

Rationales Design von hoch aktiven und selektiven Liganden für $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha v\beta 3$ -Integrine**

Dominik Heckmann, Axel Meyer, Luciana Marinelli, Grit Zahn, Roland Stragies und Horst Kessler*

Das rationale Design biologisch aktiver Moleküle bedarf einer wiederholten Abfolge von Schritten zur Aufklärung der Rezeptorstruktur, gefolgt vom Entwurf eines potenziellen Liganden, dessen Synthese und der Bestimmung seiner biologischen Aktivität. Leider kennt man derzeit weit mehr Proteinsequenzen als dreidimensionale Proteinstrukturen. Der bislang beste theoretische Ansatz zur Lösung dieses Problems ist das Erstellen von Homologiemodellen. Es ist möglich, ein geeignetes dreidimensionales Modell für das strukturell unbekannte Protein aufzubauen, wenn die Sequenzhomologie über 40 % liegt. Ein so erstelltes Homologiemodell ist für rationales Wirkstoffdesign geeignet.^[1] Hier beschreiben wir die Anwendung unseres kürzlich veröffentlichten Homologiemodells des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins^[2] auf die Entwicklung hoch aktiver (bis in den subnanomolaren Bereich) Liganden mit Selektivität gegen das eng verwandte $\alpha v\beta 3$ -Integrin. Basierend auf Strukturüberlegungen wurde die Selektivität in beide Richtungen hin verändert. Die synthetisierten Liganden könnten dazu beitragen, die Rolle beider Integrine *in vivo* aufzuklären, und können als Leitstrukturen für die antiangiogenetische Krebstherapie fungieren.

Integrine sind heterodimere Zelladhäsionsrezeptoren, die an einer Vielzahl pathologischer Prozesse wie der Metastasierung von Tumoren, Thrombose, Entzündungen und Osteoporose beteiligt sind.^[3] Sie sind daher seit geraumer Zeit wichtige Ziele in der pharmazeutischen Industrie.^[4] Seit Brooks et al. berichteten, dass das von uns entwickelte Cyclopentapeptid *cyclo*(-Arg-GlyAsp-D-Phe-Val-) (= *c*(-RG-DfV-)),^[5a] das die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ bindet, durch Angiogenese-Inhibierung das Tumorwachstum hemmt,^[6]

wurden viele $\alpha v\beta 3$ -Liganden entwickelt, von denen einige bereits klinische Tests durchlaufen.^[7] So befindet sich das cyclische, *N*-methylierte Pentapeptid *c*(-RGDf[NMe]V-)^[5b] als „Cilengitide“ derzeit in der klinischen Phase II für die Behandlung von Glioblastomen.

In jüngster Zeit wurde die proangiogenetische Wirkung der αv -Integrine durch Knock-out-Experimente ernsthaft infrage gestellt. So zeigten αv -Knock-out-Mäuse verstärkt Angiogenese, während $\beta 3/\beta 5$ -defizitäre Mäuse keine signifikanten Veränderungen aufwiesen.^[8,9] Dagegen konnte die proangiogenetische Funktion des $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptors klar nachgewiesen werden, was den Forschungsschwerpunkt immer mehr Richtung $\alpha 5\beta 1$ verlagerte.^[10,11] Anders als im Fall der Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha IIb\beta 3$, deren aufgeklärte Kristallstrukturen detaillierte Einblicke in die Bindung von Liganden ermöglichen,^[12,13] gibt es vom $\alpha 5\beta 1$ -Integrin nur unzureichende Daten zu Struktur und Bindungsverhalten.^[14]

