

Selektive Detektion kooperativ bindender Fragmente in einem Hochdurchsatz-Ligationsassay zur Entwicklung eines pikomolaren Caspase-3-Inhibitors**

Marco F. Schmidt, Adeeb El-Dahshan, Sandro Keller und Jörg Rademann*

Die Fragment-basierte Entwicklung von Leitstrukturen wurde in den vergangenen Jahren populär, da sie eine effizientere Abtastung des chemischen Raums ermöglicht als das Hochdurchsatz-Screening und daher schneller zu Treffern („Hits“) führt.^[1] Seitdem das Konzept der Fragment-basierten Leitstrukturentwicklung erstmals vorgeschlagen wurde,^[2] sind diverse Detektionsmethoden verwendet worden, um die Bindung von Fragmenten an Proteintemplate nachzuweisen. Dazu gehörten HPLC,^[3] NMR-Spektroskopie,^[4] Röntgen-Kristallographie^[5] und Massenspektrometrie.^[6] Kürzlich wurde das dynamische Ligationsscreening eingeführt, um reversibel verknüpfte Fragmente in einem biochemischen Assay durch ihre Konkurrenz mit einem fluorogenen Enzymsubstrat nachzuweisen.^[7]

Die bislang publizierten Detektionsmethoden für Protein-bindende Fragmente lösen allerdings nicht die wohl schwierigste Frage der Fragment-basierten Ligandenentwicklung: Wie kann ein Primärligand als Ausgangspunkt optimal durch ein Sekundärfragment erweitert werden? Zwar liefert das „Second-site“-Screening^[8] mithilfe von NMR-Spektroskopie oder Kristallographie Fragment-„Hits“ für unterschiedliche Bindungsstellen, aber diese Methoden stellen keine Informationen über die optimale und biologisch aktive Kombination von Fragmenten bereit.

Es ist offensichtlich, dass für eine thermodynamisch optimale Erweiterung eines Primärliganden **A** durch ein Sekundärfragment **B** die kooperative Bindung beider Komponenten erforderlich ist. Eine kooperative Bindung zweier Fragmente an ein Protein liegt vor, wenn die Bindung von **A** durch die Bindung von **B** verstärkt wird. Eine kooperative

Wechselwirkung ist daher klar unterscheidbar von einer additiven Bindung der Fragmente (bei der **A** und **B** unabhängig voneinander binden, ohne sich gegenseitig in ihrem Bindungsverhalten zu beeinflussen) und einer kompetitiven Bindung, bei der das Sekundärfragment **B** die Bindung von **A** inhibiert. Kooperativ bindende Fragmente sollten zu einer starken Zunahme der Bindungsaffinität führen, wenn die beiden Komponenten durch eine geeignete kovalente Verknüpfung verbunden werden. Folglich sollte eine Methode für den selektiven Nachweis von kooperativ bindenden Fragmenten leistungsfähig für die Entwicklung von potenten Proteinliganden sein.

Wir postulierten, dass eine selektive Detektion von kooperativ bindenden Fragmenten durch die Kombination des dynamischen Ligationsscreenings (DLS)^[7] mit Fluoreszenz-polarisations(FP)-Experimenten^[9] realisierbar sein sollte. Eine Fluoreszenzsonde für reversible Fragmentligationen würde es dabei ermöglichen, zwischen der additiven, kooperativen und kompetitiven Bindung von Fragmenten an ein Zielprotein zu unterscheiden, indem man eine unveränderte, erhöhte bzw. verringerte Fluoreszenzpolarisation misst (Abbildung 1).

Caspase-3 (Cysteiny-Aspartyl-spezifische Protease 3) wurde als Zielprotein ausgewählt, um die Machbarkeit des

