

•专题•

doi: 10.3866/PKU.DXHX202004127

www.dxhx.pku.edu.cn

磷酸胺酯前药策略及 ProTide 技术在抗病毒药物研发中的应用

孙孝斌, 苗志伟*

南开大学化学学院, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071

摘要: 抗病毒药物是人类战胜病毒的有力武器, 2019 年底爆发的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情给人类带来巨大危害, 同时也使人们意识到研发抗病毒药物的重要性。本文综述了磷酸胺酯前药策略及 ProTide 技术在抗病毒药物研发中的应用, 介绍了核苷-磷酸胺酯前药的合成策略, 概述了核苷-磷酸胺酯在不同抗病毒药物中的应用, 为新型抗病毒药物研发提供借鉴和参考。

关键词: 抗病毒药物研发; 核苷-磷酸胺酯前药; ProTide 技术

中图分类号: G64; O6

Application of Phosphoramidate Prodrugs Strategies and ProTide Technology in Anti-Virus Drug Discovery

Xiaobin Sun, Zhiwei Miao *

State Key Laboratory of Elemento-Organic Chemistry, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, P. R. China.

Abstract: Antiviral drug is a powerful weapon for humans to defeat the virus. The spread of 2019 novel coronavirus pneumonia (COVID-19) outbreak has a serious impact on the world. At the same time, it also makes people aware of the importance of antiviral drug development. This article reviews the application of the phosphoramidate prodrug strategy and the application of ProTide technology in the development of antiviral drugs. The synthesis methods of nucleoside-phosphoramidate prodrugs are introduced. The application of nucleoside-phosphoramidate in different antiviral drugs is also summarized. This review can provide a reference for the development of new antiviral drugs in the future.

Key Words: Anti-virus drug discovery; Nucleoside-phosphoramidate prodrugs; ProTide technology

2013 年 12 月 6 日, 美国 FDA (美国食品药品监督管理局)批准吉利德科学公司(Gilead Sciences)抗丙型肝炎病毒(HCV)新药索非布韦(Sofosbuvir)的上市申请, 索非布韦是含氟核苷酸类似物磷酸胺酯前药, 是一种有效的口服 HCV NS5B 聚合酶抑制剂, 对丙肝病毒有很强抑制作用, 是治疗慢性丙型肝炎抗病毒联合药物治疗的重要组成部分之一(图 1)^[1], 丙肝患者治愈率高达 90%。索非布韦上市第一年其全球销售额便超过 100 亿美元, 成为名副其实的“重磅炸弹”药物(Blockbuster drug)^[2]。

2016 年 11 月 11 日, 美国 FDA 又批准了吉利德公司替诺福韦艾拉酚胺(Vemlidy®, Tenofovir Alafenamide, 25 mg)用于治疗慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染的上市申请。Vemlidy®是靶向性替诺福韦(Tenofovir)磷酸胺酯前药(图 1), 与前期研发的替诺福韦酯 Viread®相比, Vemlidy®只需要使用少于十分之一 Viread®的剂量就可达到同等的抗病毒功效。临床数据显示, Vemlidy®之所以可以使用更低的给药

收稿: 2020-04-30; 录用: 2020-07-04; 网络发表: 2020-07-08

*通讯作者, Email: miaozhiwei@nankai.edu.cn

基金资助: 天津市科技支撑重点项目(19YFZCSN00240); 南开大学中央高校基本科研业务费专项资金(63201023)