Der Mangel an Liganden^[15,16] für das $\alpha 5\beta 1$ -Integrin bewog uns, diesen Rezeptor näher zu untersuchen. Erste Anhaltspunkte für die Struktur neuer möglicher $\alpha 5\beta 1$ -Liganden lieferte das Homologiemodell des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins im Komplex mit dem kürzlich publizierten Liganden SJ749.^[2,16] Die große Ähnlichkeit zwischen den Integrinen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ (53 % Übereinstimmung von αv mit $\alpha 5$, 55 % Übereinstimmung in der Kopfgruppe von $\beta 3$ mit $\beta 1$) sollte es ermöglichen, die Qualität unseres Modells durch die Synthese einer Bibliothek maßgeschneiderter Liganden zu prüfen. Analog zu anderen RGD-ähnlichen Liganden enthalten unsere Verbindungen ein Carboxylat und eine basische funktionelle Gruppe im Abstand von ca. 13 Å. Beim Vergleich beider Bindungstaschen fallen zwei Regionen auf, deren Mutationen zum Erreichen von Selektivität zwischen $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha v\beta 3$ -Integrinen genutzt werden können: In der β -Untereinheit sind ($\beta 3$)-Arg214 und ($\beta 3$)-Arg216 durch ($\beta 1$)-Gly217 bzw. ($\beta 1$)-Leu219 ersetzt, was zu einer Aufweitung der $\alpha 5\beta 1$ -Bindungstasche führt (die wichtigen Mutationen sind in Abbildung 1 hervorgehoben). Dadurch sollte $\alpha 5\beta 1$ im Unterschied zu $\alpha v\beta 3$ Liganden tolerieren, an deren Grundgerüst sich sterisch anspruchsvolle Reste befinden. Des Weiteren sorgt die Mutation von (αv)-Asp150 zu ($\alpha 5$)-Ala159 für eine schwächer saure Bindungsstelle in der $\alpha 5$ -Untereinheit, deren Gestalt zusätzlich dadurch verändert ist, dass (αv)-Thr212 gegen ($\alpha 5$)-Gln221 ausgetauscht ist. Damit könnte auch durch eine Änderung der basischen Gruppe Selektivität induziert werden.

Basierend auf dem Tyrosingrundgerüst, das bereits erfolgreich in Integrinliganden zum Einsatz gekommen war,^[17] wurde eine Reihe von Liganden synthetisiert und unter Berücksichtigung der durch das Modeling gewonnenen Er-

[*] Dipl.-Chem. D. Heckmann, Dr. A. Meyer, Prof. Dr. H. Kessler
Technische Universität München
Organische Chemie und Biochemie
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-Mail: kessler@ch.tum.de

Dr. L. Marinelli
Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica
Università di Napoli „Federico II“
Via D. Montesano, 49-80131 Napoli (Italien)
Dr. G. Zahn, Dr. R. Stragies
Jerini AG
Invalidenstraße 130, 10115 Berlin (Deutschland)

[**] Wir danken M. Wolff, B. Cordes, M. Kranawetter und G. Clever für technische Unterstützung. Diese Arbeit wurde durch die DFG (SFB 563) gefördert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

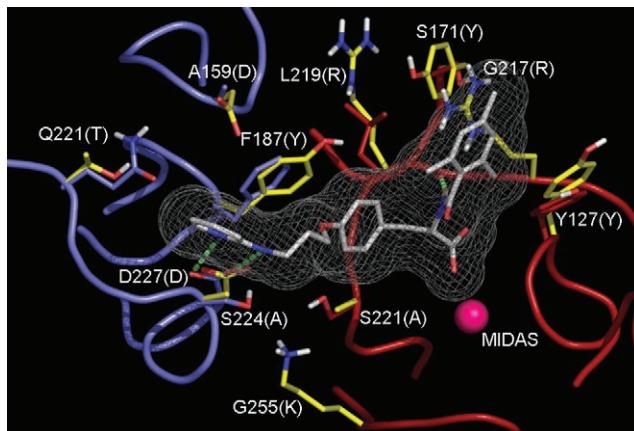


Abbildung 1. Bänderdarstellung der Bindungstasche des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins ($\alpha 5$ blau, $\beta 1$ rot) mit dem vorhergesagten Bindungsmodus von **3b** (grau). Wichtige Aminosäuren im Rezeptor sind hervorgehoben, die zugehörigen Reste im $\alpha \beta 3$ -Rezeptor gelb eingefärbt und in Klammern aufgeführt. Das Metallion in der MIDAS-Region ist als violette Kugel gezeigt. N-Atome sind blau, O-Atome rot und H-Atome weiß dargestellt; grüne gepunktete Linien entsprechen H-Brücken.

