

Niedermolekulare Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen der E3-Ligase VHL und HIF1 α **

Dennis L. Buckley, Jeffrey L. Gustafson, Inge Van Molle, Anke G. Roth, Hyun Seop Tae, Peter C. Gareiss, William L. Jorgensen, Alessio Ciulli und Craig M. Crews*

Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) sind für die meisten biologischen Prozesse von großer Bedeutung, ihre gezielte Manipulation erweist sich jedoch als schwierig, vor allem wegen der relativ großen Oberfläche und dem Fehlen tiefer Taschen.^[1] Große α -Helix-Mimetika konnten für gezielte Manipulationen genutzt werden,^[2–5] jedoch bleibt die Entwicklung von wirkstoffartigen niedermolekularen Inhibitoren von PPIs eine Herausforderung. Erste Erfolge wurden durch virtuelles Screening,^[6] einen fragmentbasierten Ansatz^[7] und das Targeting von Hot-Spots^[8] erzielt, allerdings blieb die „Trefferquote“ für Protein-Schnittstellen niedrig.^[1c]

PPI-Komponenten mit einem vielversprechenden therapeutischen Potenzial sind E3-Ligasen. E3-Ligasen binden an ihre Proteinsubstrate und ermöglichen so den Transfer von Ubiquitin-Untereinheiten zur Markierung des Zielproteins unter Zuhilfenahme von E2-Enzymen. Generell steuern E3-Ligasen einen breiten Bereich biologischer Prozesse und sind daher als Wirkstofftargets von großem Interesse.^[9] Allerdings konnten seit der Entdeckung der Nutline, der ersten niedermolekularen E3-Ligase-Inhibitoren,^[10] nur einige wenige E3-Ligasen gezielt kontrolliert werden.^[11–13]

Das von-Hippel-Lindau-Protein (VHL) ist eine Unter Einheit des (E3-Ligase)-Ubiquitin-Komplexes, der den prolylhydroxylierten Transkriptionsfaktor HIF1 α erkennt und für den proteasomalen Abbau markiert (Abbildung 1).^[14] Unter hypoxischen Bedingungen können Prolylhydroxylasen (PHDs) HIF1 α jedoch nicht hydroxylieren, was wiederum zu einer Akkumulation von HIF1 α und zu einer Hochregulierung der an der hypoxischen Antwort beteiligten Enzyme wie GLUT1, VEGF und Erythropoietin führt. Eine Stabilisierung von HIF1 α mithilfe von PHD-Inhibitoren^[15] wird gegenwärtig

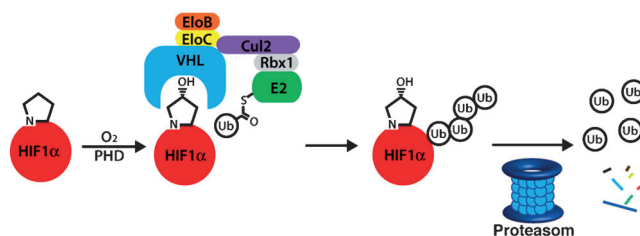


Abbildung 1. HIF1 α ist unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert und wird durch VHL erkannt, worauf sich die Ubiquitinierung und der Abbau durch das Proteasom anschließen.

als Behandlung für chronische Anämie klinisch untersucht.^[16] Alternativ konnte durch eine Fusion von peptidischen Inhibitoren an die Tat-Translokationsdomäne gezeigt werden, dass die Inhibition der VHL/HIF1 α -Interaktion zu einer Stabilisierung von HIF1 α führt.^[17] Infolgedessen kann eine Inhibition der PPI als alternative oder ergänzende Strategie zu PHD-Inhibitoren zur Behandlung von Anämie in Betracht gezogen werden.

