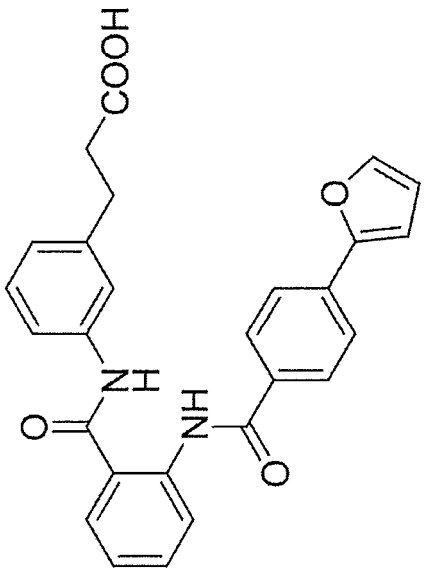
GF054



GF098

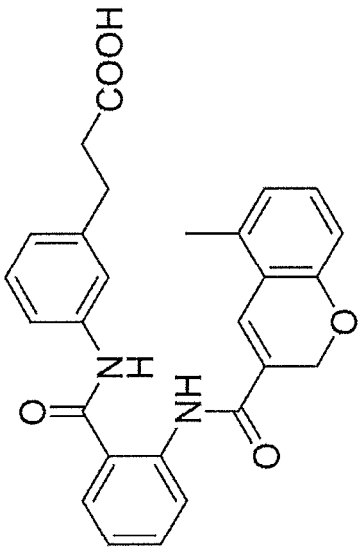


PH023



GF104

Figure 1 B



PH141