剂量治疗慢性乙型肝炎, 是因为其具有更大的血浆稳定性, 可更有效地将替诺福韦递送到肝细胞^[3]。

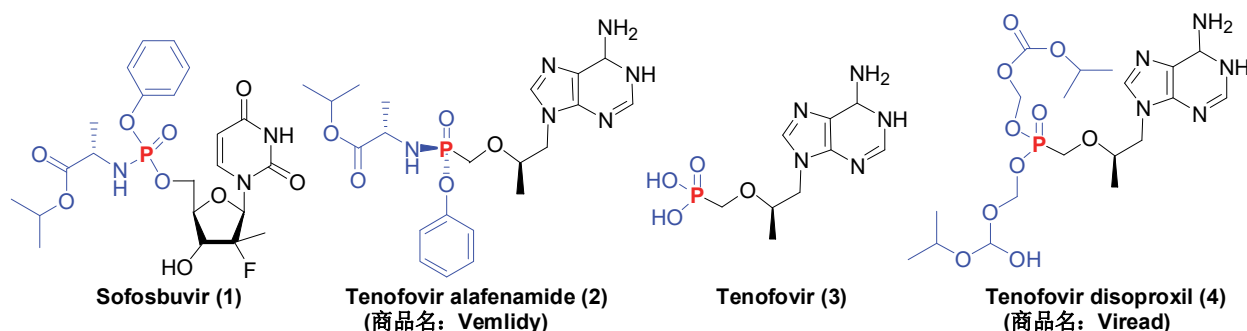


图1 索非布韦(1)、替诺福韦艾拉酚胺(2)、替诺福韦(3)和替诺福韦酯(4)的结构

从分子结构分析可以发现吉利德公司研发的治疗丙肝和乙肝药物索非布韦和替诺福韦艾拉酚胺均含有核苷-磷酸酯骨架结构, 其药物设计思想是通过磷酸酯前药技术(ProTide 技术)将极性基团隐蔽来降低化合物极性, 增加亲脂性进而增加细胞透膜性, 磷酸酯前药进入细胞后经特定酶代谢释放出原型药物发挥治疗作用(图2)。本文拟对磷酸酯前药策略和 ProTide 技术的历史和发展状况进行综述, 并介绍该技术在抗病毒药物研发中发挥的重要作用。

1 ProTide 技术的历史和发展介绍

ProTide (源于 PROdrug + nucleoTIDE)技术是 20 世纪 90 年代初由英国卡迪夫大学药学院 McGuigan 教授领导的团队首先发展起来的药物研发技术, 其技术核心就是通过前药方式, 主要是利用芳香取代基模体和氨基酸酯组成的结构, 以磷酸酯的形式将核苷类似物更加方便和有效地传输进入细胞内^[4]。磷酸酯进入细胞以后首先被酯酶代谢成为一个前药(Prodrug), 进一步脱除一个氨基酸基团, 形成另一个单磷酸分子的药物(NMP), NMP 经过 NMP-kinase 代谢成为二磷酸核苷酸(NDP), 再经 NDP-kinase 代谢成为三磷酸核苷酸(NTP)最终发挥作用(图2)^[5]。

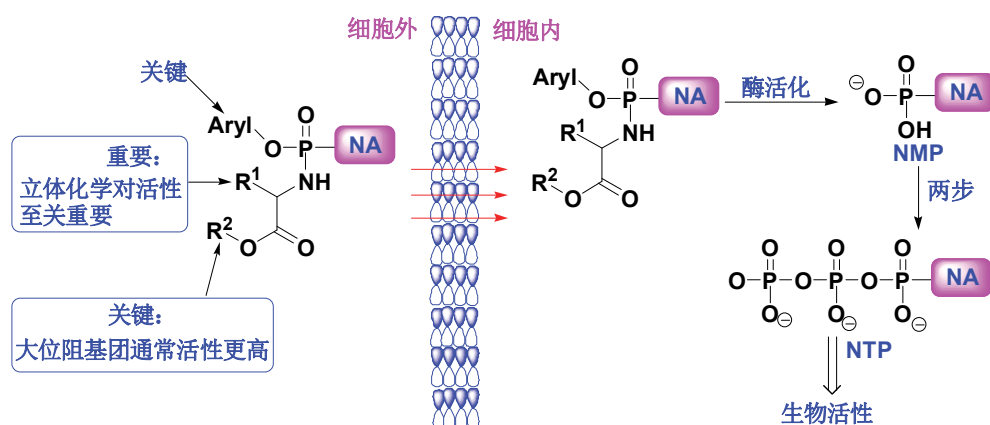


图2 磷酸酯进入细胞传送磷酸前药示意图^[4]

在抗病毒药物设计中, 前药策略(Prodrug)被广泛采用, 通过磷酸酯前药技术将具有抗病毒活性的核苷极性基团隐蔽, 降低化合物极性, 增加亲脂性进而增加细胞透膜性。磷酸酯前药进入细胞后经特定酶代谢释放原型药物, 原型药物经磷酸化后发挥药效。前药策略主要的作用是: (1) 通过改善药物的理化性质, 提高药物的传输速率和选择性; (2) 提高药物的生物利用度; (3) 对水溶性差的母体药物通过磷酸酯化提高药物的水溶性; (4) 通过改变给药方式, 延长药物作用时间, 方便患者; (5) 降低药物毒性, 提高药物的安全性^[6]。