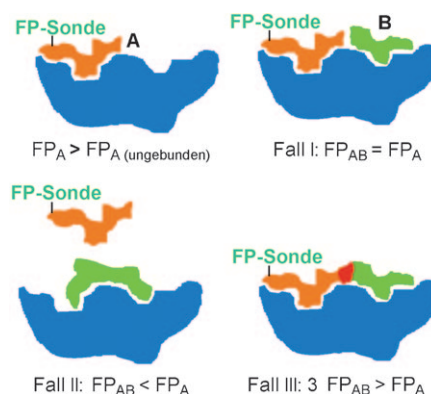


Abbildung 1. Selektive Detektion kooperativ bindender Fragmente in einem dynamischen Ligationsassay: Die Bindung des Fragments **A** (orange) wird durch Fluoreszenzpolarisation bestimmt. Drei Fälle von Fragmentwechselwirkungen können in diesem Assay unterschieden werden: Die additive Bindung des Fragments **B** (grün) hat keinen Effekt auf die beobachtete Polarisation (Fall I). Die kompetitive Bindung führt zu verminderter Polarisation (Fall II). Schließlich resultiert die kooperative Bindung der Fragmente **A** und **B** in einer verlängerten Korrelationszeit τ_{AB} und entsprechend in einer Zunahme der FP (Fall III).

[*] Dr. M. F. Schmidt, Dr. A. El-Dahshan, Dr. S. Keller, Prof. Dr. J. Rademann
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-9406-2901
E-Mail: rademann@fmp-berlin.de

Dr. M. F. Schmidt, Dr. A. El-Dahshan, Prof. Dr. J. Rademann
Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin (Deutschland)

[**] Wir danken Christoph Erdmann, Franziska Hinterleitner und Dagmar Krause für technische Unterstützung, Dr. Samuel Belgny, Jörn Saupe und Dr. Peter Schmieder für hilfreiche Diskussionen. Die Arbeit am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie wurde durch die DFG (FOR 806, SFB 765, Ra 895/2-5) gefördert. J.R. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für die fortgesetzte Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200901647> zu finden.

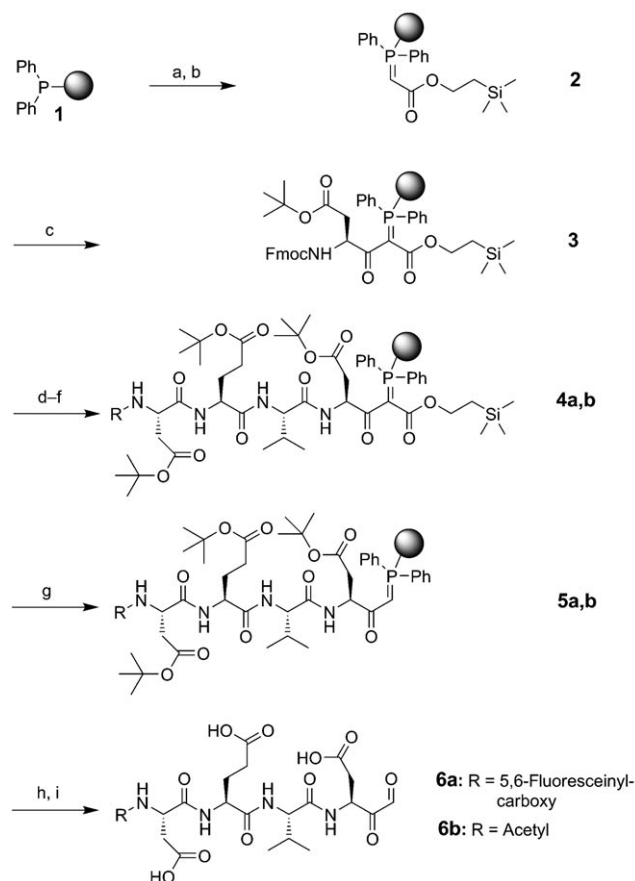
beschriebenen Ansatzes zu überprüfen. Das Protein wurde als zellulärer Schalter für die Apoptose identifiziert^[10] und wird daher als Wirkstoffziel für eine Reihe von klinischen Indikationen betrachtet, die einen hochregulierten Zelltod gemeinsam haben, z.B. traumatische Gehirnverletzungen, Epilepsie, amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und das Parkinson-Syndrom.^[11] Über potente Inhibitoren der Caspase-3 wurde bereits berichtet.^[12]