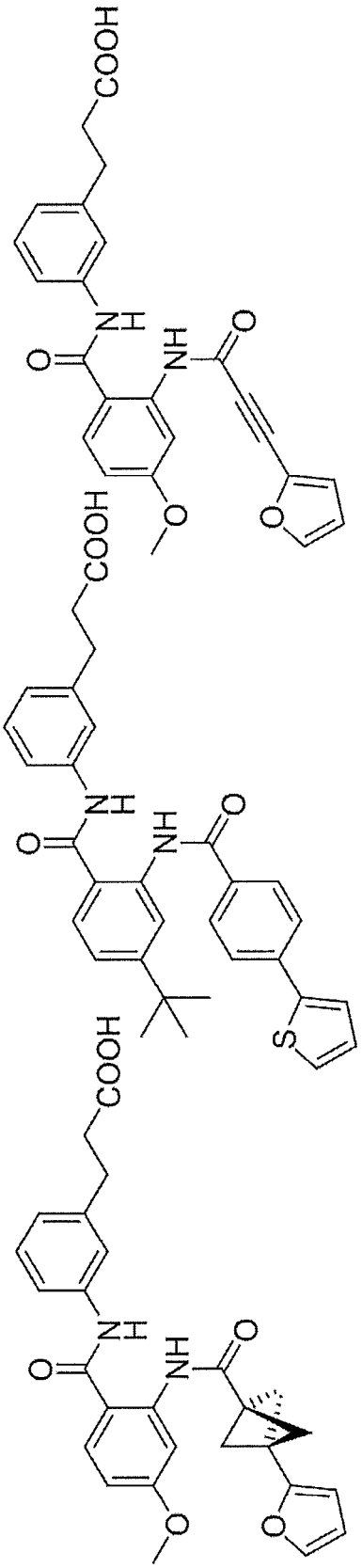


Figure 2 A

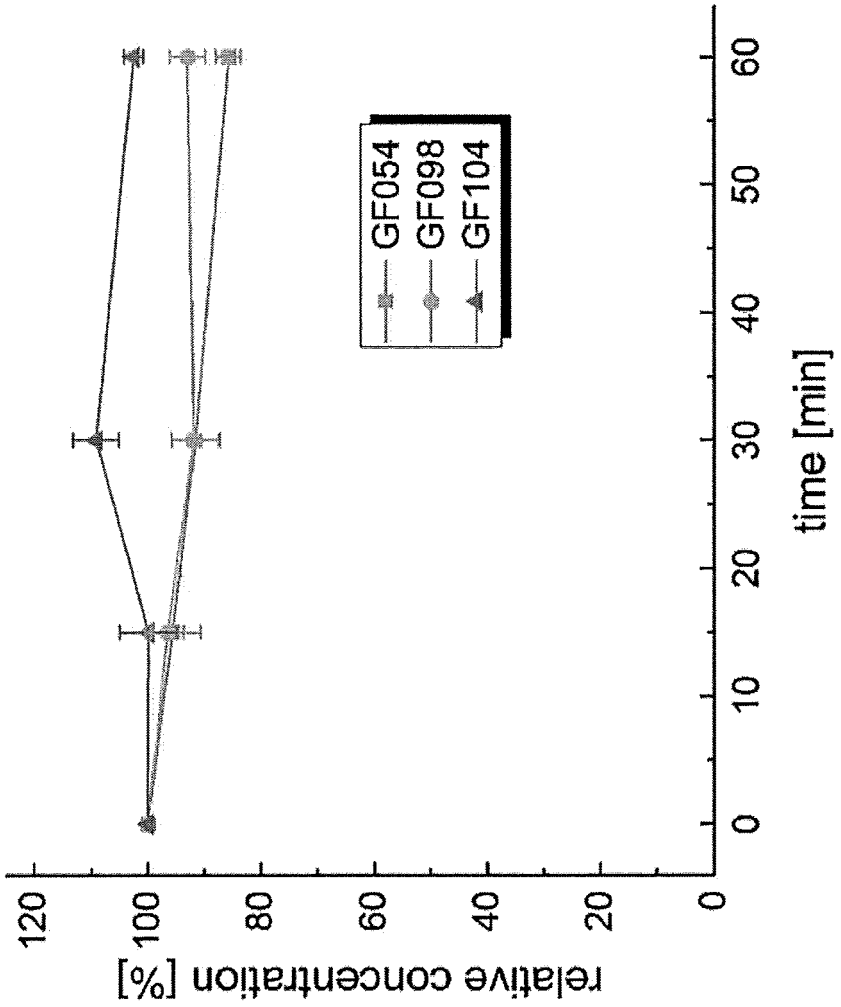
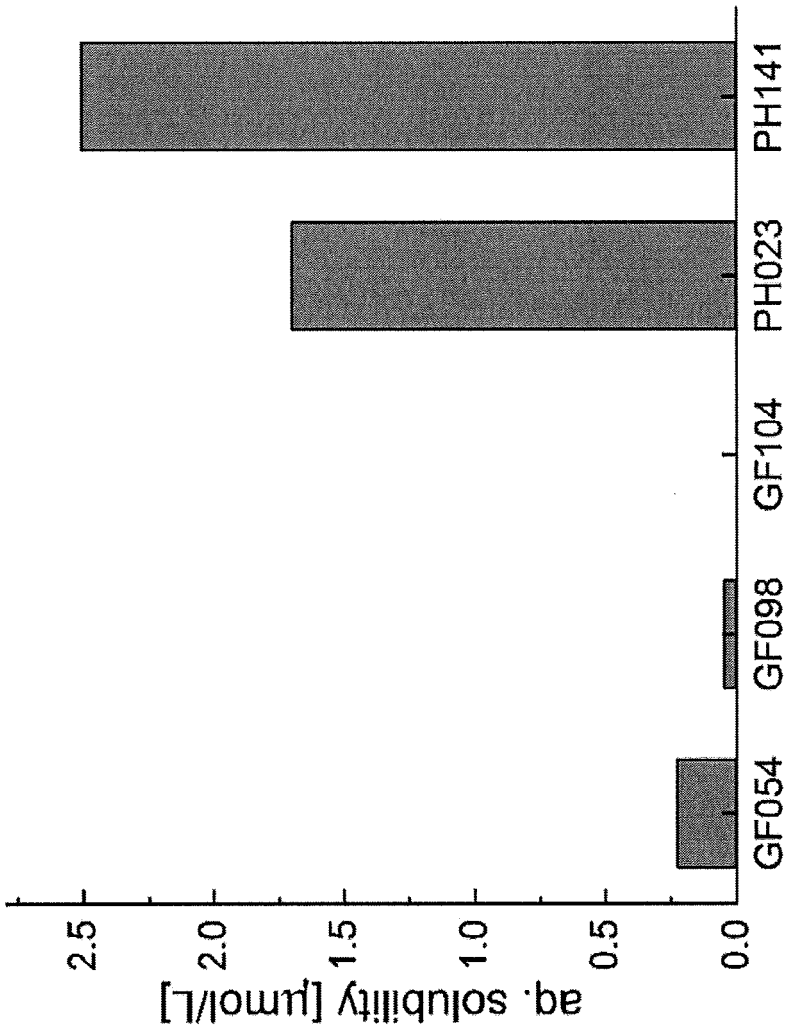