Erst kürzlich haben wir eine Reihe von VHL-Liganden beschrieben (z. B. 1; siehe Tabelle 1), die in der Lage sind, die Bindung eines fluoreszierenden, von HIF1 α abgeleiteten Peptids an VHL kompetitiv zu inhibieren.^[18] Die beschriebenen Inhibitoren setzen sich aus einem Hydroxyprolinrest, der für die Bindung an VHL von entscheidender Bedeutung ist,^[19] und einem Isoxazolylacetamid-Fragment zusammen. Letzteres wurde für die Interaktion mit einem speziellen Wassermolekül gewählt, das aufgrund des Wasserstoffbrückennetzwerks zwischen VHL und HIF1 α zuvor als relevant identifiziert wurde.^[20] Allerdings binden diese Moleküle mit limitierter Wirksamkeit, und es wurden zunächst nur einige wenige Analoga synthetisiert, wodurch eine zuverlässige Aussage über Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) erschwert wurde. Hier berichten wir über eine detaillierte SAR-Studie von VHL-Liganden, einschließlich der Auffindung verschiedener N-terminaler Fragmente mit einem alternativen Bindungsmodus, wie durch Röntgenkristallographie gezeigt werden konnte. Eine Optimierung der C- und N-terminalen Fragmente, sowie deren Kombination, lieferte unseren bisher stärksten Liganden mit einem IC₅₀-Wert im submikromolaren Bereich.

Während der Affinitätsoptimierung der C-/N-terminalen Fragmente versuchten wir, die Unterschiede der Ligandenlöslichkeit durch das Testen der Bindungsaffinitäten in einem kompetitiven Fluoreszenzpolarisationsverfahren unter Verwendung verschiedener DMSO-Konzentrationen (10 % DMSO sowie, physiologisch relevanter, 1 % DMSO) zu mi-

[*] D. L. Buckley, Dr. J. L. Gustafson, Dr. A. G. Roth, Dr. H. S. Tae, Dr. P. C. Gareiss, Prof. W. L. Jorgensen, Prof. C. M. Crews
Departments of Chemistry, Molecular, Cellular & Developmental Biology and Pharmacology, and Center for Molecular Discovery, Yale University
New Haven, Connecticut 06511 (USA)
E-Mail: craig.crews@yale.edu

Dr. I. Van Molle, Dr. A. Ciulli
Department of Chemistry, University of Cambridge
Lensfield Road, Cambridge CB2 1EW (Großbritannien)

[**] Wir danken dem NIH (AI084140, GM032136), dem BBSRC (BB/G023123/1) und der EC (PIEF-GA-2010-275683) für finanzielle Unterstützung. J.L.G. dankt dem NIH für ein Postdoc-Stipendium (F32GM10052101). A.G.R. ist Postdoc-Stipendiatin der Leopoldina – Nationale Akademie der Wissenschaften. Wir danken dem Personal der Beamline Proxima-1 am Synchrotron Soleil.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206231> zu finden.

nimieren.^[18] Generell wurden unter beiden Bedingungen ähnliche Trends in der Affinität beobachtet. Interessanterweise fanden wir in Fällen, in denen die Löslichkeit kein Problem war, dass die Liganden in 1 % DMSO einen niedrigeren IC₅₀-Wert hatten.

Nach der Auffindung von Verbindung **1**^[18] suchten wir systematisch nach weiteren fünfgliedrigen heteroaromatischen Substituenten (Tabelle 1). Tests verschiedener Oxazole (**1**, **2**, **3**) und Thiazole (**4**, **5**, **6**, **7**) ergaben, dass die ursprüngliche Substitution an der 5-Position des heteroaromatischen Substituenten und in *para*-Position des Arylrings optimal war.

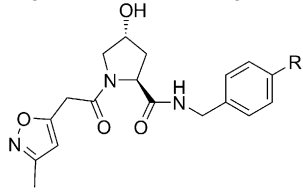
Eine provisorische Molekülmodellierung deutete an, dass die Verwendung eines *N*-Methylpyrrols oder eines 4-Methylazols zu einer Erhöhung der hydrophoben Wechselwirkung mit dem Pro99 des VHL führen könnte. Während die *N*-Methylpyrrole nur mäßige Aktivitäten zeigten, erwies sich das 4-Methyloxazol **3** annähernd so aktiv wie Verbindung **1**. Das 4-Methylthiazol **6** hingegen war bei einer DMSO-Konzentration von 1 % nicht nur potenter als **4**, sondern auch wirksamer als das Oxazol **1**.
