2020年2月1日,美国报道其首例新型冠状病毒感染者康复,起作用的关键药物是吉利德科学公司设计的广谱抗病毒药物瑞德西韦(Remdesivir)(图3)^[7]。瑞德西韦就是磷酰胺酯前药策略及ProTide技术在抗病毒药物研发中的成功应用,其作用机制是抑制病毒复制所依赖的RNA聚合酶(RdRp)活性,从而阻断病毒的复制达到治疗的效果^[8]。冠状病毒因为包膜上密布着类似日冕的棘突而得名,属于冠状病毒科(Coronaviridae),正冠状病毒亚科(Orthocoronavirinae)的冠状病毒属(Coronavirus)。直径约80–120 nm,基因组5'端具有甲基化的帽状结构,3'端具有poly(A)尾,基因组全长约27–32 kb,是目前已知RNA病毒中基因组最大的病毒(图4)^[8]。

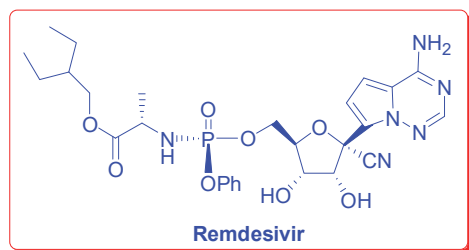


图3 瑞德西韦分子结构

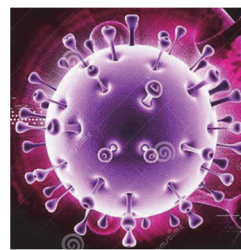


图4 冠状病毒结构图

经过近20年的研究和开发,磷酰胺酯前药策略及ProTide技术在抗病毒药物研发领域取得极大成功。ProTides技术的关键就是对核苷和核苷酸的母体结构在糖羟基的位置上用磷酸化的方式引入芳氧基和氨基酸(如L-丙氨酸)而形成磷酰胺酯即芳氧基磷酰胺三酯(Aryloxy phosphoramidate triesters)^[9]。目前至少有9个临床药物(图5)是采用ProTides技术进行研发的,其中的两个重磅炸弹