Fluoreszierende Ligationssonden wurden ausgehend von der natürlichen Substratsequenz DEVD entwickelt.^[12c] Als reaktive Gruppe wurde die α -Ketoaldehyd-Funktion ausgewählt, die eine klare Trennung zwischen dem mit dem Protein reagierenden Keton und der Aldehydgruppe, die mit den Fragmenten wechselwirken sollte, ermöglicht. Einfache α -Ketoaldehyde liegen in Wasser vollständig hydratisiert vor, Reaktionen mit Aminnucleophilen sind im wässrigen Medium energetisch ungünstig (endergon), wobei das Gleichgewicht auf der Seite des Hydrats und des freien Amins liegt.^[13]

Die Sondenmoleküle **6a** und **6b** wurden durch die C-Acylierung von polystyrolgebundenem Trimethylsilylethyl-(TMSE)-phosphoranylidenacetat erhalten (Schema 1).^[14] Die TMSE-Schutzgruppe wurde durch das milde Fluoridreagens Tris(dimethylamino)sulfonium-difluortrimethylsilicat (TAS-F) entfernt, was zur sofortigen Decarboxylierung des harzgebundenen Phosphorans führte. Die oxidative Abspaltung mit Dimethyldioxiran (DMD) gefolgt von der Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen unter sauren Bedingungen lieferte die Verbindungen **6a** und **6b**.

Die Bindungsaffinität von **6a** wurde durch FP-Titration mit Caspase-3 bestimmt; die FP-Titrationskurve lieferte eine Dissoziationskonstante K_D von 15 nM. Der FP-Assay wurde auf 384er-Mikrotiterplatten übertragen und für den Test von 7397 Fragmenten verwendet, unter denen sich 4019 nucleophile primäre Amine aus der ChemBioNet-Bibliothek befanden. Die Inkubation von 20 nM Caspase-3, 10 nM von Sonde **6a** und 10 μ M eines Fragments in einem Gesamtvolumen von 10 μ L ermöglichte ein Hochdurchsatz-Screening.

In Übereinstimmung mit unseren Hypothesen (Abbildung 1) konnten die in diesem dynamischen Ligationsassay getesteten Fragmente in drei Klassen eingeteilt werden: Für die meisten Fragmente wurde keine Veränderung des FP-Signals beobachtet, was auf eine nichtkooperative, additive Bindung von **A** und **B** oder auf überhaupt keine Bindung von **B** hinweist (Abbildung 1, Fall I). Zweitens wurde für 78 Fragmente eine Abnahme des FP-Signals gefunden, entsprechend einer kompetitiven Bindung von **A** und **B**. Ein Grund dafür könnte die kompetitive Inhibierung der Bindung der fluoreszierenden Reportersonde **A** durch das Fragment **B** sein (Abbildung 1, Fall II). Alle 78 Fragmente dieses Typs wurden in einem enzymatischen Assay unter Verwendung von Ac-DEVD-AMCA (**7**), einem fluorogenen Substrat von Caspase-3, getestet (siehe die Hintergrundinformationen).^[12] In der Tat wirkten 21 der konkurrierenden Liganden bei einer Konzentration von 10 μ M als kompetitive Inhibitoren. Für vier dieser kompetitiven Inhibitoren, **10**, **11**, **12** und **13** (siehe Schema 2 in den Hintergrundinformationen), wurden K_I -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich gemessen, was diese Verbindungen den besseren unter den publizierten



Scheme 1. Synthese der Peptidyl- α -ketoaldehyde CF-DEVD-CHO (**6a**) und Ac-DEVD-CHO (**6b**) ausgehend von Triphenylphosphan-Polystyrol, das wie zuvor berichtet alkyliert und acyliert wurde.^[14] Reaktionsbedingungen: a) Trimethylsilylethylbromacetat (5 Äquiv.), Toluol, 15 min, Mikrowellen, 100 °C. b) Et₃N (5 Äquiv.), CH₂Cl₂, 2 h, RT. c) Fmoc-Asp(OtBu)-OH (5 Äquiv.), MSNT (5 Äquiv.), Lutidin (4.9 Äquiv.), CH₂Cl₂, 12 h, RT. d) 20% Piperidin/DMF, 6 min. e) Fmoc-AA-OH (5 Äquiv.), DIC (5 Äquiv.), HOBt (5 Äquiv.) DMF, 3 h. (Die Schritte (d) und (e) werden *n*-mal wiederholt.) f) 5,6-Carboxyfluorescein (10 Äquiv.), DIC (10 Äquiv.), HOBt (10 Äquiv.) in DMF, 3 h, RT oder: Ac₂O (4 Äquiv.), DMF, 20 min, RT (zweimal). g) TAS-F (3 Äquiv.), DMF, 3 h, RT. h) DMD (3–4 Äquiv.) in Aceton, CH₂Cl₂, 30 min, 0 °C. i) TFA/CH₂Cl₂/H₂O (50:45:5, v/v/v). Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, MSNT = 1-(2-Mesitylsulfonyl)-3-nitro-1*H*-1,2,4-triazol, DIC = *N,N'*-Diisocarbodiimid, HOBt = 1-Hydroxy-1*H*-benzotriazol, TFA = Trifluoressigsäure.