kenntnisse modifiziert. Die möglichen Bindungsmodi der Liganden wurden mit dem Programm AutoDock^[18] (siehe Hintergrundinformationen) ermittelt, das seine Zuverlässigkeit bei der Vorhersage von Ligand-Rezeptor-Komplexen bereits in früheren Studien am $\alpha \beta 3$ -Integrin unter Beweis gestellt hatte.^[19]

Abbildung 1 zeigt den Liganden **3b**, angedockt an die $\alpha 5\beta 1$ -Bindungstasche, zusammen mit mutierten $\alpha \beta 3$ -Aminosäureresten (gelb). Das Carboxylat koordiniert das in der MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site) befindliche Metallion (Ca^{2+} oder Mn^{2+}) der β -Untereinheit, während das basische Aminopyridin eine schmale Furche an der Oberseite der ($\alpha 5$)- β -Propellerdomäne ausfüllt und dabei Wasserstoffbrücken zum hoch konservierten ($\alpha 5$)-Asp227 bildet. Das Tyrosingerüst ermöglicht eine π -Stapelwechselwirkung mit dem parallel ausgerichteten ($\alpha 5$)-Phe187; das Gleiche gilt für die Mesitylengruppe und ($\beta 1$)-Tyr127. Ausschlaggebend für die $\alpha 5\beta 1$ -Selektivität ist die sperrige Mesitylengruppe, die diese Position in $\alpha \beta 3$ wegen des Raumspruchs von ($\alpha 5$)-Arg214 nicht einnehmen kann. Während das Carbamid **3b** planar ist, ist im Sulfonamid **3c** die Mesitylengruppe um 90° um die $\text{SO}_2\text{-N}$ -Bindung verdreht und zeigt dadurch in Richtung der α -Untereinheit (Abbildung 2). Diese Position ist in beiden Integrintypen möglich und führt zu einem Verlust der $\alpha 5\beta 1$ -Selektivität – wenngleich eine nanomolare Affinität erhalten bleibt.

Da durch die Docking-Experimente auch alternative Bindungsmodi zugänglich sind, könnte man darüber diskutieren, ob die sperrige Mesitylengruppe unbedingt diese Position einnehmen muss. Bei den alternativen Modi ragt die hydrophobe Mesitylengruppe allerdings aus dem Rezeptor heraus und ist damit der wässrigen Umgebung ausgesetzt, was zu einem Verlust an Bindungsenthalpie führt. Die Bedeutung, die eine hydrophobe Gruppe in unmittelbarer Nähe zur Carboxygruppe des Liganden für die Bindungsaffinität hat, konnte bereits früher aufgezeigt werden.^[20] Im Fall von **3b**