Mit Blick auf die offensichtliche H-Donierung des Oxazol-C-H an die Carbonylfunktion des Pro99^[18] versuchten wir, die Wirksamkeit der Liganden durch Verwendung besserer H-Brücken-Donoren zu erhöhen. Das zunächst untersuchte Imidazol **11** zeigte jedoch eine schwächere Bindungsaffinität. Die Pyrazole **12** und **13** zeigten moderate Affinitäten, wenn auch schwächer als **1**. Informativ war der direkte Vergleich des Pyrazols **15** mit dem Isoxazol **14**, das nicht als H-Brücken-Donor fungieren kann, denn damit konnte nachgewiesen werden, dass die Bildung einer Wasserstoffbrücke zu einer deutlichen Steigerung der Affinität führt.

Parallel dazu haben wir versucht, das N-terminale Fragment zu optimieren, wobei wir das *p*-Chlorbenzylamino-Fragment von **16** (das sich durch seine geringe Größe und gute Verfügbarkeit des Ausgangsmaterials auszeichnet) konstant hielten. Zunächst wurden Aryl- und Heteroarylacetamide untersucht, die jedoch schwächere Affinitäten zeigten als das Isoxazol-Fragment. Dies galt auch für das Pyrazol **22** und die Imidazole **19** und **21**, die wegen ihrer erhöhten H-Brücken-Akzeptorfähigkeiten eigentlich stärker mit dem Strukturwassermolekül wechselwirken sollten.^[21] Das Testen andersartiger Fragmente erbrachte schließlich mehr Erfolg (Tabelle 2), und die Aktivität des Chlorbenzamid **24** erreichte nahezu die des Isoxazolacetamids **16**.

Um die Art der Bindung des Chlorbenzamid-Fragments aufzuklären, wurde die Kristallstruktur von **24** mit dem pVHL-ElonginB-ElonginC-Komplex (VCB) ermittelt (Abbildung 2). Die Struktur belegt, dass sich zwar der Hydroxyprolinkern leicht umorientiert, viele der vorher genannten Wechselwirkungen jedoch beibehalten werden.^[18] So zeigen sich Wasserstoffbrücken von der Hydroxygruppe zu S111 und H115 und von der Amidgruppe zum H110-Rückgrat und zur Y98-Seitenkette. Interessanterweise bindet hier das N-terminale Fragment eindeutig in einer alternativen Weise an VHL. Während der Isoxazolrest mit dem zuvor identifizierten Strukturwasser interagiert^[20] und zu N67, R69 und H115 band, orientiert sich das Benzamid von der Wassertasche weg und richtet sich an der Seitenkette von W88 aus.

Tabelle 1: Optimierung des C-terminalen Fragments.



Verb.	R (<i>para</i>)	IC ₅₀ [μM] ^[a] (10% DMSO)	IC ₅₀ [μM] ^[a] (1% DMSO)
1		7.0 ± 0.5	4.1 ± 0.4 ^[b]
2		11 ± 1	n.b.
3		5.1 ± 0.2	12.7 ± 0.7
4		17 ± 1	14.0 ± 0.5
5		119 ± 2	77 ± 3
6		3.8 ± 0.3	3.2 ± 0.4
7		17.0 ± 0.4	19 ± 1
8		16.4 ± 0.6	32 ± 4
9		17.8 ± 0.3	33 ± 9
10		36 ± 12	19 ± 2
11		270 ± 20	180 ± 10
12		12.1 ± 0.6	8.97 ± 0.07
13		50 ± 10	43 ± 2
14		120 ± 30	70 ± 10
15		18 ± 2	32 ± 3