nichtpeptidischen Inhibitoren von Caspase-3 nahe bringt.^[12] Drittens war bei 176 Fragmenten das FP-Signal um mehr als 20% im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Diese Beobachtung deutete auf eine kooperative Bindung von **A** und **B** an das Protein hin, möglicherweise über die Bildung eines Ligationsprodukts mit erhöhter Affinität. 50 der kooperativ bindenden Fragmente wurden im Enzymassay validiert. Das Fragment **8** (siehe Abbildung 4 sowie Schema 3 in den Hintergrundinformationen) wurde als wirksamster FP-Verstärker unter den 176 Fragmenten identifiziert und hatte einen K_I -Wert von 120 μ M.

Um schließlich ein tieferes Verständnis der experimentellen Daten zu erhalten, sollten die Bindung und Wechselwirkung der Verbindungen **6a** und **8** erklärt werden und das Ausmaß ihrer Kooperativität quantifiziert werden (Abbil-

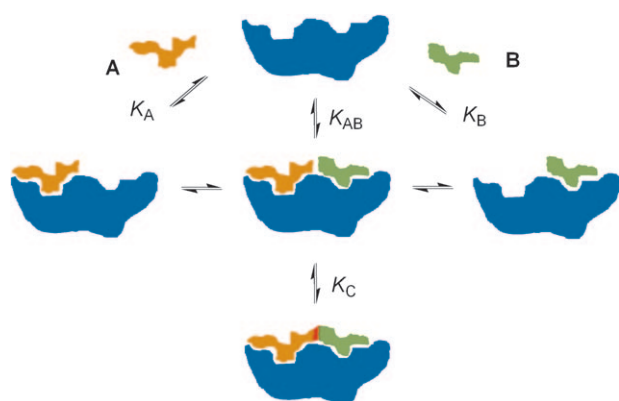


Abbildung 2. Modell der additiven und kooperativen Bindung der Moleküle **A** (orange) und **B** (grün) an ein Protein (blau). Im additiven Fall binden **A** und **B** unabhängig ($K_{AB} = K_A K_B$) ohne miteinander zu wechselwirken ($K_C = 0$). Eine kooperative Bindung ergibt sich durch die proteinunterstützte Ligation, die in zwei Schritte zerlegt wurde: 1) additive Bindung der zwei Fragmente, beschrieben durch $K_{AB} = K_A K_B$, und 2) Bildung des Ligationsprodukts, charakterisiert durch $K_C > 0$.

dung 2). Dazu wurde die Sonde **6a** in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des Fragments **8** mit Caspase-3 titriert. Die erhaltenen FP-Daten (Abbildung 3a) wurden auf der Grundlage eines thermodynamischen Modells interpretiert, in dem entweder die additive oder die kooperative Bindung von **6a** und **8** an Caspase-3 dargestellt werden konnte (Abbildung 3b). Im ersten Szenario wurde keine Wechselwirkung zwischen **6a** und **8** angenommen, und folglich wurde die Ligationskonstante $K_C = 0$ gesetzt (Abbildung 2). In diesem rein additiven, nichtkooperativen Fall wird kein Effekt der Konzentration von **8** auf die Bindung von **6a** vorhergesagt (Abbildung 3b, schwarze Linie). Tatsächlich waren die experimentellen Daten ohne **8** (schwarze Symbole) oder bei Konzentrationen von 100 nM (blaue Symbole) und 1 μM (grüne Symbole) recht gut in Einklang mit diesem Szenario (Abbildung 3b). Bei einer Konzentration von 10 μM an **8** (rote Symbole) wurde allerdings eine stärkere Bindung von **6a** gefunden, die nicht mehr mit dem nichtkooperativen Modell in Übereinstimmung zu bringen war.