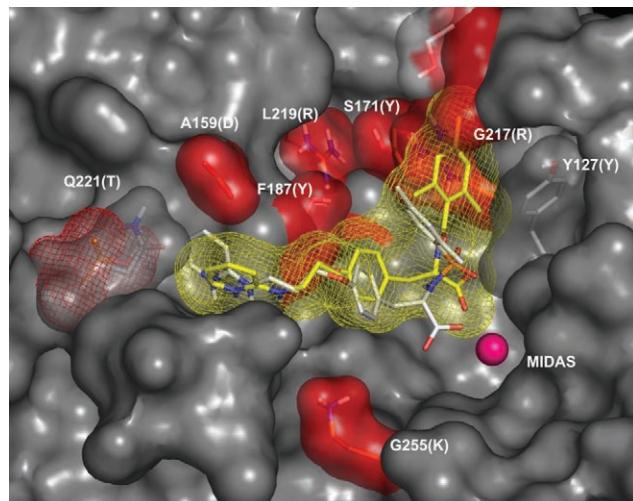


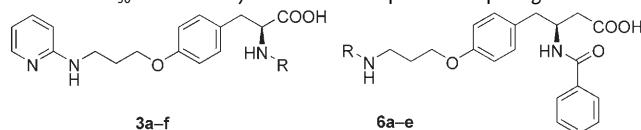
Abbildung 2. Überlagerung der Rezeptoroberflächen (Connolly-Oberflächen-Darstellung) von $\alpha 5\beta 1$ (grau) und $\alpha 5\beta 3$ (durchscheinend rot). **3b** (gelb) und **3c** (grau; S-Atom orange) wurden an den $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptor angedockt. Der Mesitylenrest von **3b** würde in $\alpha 5\beta 3$ mit ($\beta 3$)-Arg214 in Konflikt kommen, das in $\alpha 5\beta 1$ nicht vorhanden ist. Die resultierende $\alpha 5\beta 1$ -Selektivität geht im Fall des Sulfonamids **3c** wegen der unterschiedlichen Ausrichtung des Mesitylenrests verloren.

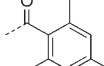
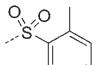
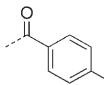
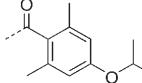
bildet die Mesitylengruppe eine π - π -Wechselwirkung mit ($\beta 1$)-Tyr127 und eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoffatom von ($\beta 1$)-Asn218 im Rückgrat.

Auffällig ist, dass das *ortho*-Substitutionsmuster am Arylrest (**3b**, **3d**, **3f**) sowohl für die Aktivität als auch für die Selektivität entscheidend ist (Tabelle 1). Ersteres könnte mit einer gesteigerten Hydrophobie, letzteres mit der eingeschränkten Flexibilität des Arylrests erklärt werden. Als wirksamster Ligand dieser Reihe zeigt **3f** die höchste Affinität zu $\alpha 5\beta 1$ ($\text{IC}_{50} = 0.7 \text{ nm}$) bei gleichzeitig guter Selektivität gegen $\alpha 5\beta 3$ (ca. 300fach). Die *para*-Isopropoxygruppe kann dabei dank ihrer räumlichen Orientierung eine Wasserstoffbrücke zu dem im ($\beta 1$)-SDL (SDL: specificity-determining loop) gelegenen ($\beta 1$)-Ser171 bilden.

Zusätzlich zu den α -Tyrosinliganden wurde eine Reihe von Verbindungen mit β -Tyrosingerüst synthetisiert. Da eine Vielzahl bekannter $\alpha \beta 3$ -Liganden in β -Position zum Carboxylat substituiert ist,^[20, 21] verwundert es nicht, dass **6e** eine hohe Affinität zu $\alpha \beta 3$, aber nur eine mittlere Affinität zu $\alpha 5\beta 1$ aufweist. Diese Präferenz ist bei allen β -Tyrosinliganden zu beobachten. Da der sperrige Substituent in β -Position relativ flexibel ist, sollte diese Selektivität nicht ausschließlich mit einer Wechselwirkung mit ($\beta 3$)-Arg214 zusammenhängen. Betrachtet man die Unterschiede zwischen der $\alpha 5$ - und der $\alpha 5$ -Untereinheit genauer, fallen zwei Mutationen auf (siehe auch Abbildung 1): Zum einen ist ($\alpha 5$)-Ala159 durch ($\alpha 5$)-Asp150 ersetzt, das einen zusätzlichen Wasserstoffbrückendonor an der basischen Gruppe bevorzugt (eine Wasserstoffbrücke wird mit ($\alpha 5$)-Asp218 gebildet); zum anderen verkürzt die Mutation von ($\alpha 5$)-Thr212 zu ($\alpha 5$)-Gln221 den Teil der Bindungsstelle, der die basische Gruppe des Liganden bindet, weshalb die längeren β -Aminosäuren besser in die $\alpha \beta 3$ -Bindungstasche passen.