[a] IC₅₀-Werte (mit Standardabweichung vom Mittelwert; SEM) wurden durch Verdrängung des von HIF abgeleiteten fluoreszenten Peptides FAM-DEALA-Hyp-YIPD aus dem VCB-Komplex (pVHL-ElonginB-ElonginC-Komplex) bestimmt. n.b. = nicht bestimmt. [b] Literaturwert.^[18]

Im nächsten Schritt synthetisierten wir eine Reihe von Benzamiden und fanden eine Vielzahl von Verbindungen mit verbesserter Bindungsstärke (Tabelle 3). Insbesondere das 3-Amino-2-methylbenzamid **28**, das *m*-Cyanobenzamid **33** und das 2-Brom-4-chlorbenzamid **36** zeigten höhere Affinitäten

Tabelle 2: Exploration diverser N-terminaler Fragmente und die Auffindung des Benzamid-Fragments.

Verb.	R	IC ₅₀ [μM] ^[a] (10%DMSO)
16		38 ± 3
17		330 ± 10
18		> 1000
19		> 1000
20		280 ± 40
21		> 1000
22		372 ± 7
23		300 ± 50
24		52 ± 2

[a] IC₅₀-Werte (mit SEM) wurden durch Verdrängung von FAM-DEALA-Hyp-YIPD aus dem VCB-Komplex bestimmt.

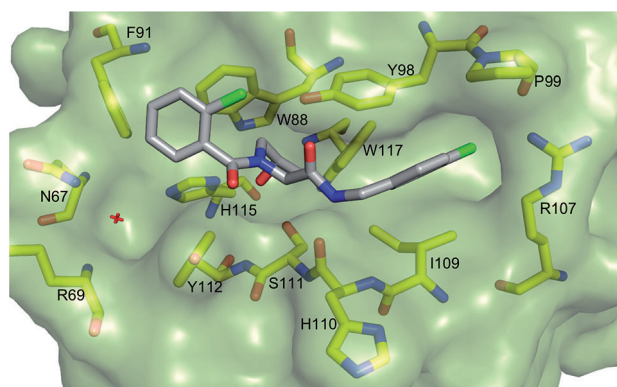


Abbildung 2. Kristallstruktur von VCB im Komplex mit **24**. pVHL ist als blassgrüne Oberfläche dargestellt. Der Ligand ist als graues Stabmodell gezeigt, und pVHL-Reste, die die Bindungstasche bilden, sind als gelbe Stabmodelle gezeigt.

Tabelle 3: Optimierung des N-terminalen Benzamid-Fragments.

Verb.	R	IC ₅₀ [μM] ^[a] (10%DMSO)
24	2-Cl	52 ± 2
25	H	110 ± 3
26	3,4-Dimethoxy	24 ± 2
27	2-NH ₂	38 ± 1
28	3-NH ₂ , 2-Me	10.4 ± 0.8
29	4-NH ₂	29 ± 3
30	4-Cl	70 ± 10
31	3-F	38.5 ± 0.5
32	3-Br	19.6 ± 0.8
33	3-CN	8.9 ± 0.1
34	3-OMe	26.3 ± 0.4
35	3-OH	17 ± 0.6
36	2-Br, 4-Cl	15.5 ± 0.4
37	3-Ph	33 ± 4
38	Isonicotinamid	32 ± 1

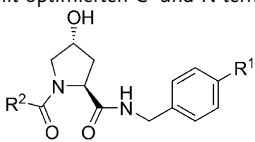


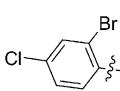


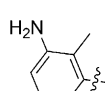
[a] IC₅₀-Werte (mit SEM) wurden durch Verdrängung von FAM-DEALA-Hyp-YIPD aus dem VCB-Komplex bestimmt.

als das Isoxazolacetamid **16**. Darüber hinaus konnte ein großer Substituent in der *meta*-Position eingeführt werden, ohne dass es zu einem Verlust an Affinität kam.