Metabolic stability
relative concentration [%]
time [min]
GF054
GF098
GF104
0
20
40
60
80
100
120
0
10
20
30
40
50
60

Figure 2 B


Aqueous solubility
aq. solubility [µmol/L]
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
GF054
GF098
GF104
PH023
PH141

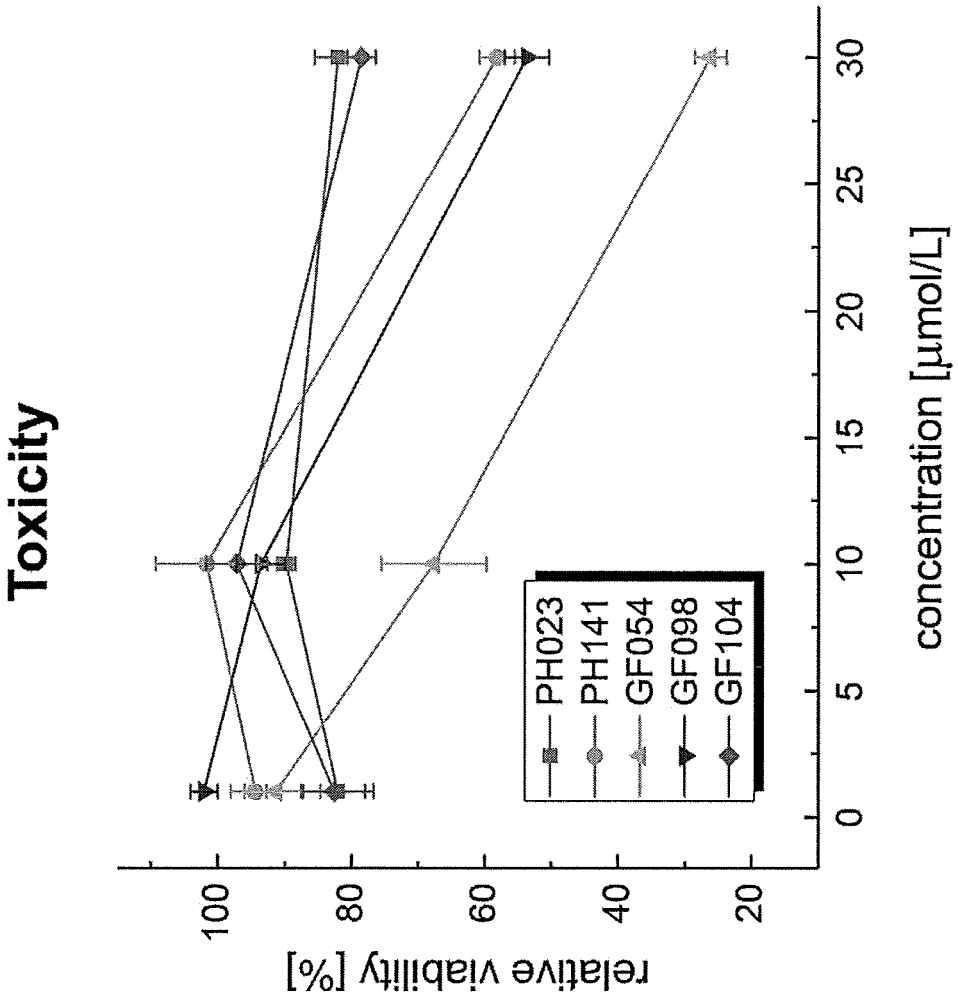

Toxicity
relative viability [%]
100
80
60
40
20
0
5
10
15
20
25
30
concentration [µmol/L]
PH023
PH141
GF054
GF098
GF104

Figure 2 C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/075797

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D311/58 C07D215/48 C07D333/24 C07D249/04 C07D261/08
C07D263/32 C07C237/42 C07C237/44 C07D307/54 A61P3/06
A61P3/04 A61P3/10 A61K31/341

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D C07C A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DANIEL MERK ET AL: "Anthranilic acid derivatives as nuclear receptor modulators-Development of novel PPAR selective and dual PPAR/FXR ligands", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 23, no. 3, 1 February 2015 (2015-02-01), pages 499-514, XP055518880, GB ISSN: 0968-0896, DOI: 10.1016/j.bmc.2014.12.013 3. Discussion and outlook; figure 3; tables 4,5; compounds 48,62,63,69 -----	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 October 2018	14/11/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Seelmann, Ingo

1

Anhang

Tabelle A.1: *Humane nukleäre Rezeptoren und deren Klassifizierung*

Englischer Trivialname	Abkürzung	Nomenklatur
Thyroid hormone receptor	TRα	NR1A1
	TRβ	NR1A2