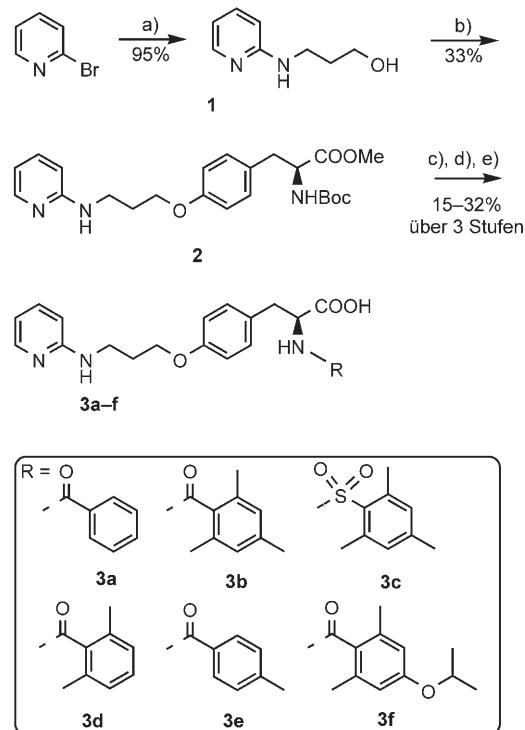
Tabelle 1: IC₅₀-Werte der synthetisierten $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha v\beta 3$ -Liganden.



Nr.	Verbindung	R	IC ₅₀ [nM] ^[a]	α5β1	IC ₅₀ [nM] ^[a]	αvβ3
1	3 a		243	190		
2	3 b		2.5	703		
3	3 c		46	3.4		
4	3 d		3.1	1624		
5	3 e		416	318		
6	3 f		0.7	279		
7	6 a		3946	13		
8	6 b		215	2.5		
9	6 c		67	0.9		
10	6 d		6969	245		
11	6 e		264	1.2		

[a] IC₅₀-Werte stammen aus einem kompetitiven ELISA-Test. Dabei wurden die immobilisierten natürlichen Integrinliganden Fibronectin und Vitronectin sowie die entsprechenden gelösten Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ verwendet (Details siehe Hintergrundinformationen).

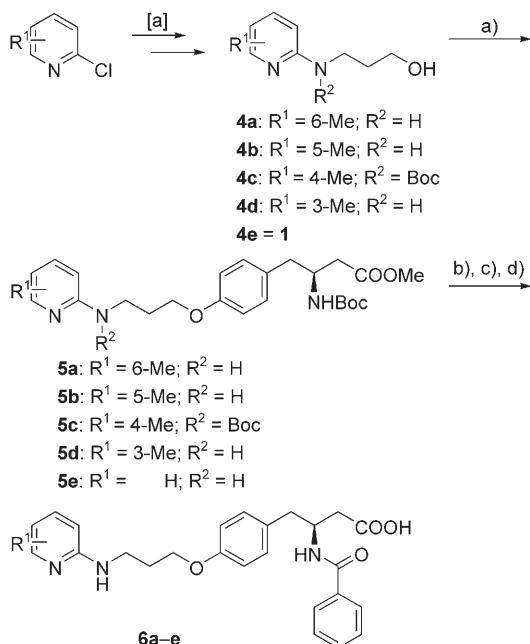
Für den eindeutigen Nachweis, dass die kürzere $\alpha 5\beta 1$ -Bindungstasche genutzt werden kann, um die Selektivität für $\alpha v\beta 3$ zu erhöhen, führten wir eine Methylgruppe in allen möglichen Positionen des 2-Aminopyridinrings ein (Tabelle 1). Wie erwartet hatte eine 4-Substitution (**6c**) keinen Einfluss auf die Selektivität, da die Methylgruppe aus dem Rezeptor herausragt. Eine Substitution in 6-Position (**6a**) hatte hingegen massiven Einfluss auf die $\alpha 5\beta 1$ -Affinität. Eine Erklärung für die überraschend niedrige Aktivität von **6d** ist eine durch intramolekulare sterische Hinderung erzwungene Drehung des Pyridinrings aus der Ebene, was die Bildung einer zweizähnigen Salzbrücke zu ($\alpha 5$)-Asp227 oder (αv)-Asp218 einschränkt. Wegen der hohen Sequenzübereinstimmung zwischen $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ (65 % Übereinstimmung von $\beta 3$ mit $\beta 5$)^[22] nehmen wir an, dass die beschriebenen Modifikationen die gleichen Auswirkungen auf das Bindungsverhalten des $\alpha v\beta 5$ -Integrins haben. **6a** ist ein sehr guter Ligand