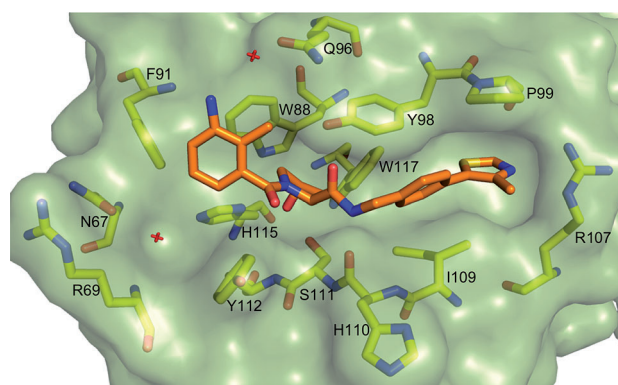
Nach der unabhängigen Optimierung der beiden äußeren Fragmente versuchten wir, die Affinität des gesamten Moleküls durch einen kombinatorischen Ansatz zu verbessern (Tabelle 4). Dabei wurde in der Ethoxybenzamid-Klasse der gleiche Trend wie beim ursprünglichen Isoxazolyacetamid beobachtet, wo die Affinität beim Austausch des C-terminalen Aryl-Substituenten vom Chlor- (**39**) über den Oxazoly- (**40**) zum Methylthiazolyl-Substituenten (**41**) anstieg. In allen anderen Fällen war das Oxazoly-Derivat schlechter als das Chlor- und das Methylthiazolyl-Derivat. In allen außer einem Fall zeigte die Verbindung mit dem Methylthiazol-Fragment die höchste Affinität. Den besten Wert erzielte Verbindung **51**, die VHL mit einem IC₅₀ von 0.9 μM in 1 % DMSO bindet. Verbindung **51** ist bislang die einzige niedermolekulare Verbindung, die die Interaktion zwischen VHL und dem HIF1α-Peptid mit einem IC₅₀ unter 1 μM inhibiert.

Abbildung 3 zeigt die Kristallstruktur des Liganden **51** im Komplex mit VCB. Die optimierte Methylthiazolyl-Einheit des C-terminalen Fragments bindet in ähnlicher Weise wie das zuvor kristallisierte und beschriebene Oxazoly-Fragment **1**.^[18] Die Methylgruppe ist dem Lösungsmittel ausgesetzt, sodass das größere und hydrophobere Aren-Schwefelatom besser in die kleine hydrophobe Tasche unterhalb von P99 passt als der entsprechende Sauerstoff in **1**. Während sich der Arylring des N-terminalen Fragments ähnlich orientiert wie in **24**, überrascht jedoch die Ausrichtung des Anilins. Anstatt mit dem Strukturwasser, das in der Tasche von N67, R69 und H115 gebunden wird, zu interagieren (wie zuvor auch für das Isoxazol-Fragment gezeigt), scheint das Anilin eine gänzlich neuartige wassermedierte Wasserstoffbrücke zum Q96 der Seitenkette einzugehen.

Tabelle 4: VHL-Liganden mit optimierten C- und N-terminalen Fragmenten.