Retinoic acid receptor	RARα	NR1B1
	RARβ	NR1B2
	RARγ	NR1B3
Peroxisome proliferator-activated receptor	PPARα	NR1C1
	PPARβ/δ	NR1C2
	PPARγ	NR1C3
Reverse erbA	Rev-erbα	NR1D1
	Rev-erbβ	NR1D2
RAR-related orphan receptor	RORα	NR1F1
	RORβ	NR1F2
	RORγ	NR1F3
Liver X receptor	LXRα	NR1H3
	LXRβ	NR1H2
Farnesoid X receptor	FXRα	NR1H4
Vitamin D receptor	VDR	NR1I1
Pregnane X receptor	PXR	NR1I2
Constitutive androstane receptor	CAR	NR1I3
Hepatocyte nuclear factor 4	HNF4α	NR2A1
	HNF4γ	NR2A2
Retinoid X receptor	RXRα	NR2B1
	RXRβ	NR2B2
	RXRγ	NR2B3
Testicular receptor	TR2	NR2C1
	TR4	NR2C2
Tailless receptor	TLX	NR2E2
Photoreceptor-specific nuclear receptor	PNR	NR2E3
Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor	COUP-TFI	NR2F1
	COUP-TFII	NR2F2
V-erbA-related protein	EAR2	NR2F6
Estrogen receptor	ERα	NR3A1
	ERβ	NR3A2
Estrogen-related receptor	ERRα	NR3B1
	ERRβ	NR3B2
	ERRγ	NR3B3
Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1
Mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2
Progesterone receptor	PR	NR3C3
Androgen receptor	AR	NR3C4
Nerve growth factor IB	NGFIB	NR4A1
Nur-related factor 1	NURR1	NR4A2
Neuron-derived orphan receptor 1	NOR1	NR4A3
Steroidogenic factor 1	SF1	NR5A1

Tabelle A.1: *Humane nukleäre Rezeptoren und deren Klassifizierung (Fortsetzung)*

Englischer Trivialname	Abkürzung	Nomenklatur
Liver receptor homolog 1	LRH1	NR5A2
Germ cell nuclear factor	GCNF	NR6A1
Dosage-specific sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome-1	DAX1	NR0B1
Short heterodimeric partner	SHP	NR0B2