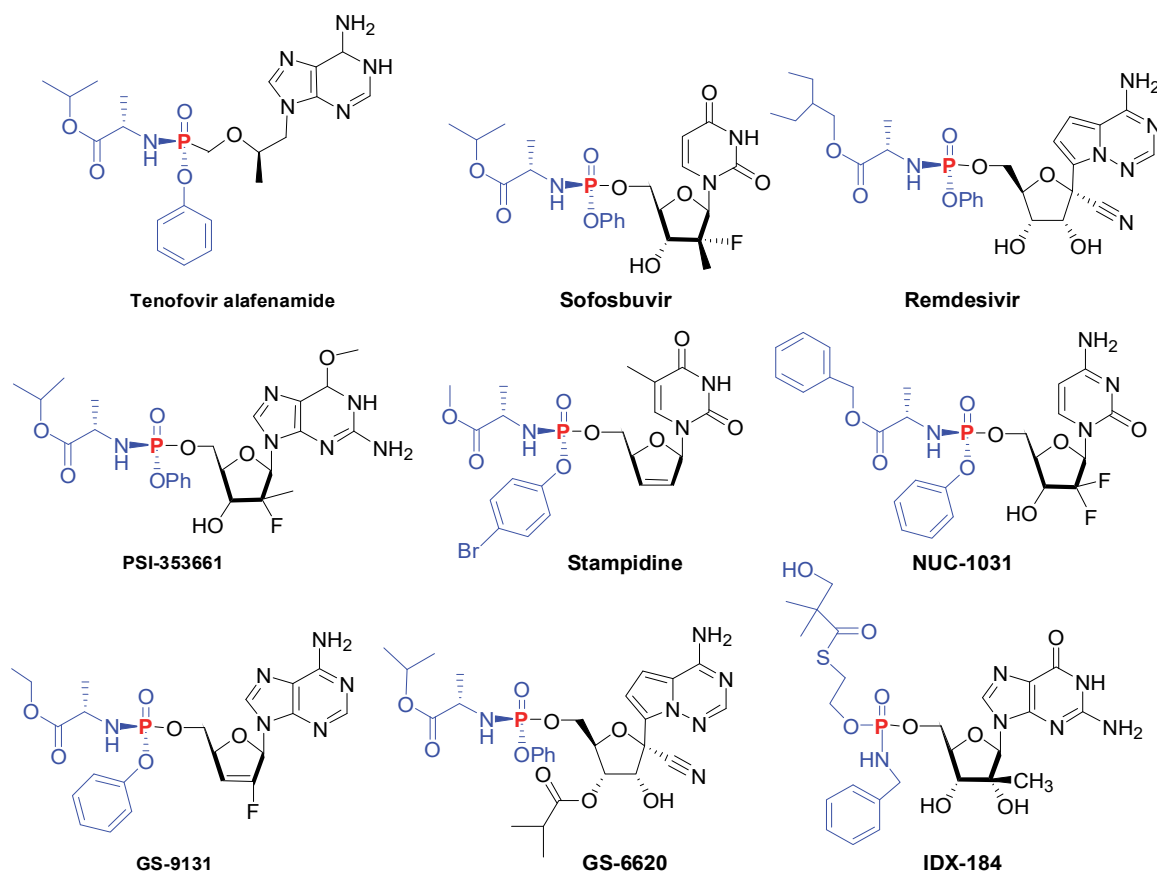


图5 进入临床试验的核苷-磷酰胺酯前药的化学结构

药物(Tenofovir alafenamide 和 Sofosbuvir)已经成为治疗乙肝和丙肝的特效药物,并深刻影响了未来小分子新药尤其是抗病毒和抗癌药物的研究进程^[10]。

2 核苷-磷酸酯前药的合成方法

核苷-磷酸酯前药的合成包括以下三种合成策略:(1) 利用氯化磷酸酯氨基酸酯与核苷游离羟基直接偶联成酯反应合成核苷-磷酸酯; (2) 利用核苷与二芳基氢亚磷酸酯发生单取代和氧化反应,然后与氨基酸酯进行氧化胺化反应合成核苷-磷酸酯; (3) 活化试剂将氨基酸和核苷芳基磷酸酯直接偶联合成核苷-磷酸酯(图 6)^[4]。不同的合成策略具有不同优势,被应用于不同核苷-磷酸酯前药的合成工作中。

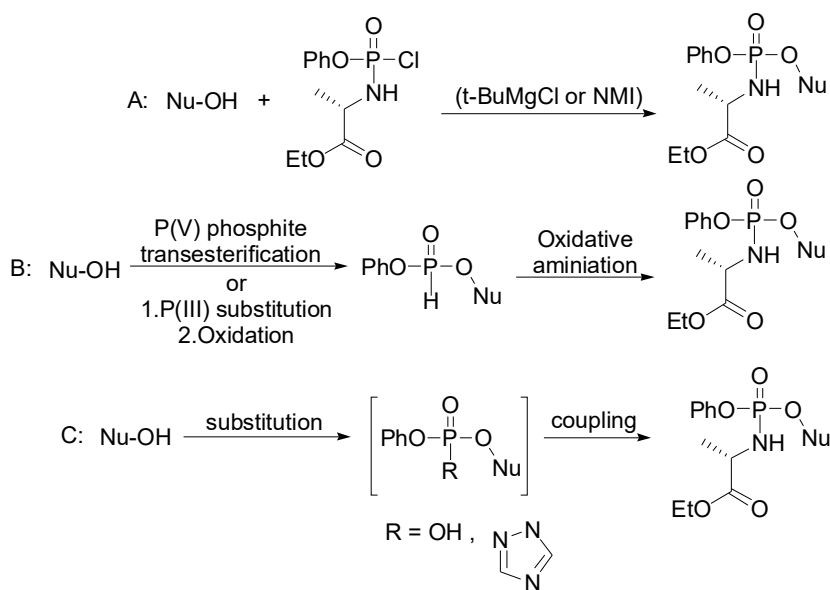


图 6 制备核苷-磷酸酯前药的方法

在核苷-磷酸酯药物制备过程中,常选用氯化磷酸酯氨基酸酯与核苷 5'-羟基发生亲核取代反应形成核苷-磷酸酯,得到的产物是比例为 1:1 的非对映异构体,这给后续进行动力学手性拆分得到单一磷手性构型化合物带来困难。因此,选取一种具有单一磷手性构型并能够在反应过程中保持磷酸酯键稳定的磷手性试剂,成为提高核苷-磷酸酯药物合成非对映选择性的有效途径。

2011 年 Ross 等^[11]在研究索非布韦磷酸酯前药的合成中,引入了含有苯酚、五氟苯酚和光学活性氨基酸组成的手性磷(S_P)酰胺酯化试剂,进而通过立体选择性的亲核取代反应,高效制备了具有单一非对映异构体目标化合物(99.7% *de*),避免了在磷酸酯前药合成中出现的非对映异构体混合物(图 7)。