Verb.	R ¹	R ² [b]	IC ₅₀ [μM] ^[a] (10% DMSO)	IC ₅₀ [μM] ^[a] (1% DMSO)	K _i ^[b] [μM]
16	Cl		37.8 ± 3.1	20.5 ± 1.9 ^[c]	15.2
1	5-Oxazol		7.0 ± 0.5	4.1 ± 0.4 ^[c]	3.0
6	5-(4-Methyl)thiazol		3.8 ± 0.3	3.2 ± 0.4	2.4
39	Cl		62.9 ± 2.0	n.b.	n.b.
40	5-Oxazol		27.0 ± 0.7	19.5 ± 1.0	14.5
41	5-(4-Methyl)thiazol		14.1 ± 0.3	11.2 ± 0.9	8.3
32	Cl		19.6 ± 0.8	n.b.	n.b.
42	5-Oxazol		39.5 ± 3.7	31.5 ± 1.9	23.3
43	5-(4-Methyl)thiazol		7.7 ± 0.4	26.8 ± 1.8	19.9
36	Cl		17.0 ± 0.6	n.b.	n.b.
44	5-Oxazol		21.2 ± 0.4	24.1 ± 0.6	17.8
45	5-(4-Methyl)thiazol		4.9 ± 0.2	11.9 ± 0.7	8.8
33	Cl		8.0 ± 0.1	n.b.	n.b.
46	5-Oxazol		40.3 ± 3.9	47.3 ± 1.3	35.1
47	5-(4-Methyl)thiazol		12.0 ± 0.5	11.0 ± 0.8	8.1
35	Cl		17.0 ± 0.6	n.b.	n.b.
48	5-Oxazol		23.4 ± 0.4	18.0 ± 0.4	13.3
49	5-(4-Methyl)thiazol		3.5 ± 0.2	3.71 ± 0.03	2.8
28	Cl		10.4 ± 0.8	n.b.	n.b.
50	5-Oxazol		18.9 ± 2.3	14.0 ± 0.7	10.4
51	5-(4-Methyl)thiazol		1.76 ± 0.06	0.90 ± 0.03	0.67

[a] IC₅₀-Werte (mit SEM) wurden durch Verdrängung von FAM-DEALA-Hyp-YIPD aus dem VCB-Komplex bestimmt. [b] K_i-Werte wurde ausgehend von den IC₅₀-Werten (1% DMSO) berechnet, wie von Huang beschrieben.^[22] [c] Literaturwert.^[18]


Abbildung 3. Kristallstruktur von VCB im Komplex mit 51. pVHL ist als blassgrüne Oberfläche dargestellt. Der Ligand ist als orangefarbenes Stabmodell gezeigt, und pVHL, die die Bindungstasche bilden, sind als gelbe Stabmodelle gezeigt.

Zusammengefasst haben wir über ein struktur-basiertes Design und die Synthese von neuartigen VHL-Liganden berichtet und Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgezeigt. Wir haben die beiden Fragmente des Liganden optimiert und stießen dabei auf die neue Klasse der N-terminalen Benzamid-Fragmente. Die intermolekularen Wechselwirkungen wurden durch Röntgenkristallographie des Protein-Ligand-Komplexes aufgeklärt, wobei sich sowohl ein neues Bindungsmuster als auch eine neuartige wasservermittelte Wasserstoffbrücke zeigten. Als der wirksamste VHL-Ligand erwies sich die Verbindung **51**, der erste submikromolare niedermolekulare Inhibitor der Wechselwirkung zwischen VHL und einem von HIF1α abgeleiteten Peptid. Zukünftige Studien werden vor allem das Ziel haben, weitere VHL-Inhibitoren mit verbesserter Zellpermeabilität zu entwickeln.

Eingegangen am 3. August 2012

Online veröffentlicht am 12. Oktober 2012

Stichwörter: E3-Ubiquitin-Ligasen · Proteinkristallographie · Protein-Protein-Interaktionen · Strukturbasiertes Design · Wirkstoff-Forschung