Schema 1. Synthese der Liganden **3a-f**: a) 3-Aminopropanol, 150°C, 12 h; b) *N*-Boc-Tyrosinmethylester, PBu_3 , ADDP, THF, 0°C, 8 h; c) wässr. HCl, Dioxan, 1 h; d) Benzoylchlorid, NaHCO_3 , Dioxan/Wasser, 0.5 h (a); aromatische Carbonsäure, HATU, DIPEA, DMF, 3 h (b,d,e,f) oder Mesitylensulfonylchlorid, DIPEA, DMF, 8 h (b); e) LiOH, Methanol, H_2O , HPLC-Reinigung. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, HATU = $\text{O}-(7\text{-Azabenzotriazol-1-yl})\text{-}N,N',N',N'$ -tetramethyluroniumhexafluorophosphat, DIPEA = Diisopropylethylamin.

für $\alpha\beta 3$ mit vergleichsweise niedriger Affinität gegen $\alpha\beta 1$. **3f** und **6a** ermöglichen daher die Untersuchung der Rolle von $\alpha\beta 1$ und $\alpha\beta 3$ in biologischen Systemen. Wie erwartet weisen beide Liganden eine niedrige Affinität zum Blutplättchen-Integrin $\alpha IIb\beta 3$ auf ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ für **3f**, ca. $1 \mu\text{M}$ für **6a**), was bei der Entwicklung von Leitstrukturen für die antiangiogenetische Krebstherapie von großer Bedeutung ist.

Die Verbindungsreihe aus Tabelle 1 wurde durch *O*-Alkylierung von α - oder β -Tyrosinmethylester mit einer Reihe von Aminopyridylalkoholen unter Mitsunobu-Bedingungen hergestellt. Der Aminopyridylalkohol **1** wurde durch nucleophile aromatische Substitution aus dem kommerziell erhältlichen 2-Brompyridin und 3-Aminopropanol bei 150°C in 95 % Ausbeute erhalten (Schema 1).^[23] Die methylsubstituierten Aminopyridylalkohole wurden aus den jeweiligen 2-Chlormethylpyridinen durch Oxidation mit *meta*-Chlorperbenzoësäure zum *N*-Oxid (78–89 %),^[24] nucleophile aromatische Substitution (> 95 %) und Reduktion unter H₂-Atmosphäre mit einem Pd-Katalysator (60–82 %) erhalten (Schema 2). Die Aminopyridylalkohole wurden anschließend mit den Boc-geschützten α - oder β -Tyrosinmethylestern in einer Mitsunobu-Reaktion mit Tributylphosphin und Azodicarbonyldipiperid (ADDP) umgesetzt. Die Tyrosinether **2** und **5a–e** wurden so in niedrigen bis mäßigen Ausbeuten (15–68 %) erhalten.^[25]



Die niedrigen Ausbeuten der Mitsunobu-Reaktion ließen sich durch Einsatz *N*-Boc-geschützter Aminopyridylalkohole steigern; **5c** konnte sogar nur auf diese Weise erhalten werden. Die vollständig geschützten Ligandvorstufen wurden mit HCl in Dioxan/Wasser von der Boc-Schutzgruppe befreit, und das freie Amin wurde je nach Ligandenklasse mit einer aktivierten aromatischen Carbonsäure (HATU, DIPEA in DMF für die Liganden **3b,d,e,f**) oder mit Benzoylchlorid und NaHCO_3 in Dioxan/Wasser (**6a–e**, **3a**) acyliert. Das Sulfonamid **3c** wurde mit Mesitylsulfonylchlorid und DIPEA in DMF hergestellt. In der letzten Stufe wurde der Methylester mit fünf Äquivalenten LiOH in Methanol/Wasser gespalten und die Verbindung durch präparative Umkehrphasen-HPLC gereinigt (Synthese und Charakterisierung der Verbindungen finden sich in den Hintergrundinformationen).