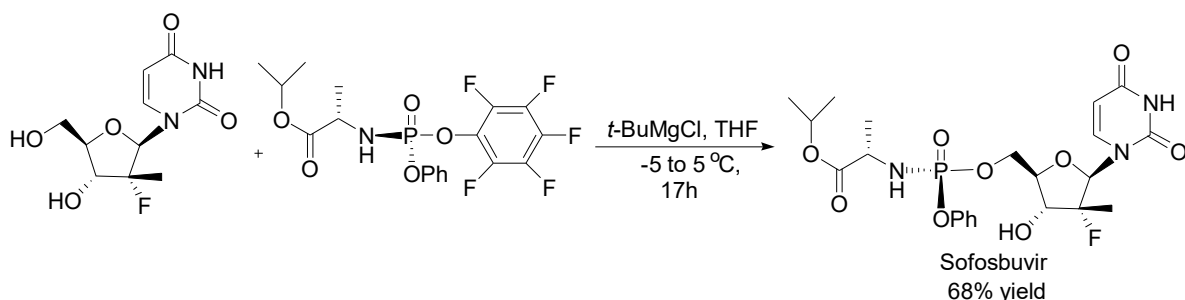


图 7 通过新颖的磷酸酯化试剂制备索非布韦

2016 年苗志伟课题组在 Ross 报道的合成路线基础上, 利用氨基酸酯手性诱导功能实现索非布韦的不对称合成。研究者通过改进合成工艺, 特别是优化合成中每一步的产物纯化方法, 避免使用柱层析, 主要采用精馏或重结晶方法进行纯化, 以极高的非对映选择性顺利实现对所有重要反应中间体立体选择性合成, 并最终合成出索非布韦产品(图 8) [12]。

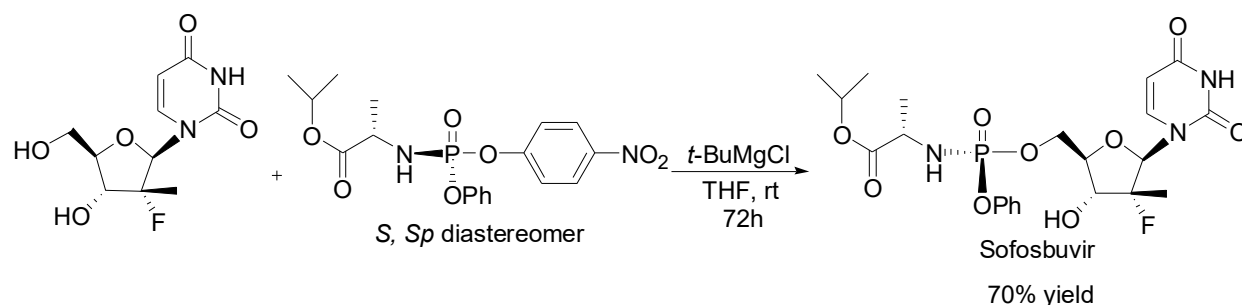


图 8 利用手性诱导策略制备索非布韦

2015 年 Tran 和 Eastgate 领导的研发团队尝试通过动态动力学拆分方法合成核苷-磷酸酯前药, 由磷酸氯和核苷的烷氧基镁化物反应生成目标分子。磷酸氯存在 1 : 1 的非对映异构体而且不稳定, 在偶联反应条件下迅速降解, 这导致该反应的收率在柱层析后仅有 27%。经过高通量筛选偶联试剂、活化试剂和辅助试剂, 发现加入手性助剂进行动态动力学拆分对于反应收率和立体选择性都有积极的影响, 优化后发现利用 2-(7-氮杂苯并三氮唑)-*N,N,N',N'*-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)作为偶联试剂, 奎宁作为手性助剂, 粗品收率提高到 89%, 立体选择性为 7 : 1 *d. r.*, *S_p* 非对映体为优先产物, 结晶收率为 57% (图 9) [13]。