- [1] a) M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, 3, 301–317; b) P. Chène, *ChemMedChem* **2006**, 1, 400–411; c) J. A. Wells, C. L. McClelland, *Nature* **2007**, 450, 1001.
- [2] R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijtzter, J. Kemmink, *ChemBioChem* **2011**, 12, 1626.
- [3] a) S. Baek, P. S. Kutchukian, G. L. Verdine, R. Huber, T. A. Holak, K. W. Lee, G. M. Popowicz, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 103; b) F. Bernal, A. F. Tyler, S. J. Korsmeyer, L. D. Walensky, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 2456.
- [4] D. G. Udugamasooriya, S. P. Dineen, R. A. Brekken, T. Kodadek, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5744.
- [5] M. D. Boersma, H. S. Haase, K. J. Peterson-Kaufman, E. F. Lee, O. B. Clarke, P. M. Colman, B. J. Smith, W. S. Horne, W. D. Fairlie, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 315.
- [6] T. Geppert, S. Bauer, J. A. Hiss, E. Conrad, M. Reutlinger, P. Schneider, M. Weisel, B. Pfeiffer, K.-H. Altmann, Z. Waibler, G. Schneider, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 264; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 258.
- [7] a) T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. Wang, G. Fang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 5299–5304; b) Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 6244; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 6140.
- [8] D. Kozakov, D. R. Hall, G.-Y. Chuang, R. Cencic, R. Brenke, L. E. Grove, D. Beglov, J. Pelletier, A. Whitty, S. Vajda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 13528.
- [9] a) L. Bedford, J. Lowe, L. R. Dick, R. J. Mayer, J. E. Brownell, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 29; b) P. Cohen, M. Tcherpakov, *Cell* **2010**, 143, 686.

- [10] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844.
- [11] a) T. K. Oost, C. Sun, R. C. Armstrong, A.-S. Al-Assaad, S. F. Betz, T. L. Deckwerth, H. Ding, S. W. Elmore, R. P. Meadows, E. T. Olejniczak, A. Oleksijew, T. Oltersdorf, S. H. Rosenberg, A. R. Shoemaker, K. J. Tomaselli, H. Zou, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4417; b) H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, C.-Y. Yang, L. Xu, M. Liu, Y. Tomita, H. Pan, Y. Yoshioka, K. Krajewski, P. P. Roller, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 16686.
- [12] M. Aghajan, N. Jonai, K. Flick, F. Fu, M. Luo, X. Cai, I. Ouni, N. Pierce, X. Tang, B. Lomenick, R. Damoiseaux, R. Hao, P. M. Del Moral, R. Verma, Y. Li, C. Li, K. N. Houk, M. E. Jung, N. Zheng, L. Huang, R. J. Deshaies, P. Kaiser, J. Huang, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 738.
- [13] S. Orlicky, X. Tang, V. Neduva, N. Elowe, E. D. Brown, F. Scherri, M. Tyers, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 733.
- [14] a) W. G. Kaelin, Jr., *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 865–873; b) G. L. Semenza, *Trends Mol. Med.* **2001**, 7, 345.
- [15] a) D. Rotili, M. Altun, A. Kawamura, A. Wolf, R. Fischer, I. K. H. Leung, M. M. Mackeen, Y.-M. Tian, P. J. Ratcliffe, A. Mai, B. M. Kessler, C. J. Schofield, *Chem. Biol.* **2011**, 18, 642; b) Y.-M. Tian, K. K. Yeoh, M. K. Lee, T. Eriksson, B. M. Kessler, H. B. Kramer, M. J. Edelman, C. Willam, C. W. Pugh, C. J. Schofield, P. J. Ratcliffe, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 13041.
- [16] E. Muchnik, J. Kaplan, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2011**, 20, 645.
- [17] C. Willam, N. Masson, Y.-M. Tian, S. A. Mahmood, M. I. Wilson, R. Bicknell, K.-U. Eckardt, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, C. W. Pugh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 10423.
- [18] a) D. L. Buckley, I. Van Molle, P. C. Gareiss, H. S. Tae, J. Michel, D. J. Noblin, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 4465; b) I. Van Molle, A. Thomann, D. L. Buckley, E. C. So, S. Lang, C. M. Crews, A. Ciulli, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1300–1312.
- [19] C. Loenarz, J. Mecinovic, R. Chowdhury, L. A. McNeill, E. Flashman, C. J. Schofield, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 1816; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 1784.
- [20] W.-C. Hon, M. I. Wilson, K. Harlos, T. D. W. Claridge, C. J. Schofield, C. W. Pugh, P. H. Maxwell, P. J. Ratcliffe, D. I. Stuart, E. Y. Jones, *Nature* **2002**, 417, 975.
- [21] N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2529.
- [22] X. Huang, *J. Biomol. Screening* **2003**, 8, 34.