Deshalb wurde im zweiten Szenario die Möglichkeit einer kooperativen Bindung eingeschlossen, indem die Bildung eines Ligationsprodukts aus der proteingebundenen Sonde **6a** und dem Fragment **8** zugelassen wurde, was einer Ligationskonstante $K_C > 0$ entspricht (Abbildung 2). In diesem Szenario konnten die bei allen Konzentrationen von **8** gemessenen FP-Daten befriedigend reproduziert werden (Abbildung 3b, blaue, grüne und rote Linien). Die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Daten wurde für eine Ligationskonstante von $K_C = 20$ erhalten. Dieser Wert bedeutet, dass die Gleichgewichtskonzentration des proteingebundenen Ligationsprodukts 20mal höher ist als die Konzentration des Proteins mit den nichtligierten, gebundenen Liganden **6a** und **8**. Dieser Wert entspricht einer freien Ligationsenergie $\Delta G^\circ = -RT \ln K_C = -7 \text{ kJ mol}^{-1}$. Folglich ist die Ligationsreaktion auf dem Protein eine exergone Reaktion, im Unterschied zur gleichen Reaktion in wässriger Lösung, bei der kein Ligationsprodukt des α -Ketoaldehyds und des Fragments **8** detektierbar ist.^[13]

Um die kooperative Bindung des reversibel gebildeten Ligationsprodukts zu bestätigen, wurde das kovalent und irreversibel verknüpfte Ligationsprodukt des α -Ketoaldehyds **6b** und des aktivsten Fragments **8** durch reduktive Aminierung synthetisiert (Abbildung 4). Das auf diese Weise erhaltene Keton **9** ergab in einem Caspase-3-Funktionsassay einen K_I -Wert von 80 pM (Abbildung 3) und war somit der aktivste bekannte Caspase-3-Inhibitor.^[12] Die Verbindung **9** inhibiert das Enzym 300-mal stärker als das α -Ketoaldehyd **6b** ($K_I = 25 \text{ nM}$).

Zusammenfassend haben wir einen differenziellen Nachweis von kooperativen und kompetitiven Fragmenten im Hochdurchsatzformat durch ein FP-Experiment entwickelt. Dabei konnte die kooperative Fragmentbindung von lediglich additiven Effekten unterschieden werden. Die Verwendung eines Modells für das Ligationsgleichgewicht ermöglichte es, ausgehend von den Messdaten die Ligationskonstante und die freie Reaktionsenergie der reversiblen Ligationsreaktion auf der Proteinoberfläche abzuschätzen.