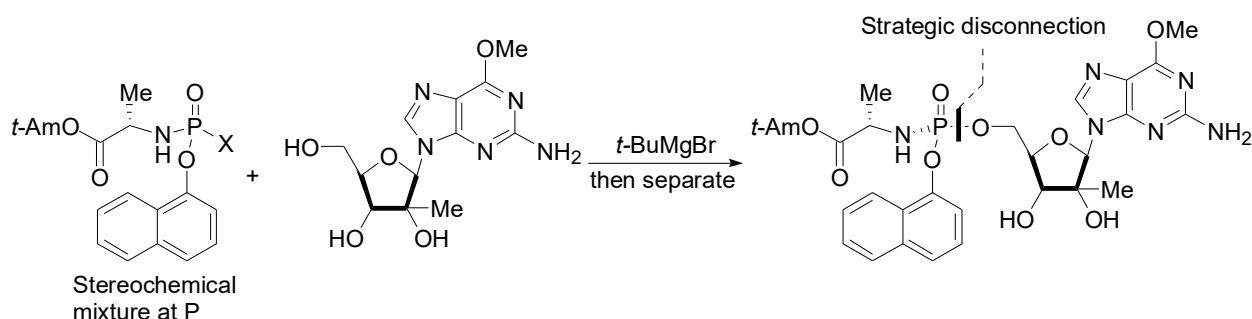


图 9 利用手性拆分法合成核苷-磷酸酯前药

利用手性催化有效构建磷手性中心一直是科学家关注的研究热点。2017 年, Merck 公司的 DiRocco 等人设计了具有 C_2 对称性的手性双齿双环咪唑催化剂, 通过不同长度的碳脂肪链对催化剂进行调整, 以期利用减少高度有序过渡态的熵减效应来提高催化剂和底物的结合能力, 进而提高反应速率与立体选择性。研究者设计并合成了一种使用 4–6 个碳原子碳链将两个 7-氨基甲酸酯二氢吡咯烷咪唑连接起来的多功能催化剂, 高立体选择性(*d. r.* > 99 : 1)、高产率(92%)地实现了核苷类底物的不对称磷酸化, 并将其用于核苷类前药(MK-3682)的研发中(图 10) [14]。

对比不同核苷-磷酸酯前药的合成方法, 利用氯化磷酸酯氨基酸酯与核苷 5'-羟基发生亲核取代反应形成核苷-磷酸酯是目前普遍采用的合成路径, 该方法的优点是原料简单易得、合成步骤少、反应产率高、副产物分离容易; 缺点是反应的对映选择性差、手性催化剂合成步骤多、非对映异构体分离困难。

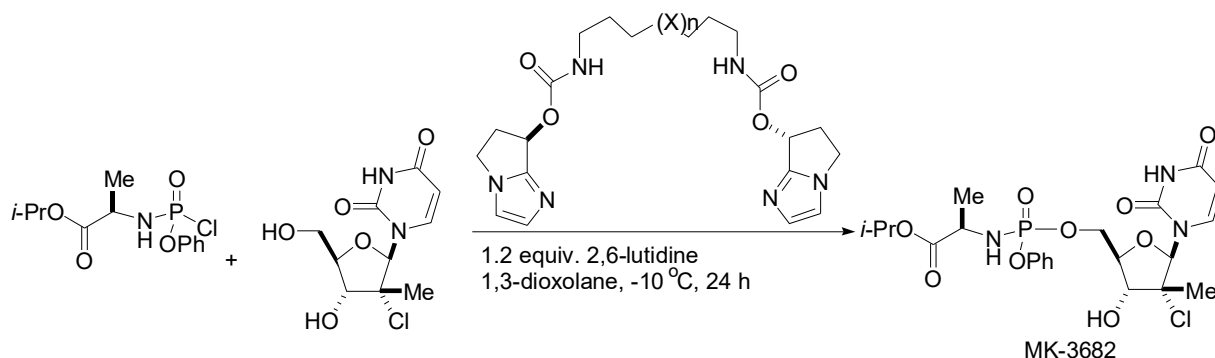


图 10 多功能手性咪唑二聚体催化剂用于前药 MK-3682 合成的磷酸酯化

3 核苷-磷酸氨基酸酯抗病毒药物的发展

3.1 抗埃博拉病毒(EBov)核苷-磷酸酯药物

埃博拉病毒(EBov)是一种能引起人类和其他灵长类动物产生埃博拉出血热(EBHF)的烈性传染病病毒,其引起的埃博拉出血热是当今世界上最致命的病毒性出血热,感染者症状与同为纤维病毒科的马尔堡病毒极为相似,包括恶心、呕吐、腹泻、肤色改变、全身酸痛、体内出血、体外出血、发烧等。死亡率在 50%–90%不等,致死原因主要为中风、心肌梗塞、低血容量休克或多发性器官衰竭等疾病^[14]。