Vor dem Hintergrund einer steigenden Bedeutung des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins in der Entwicklung antiangiogenetischer Krebsmedikamente stellen wir hier den nichtpeptidischen Integrinliganden **3f** vor, der $\alpha 5\beta 1$ mit Aktivitäten im subnanomolaren Bereich und hoher Selektivität bindet. Durch minimale Modifizierungen gelang zudem die Herstellung von Liganden, die bevorzugt an $\alpha 5\beta 3$ binden. Diese Liganden zeigen nur sehr geringe Aktivität gegen den $\alpha 1\beta 3$ -Rezeptor. Auf der Basis eines Homologiemodells für $\alpha 5\beta 1$, der Analyse der Bindungsmodi sowie ausgedehnter Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen schlagen wir ein Modell für das rationale Design von $\alpha 5\beta 1$ -Liganden vor, das für die Entwicklung von Leitstrukturen und in biologischen Studien zur Selektivität von Integrinen verwendbar ist.

Eingegangen am 2. Januar 2007
Online veröffentlicht am 30. März 2007

Stichwörter: Integrinliganden · Rezeptoren · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen · Tumortherapeutika · Wirkstoff-Design

- [1] A. Hillisch, L. F. Pineda, R. Hilgenfeld, *Drug Discovery Today* **2004**, 9, 659.
- [2] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4166–4204.
- [3] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, 110, 673.
- [4] S. A. Mousa, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 534.
- [5] a) M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50; b) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3033.
- [6] P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, 79, 1157.
- [7] M. Shimaoka, T. A. Springer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 703.
- [8] R. O. Hynes, *Nat. Med.* **2002**, 8, 918.
- [9] B. L. Bader, H. Rayburn, D. Crowley, R. O. Hynes, *Cell* **1998**, 95, 507.
- [10] E. L. George, E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, R. O. Hynes, *Development* **1993**, 119, 1079.
- [11] S. Kim, K. Bell, S. A. Mousa, J. A. Varner, *Am. J. Pathol.* **2000**, 156, 1345.
- [12] a) J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, 296, 151; b) K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2002**, 41, 3767; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3767.
- [13] T. Xiao, J. Takagi, B. S. Coller, J. H. Wang, T. A. Springer, *Nature* **2004**, 432, 59.
- [14] J. Takagi, K. Strokovich, T. A. Springer, T. Walz, *Embo J.* **2003**, 22, 4607.
- [15] D. Zimmermann, E. W. Guthöhrlein, M. Malesevic, K. Sewald, L. Wobbe, C. Heggemann, N. Sewald, *ChemBioChem* **2005**, 6, 272.
- [16] J. M. Smallheer, C. A. Weigelt, F. J. Woerner, J. S. Wells, W. F. Daneker, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 383.
- [17] G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 56, 427.
- [18] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639.
- [19] L. Marinelli, A. Lavecchia, K. E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4393.
- [20] C. Gibson, G. A. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 169; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 165.
- [21] J. H. Hutchinson, W. Halzenko, K. M. Brashear, M. J. Breslin, P. J. Coleman, L. T. Duong, C. Fernandez-Metzler, M. A. Gentile, J. E. Fisher, G. D. Hartman, J. R. Huff, D. B. Kimmel, C. T. Leu, R. S. Meissner, K. Merkle, R. Nagy, B. Pennypacker, J. J. Perkins, T. Prueksaritanont, G. A. Rodan, S. L. Varga, G. A. Wesolowski, A. E. Zartman, S. B. Rodan, M. E. Duggan, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4790.
- [22] L. Marinelli, K. E. Gottschalk, A. Meyer, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4166.
- [23] A. Trejo, H. Arzeno, M. Browner, S. Chanda, S. Chen, D. D. Corner, S. A. Dalrymple, P. Dunten, J. Lafague, B. Lovejoy, J. Freire-Moar, J. Lim, J. McIntosh, J. Miller, E. Papp, D. Reuter, R. Roberts, F. Sanpablo, J. Saunders, K. Song, A. Villasenor, S. D. Warren, M. Welch, P. Weller, P. E. Whiteley, L. Zeng, D. M. Goldstein, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4702.
- [24] K. C. Lee, D. Y. Chi, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 8576.
- [25] J. J. Marugan, C. Manthey, B. Anacleto, L. Lafrance, T. Lu, T. Markotan, K. A. Leonard, C. Crysler, S. Eisennagel, M. Dasgupta, B. Tomczuk, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 926.