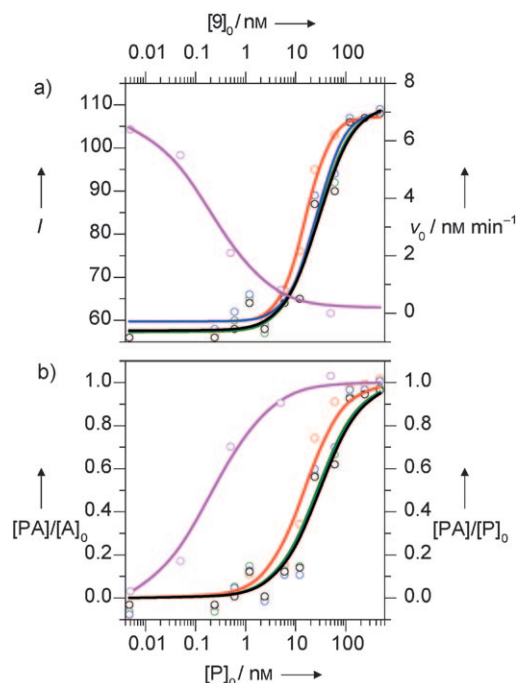


Abbildung 3. Titrationsexperimente: a) Rohdaten (Symbole) und sigmoidale Anpassungen (Linien) entsprechend Gl. (1). FP wurde gemessen nach Zugabe von Caspase-3 (Komponente P, untere Abszisse) zu 10 nM **6a** bei unterschiedlichen Konzentrationen von **8**: 0 nM (schwarz), 100 nM (blau), 1 μM (grün) und 10 μM (rot). I ist die Intensität des FP-Signals (linke Ordinate). Die Enzyminhibition wurde durch die Zugabe von **9** (obere Abszisse) zu einer 3 nM Lösung von Caspase-3 gemessen, die 5 μM von Ac-DEVD-AMCA enthielt (magenta). v_0 ist die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion (rechte Ordinate). b) Normalisierte Titrationsdaten, die aus den experimentellen FP-Daten unter Verwendung von Gl. (2) (Symbole) erhalten wurden, und die beste Anpassung von Gl. (3)–(9) (Linien). Die Ordinaten geben Bindungsgrade an; die linke Ordinate den Bindungsgrad von **6a**, also den aus den FP-Daten ermittelten Quotienten aus der Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes PA und der Gesamtkonzentration von **6a**, und die rechte Ordinate den aus den Enzyminhibitionsdaten ermittelten Bindungsgrad der Caspase-3. Siehe die Hintergrundinformationen für Gleichungen und Details.

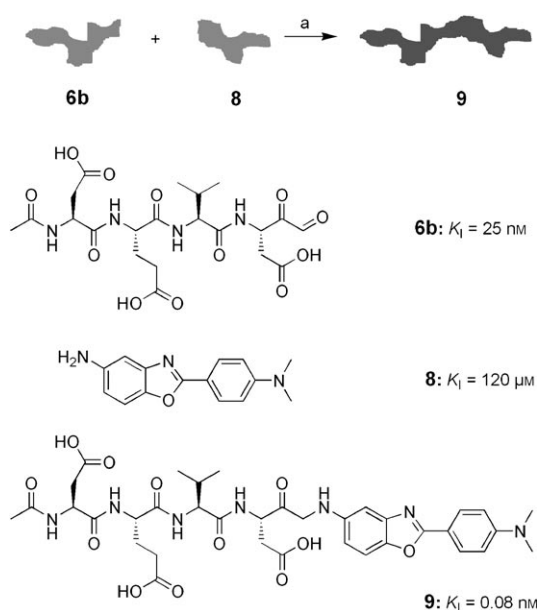


Abbildung 4. Der α -Ketoaldehyd-Inhibitor **6b** (Komponente A in den Abbildungen 1 und 2; orange) wurde durch reduktive Aminierung an das aktive Amin **8** ligiert (Komponente B in den Abbildungen 1 und 2; grün), um den pikomolaren Inhibitor **9** (rot) zu erhalten. Bedingungen: a) SiCl_3H (5 Äquiv.), DMF/MeOH 1:1 (v/v) mit 1 % AcOH, 6 h, RT über Molekularsieb (4 Å). Die Inhibitionskonstanten (K_i -Werte) von **6b**, **8** und **9** für Caspase-3 wurden in einem Enzym-Funktionsassay bestimmt.

Eine chemisch stabile Kombination der besten Fragment-„Hits“ lieferte den stärksten bislang bekannten Caspase-3-Inhibitor **9**. Die hier beschriebene, dynamische Methode zum Kooperativitätsscreening ermöglicht es, die Beiträge einzelner Fragmente zur Bindung in einem Ligationssystem zu unterscheiden und zu analysieren. Durch die Verwendung eines FP-basierten Bindungsassays ist die Methode breit anwendbar, sowohl für Zielenzyme als auch für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Fragment-„Hits“, die durch diesen Assay gewonnen wurden, können direkt für die rationale Konstruktion von verbesserten Proteinliganden verwendet werden.

Experimentelles

Synthesevorschriften und analytische Daten neuer Verbindungen sind in den Hintergrundinformationen niedergelegt.