瑞德西韦(图 3)是最早用于抑制埃博拉病毒的候选药物,该药物对埃博拉病毒的复制具有很强的抑制作用($EC_{50} = 0.06\text{--}0.14\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在恒河猴体内静脉给药 $10\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的瑞德西韦研究表明,前药的半衰期很短($t_{1/2} = 0.39\ \text{h}$),在外周血单个核细胞(PBMCs)中,瑞德西韦迅速转化为具有药物活性的三磷酸衍生物,并达到持续的高水平($t_{1/2} = 14\ \text{h}$),导致在 24 小时内可以抑制超过 50%的 EBov 复制^[15]。瑞德西韦在用于抑制埃博拉病毒药物研究的同时,针对最近爆发的新型冠状病毒(COVID-19)也表现出良好的抗病毒活性^[7]。

3.2 抗丙肝病毒(HCV)核苷-磷酸酯药物

全世界超过 1.85 亿人感染丙型肝炎病毒,约四分之一的慢性感染者可预测进展为肝硬化或肝细胞癌。索非布韦(Sofosbuvir)是美国吉利德科学公司于 2013 年 12 月 6 日获得 FDA 批准的用于基因 1 型、2 型、3 型以及 4 型慢性丙型肝炎成人患者的有效治疗药物,作为 HCV 聚合酶抑制剂的索非布韦由于其活性核苷三磷酸代谢物可以与 NS5B 高度保守的催化位点结合,在 HCV 基因组复制过程中有效导致 RNA 链的复制终止,显示出良好的治疗效果^[16]。

2'-C-甲基胞苷(NM107)是 HCV 治疗领域第一个被报道的核苷酸 NS5b 聚合酶抑制剂,而其缬氨酰胺酯前药(NM283)在 HCV 感染患者上则能有效降低病毒。研究人员采用 ProTide 技术合成了一系列 2'-C-甲基胞苷的磷酸酯前药(图 11),并且测试了该类化合物在 HuH7 细胞系和几种肝细胞中的抗 HCV 复制子活性以及细胞毒性,同时测试了该类前药化合物转化为核苷三磷酸的速度。鉴于它的高活性,系统的药物构效研究(SAR)最终给出了一些理想化合物,它们在动物模型中给出高浓度的活性核苷三磷酸,并且不具有由于酚类组成酶解所带来的毒性问题^[17]。特别值得强调的是,2007 年 McGuigan 教授等首次通过 ProTide 技术证明能够将无 HCV 抑制活性的核苷,如 4'-叠氮尿苷、4'-叠氮腺苷转化为高活性的磷酸酯前药($EC_{50}: 0.22\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[18]。这使得药物研发工作者不得不重新审视过去被忽视、被认为是无生物活性的核苷母体化合物能否进行二次开发的可能性。

3.3 抗 HIV 病毒核苷-磷酸酯药物

比利时鲁汶大学 Rega 医学研究所 Jonghe 教授团队研究发现磷酸甲氧基脱氧苏氨酸腺嘌呤(PMDTA)和磷酸甲氧基脱氧苏氨酸胸腺嘧啶(PMDTT)对 HIV-1 和 HIV-2 均表现出较低的 EC_{50} 值,

且细胞毒性较低^[19]。在该研究基础上, Westwell 等设计合成了阿洛夫定(Alovudine)的磷酰胺酯前药 Phosphoramidate 和 Phosphordiamidate (图 12), 在体外抗 HIV 活性和抗肿瘤活性均弱于原型药只在 CEM/TK-肿瘤细胞系中抑制活性与原型药阿洛夫定相当^[20]。

3.4 抗单纯疱疹病毒(HSV)核苷-磷酰胺酯药物

单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)是疱疹病毒的典型代表, 由于感染急性期发生水疱性皮炎即单纯疱疹而得名。HSV 能引起人类多种疾病, 如龈口炎(gingivostomatitis)、角膜结膜炎(keratoconjunctivitis)、脑炎(encephalitis)以及生殖系统感染和新生儿的感染。在感染宿主后, 常在神经细胞中建立潜伏感染, 激活后又会出现无症状的排毒, 在人群中维持传播链, 周而复始地循环。

阿昔洛韦是一种广谱抗病毒药, McGuigan 采用 ProTide 技术合成了阿昔洛韦的磷酰胺酯前药(图 13), 并且测试该类化合物的抗病毒活性, 研究结果表明这些新合成的前药化合物与母体阿昔洛韦具有类似的抗 HSV-1 和 HSV-2 活性, McGuigan 还发现对于抗 HSV 而言, 氨基酸基团的改变是可以接受的, 而对于抗 HIV 而言, 这种变化则是不可以接受的, 只有 L-丙氨酸以及苯丙氨酸有较好活性, 这些活性差异可能是由于底物的特异性或者分子内活化前药所需的酶含量不同所引起的^[21]。