Fluoreszenzpolarisations (FP)-Assays wurden in unbehandelten schwarzen 384er-Mikrotiterplatten (Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande) mit dem Plattenlesegerät Genios Pro (Tecan, Crailsheim, Deutschland) durchgeführt (Pufferbedingungen: 50 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.5 % CHAPS und 1 mM EDTA). Das Peptidyl- α -ketoaldehyd **6a** wurde bei einer Konzentration von 10 nM gegen verschiedene Konzentrationen von Caspase-3 (0–100 nM) in einem Gesamtvolumen von 10 μL titriert. Die Anregungswellenlänge lag bei 485 nm, die Emissionswellenlänge wurde auf 535 nm eingestellt. Die FP-Messdaten wurden mit GraphPad Prism 4 für Windows (GraphPad, La Jolla, USA) durch nichtlineare Regression ausgewertet (Kurvenanpassung).

Das thermodynamische Modell für die Unterscheidung zwischen kooperativer und additiver Binding ist in den Hintergrundinformationen detailliert dargestellt. Dafür wurden FP- und Enzyminhibi-

tionsdaten (Abbildung 3a) durch die Gleichungen (1) und (2) in Bindungsisothermen umgewandelt (Abbildung 3b; alle Gleichungen finden sich in den Hintergrundinformationen). Bindungsdaten für verschiedene Konzentrationen von **8** wurden dann mithilfe von vier Gleichgewichtsgleichungen [Gl. (3)–(6)] und drei Gleichungen für die Massenerhaltung [Gl. (7)–(9)] angepasst, um die Ligationskonstante K_C zu ermitteln.

Eingegangen am 25. März 2009

Online veröffentlicht am 23. Juli 2009

Stichwörter: Caspase-3 · Fluoreszenzpolarisation · Hochdurchsatz-Screening · Proteaseinhibitoren · Wirkstoff-Forschung

- Übersichten: a) D. Fattori, A. Squarcia, S. Bartoli, *Drugs R&D* **2008**, 9, 217–227; b) P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 211–219; c) J. Rademann, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 4654–4656; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4554–4556; d) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3652–3711; e) D. A. Erlanson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17, 643–652.
- W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 4046–4050.
- a) I. Huc, J. M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2106–2110; b) J. M. Lehn, A. Eliseev, *Science* **2001**, 291, 2331–2332.
- a) S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, 274, 1531–1534; b) V. L. Nienhaber, P. L. Richardson, V. J. Klinghofer, J. J. Bousha, J. Greer, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1105–1108; c) P. Vongvilai, M. Angelin, R. Larsson, O. Ramström, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 966–968; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 948–950.
- a) T. L. Blundell, H. Jhoti, C. Abell, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 45–54; b) A. Sharff, H. Jhoti, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 340–345; c) W. J. Sanders et al., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1709–1718.
- a) D. A. Erlanson, J. A. Wells, A. C. Braisted, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2004**, 33, 199–223; b) D. A. Erlanson, J. W. Lam, C. Wiesmann, T. N. Luong, R. L. Simmons, W. L. DeLano, I. C. Choong, M. T. Burdett, W. M. Flanagan, D. Lee, E. M. Gordon, T. O'Brien, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 308–314.
- M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 3319–3323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3275–3278.
- A. Whitty, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 435–439.
- V. Uryga-Polowy, D. Kosslick, C. Freund, J. Rademann, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2452–2462.
- M. O. Hengartner, *Nature* **2000**, 407, 770–776.
- D. W. Nicholson, *Nature* **2000**, 407, 810–816.
- a) M. Garcia-Calvo, E. P. Peterson, B. Leiting, R. Ruel, D. W. Nicholson, N. A. Thornberry, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32608–32613; b) B. H. Han et al., *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 30128–30136; c) D. Lee et al., *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 16007–16014; d) Y. Han et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1173–1180; e) J. Sakai, A. Yoshimori, Y. Nose, A. Mizoroki, N. Okita, R. Takasawa, S. Tanuma, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4854–4859; f) D. R. Goode, A. K. Sharma, J. Hergenrother, *Org. Lett.* **2005**, 7, 3529–3532.
- C. Godoy-Alcántar, A. K. Yatsimirsky, J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18, 979–985.
- a) A. El-Dahshan, S. Weik, J. Rademann, *Org. Lett.* **2007**, 9, 949–952; b) S. Weik, T. Luksch, A. Evers, J. Böttcher, A. Hasilik, H.-G. Löffler, G. Klebe, J. Rademann, *ChemMedChem* **2006**, 1, 445–457; c) S. Weik, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2595–2598; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2491–2494.