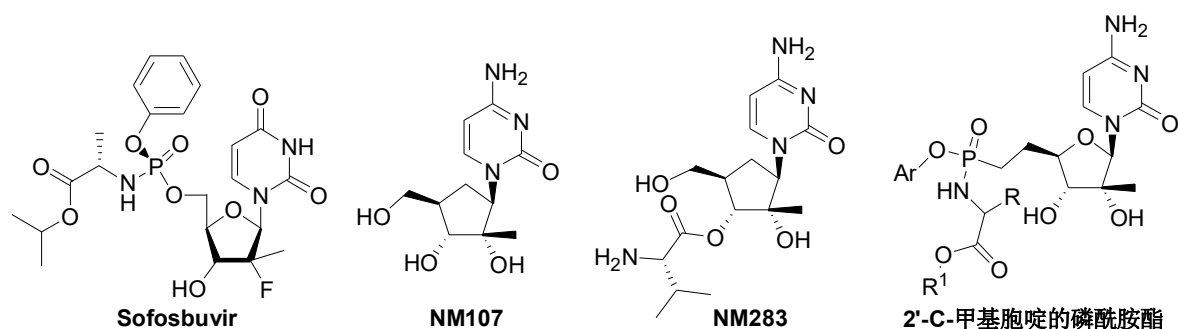


图 11 抗丙肝病毒(HCV)核苷-磷酰胺酯药物

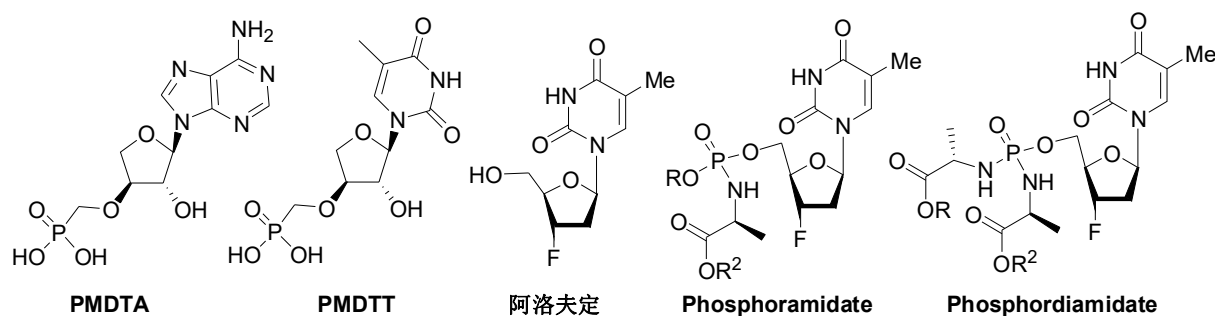


图 12 抗 HIV 病毒核苷-磷酰胺酯药物

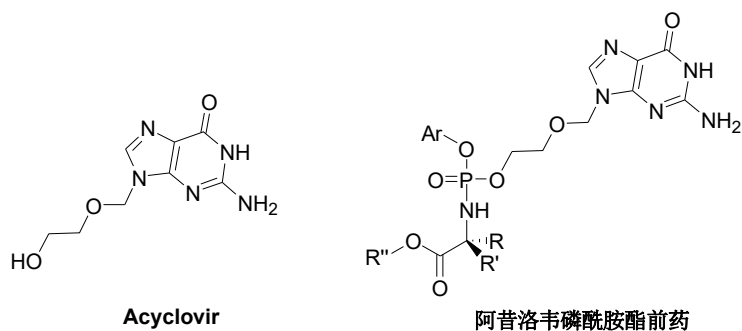


图 13 抗 HSV 病毒核苷-磷酰胺酯药物

3.5 核苷-磷酸氨基酸酯抗病毒药物结构特点分析

目前已经批准上市的核苷-磷酸氨基酸酯抗病毒药物分子结构特点鲜明,分子中均含有芳香取代基模体和氨基酸酯结构,通过磷酸酯的形式将核苷类似物与上述两部分结构相连(图 14)。未来新型核苷-磷酸氨基酸酯抗病毒药物分子开发将主要围绕以下三方面进行分子结构修饰:(1)芳香取代模体的修饰和改造,包括将芳香环结构更换为萘环或其他芳香杂环;(2)氨基酸酯结构的修饰和改造,包括筛选不同天然或非天然氨基酸,更换不同氨基酸酯 R^2 的类型;(3)核苷糖环结构 Y 和碱基 B 进行修饰和改造,设计合成结构更加新颖并具有高抗病毒活性的核苷类似物。

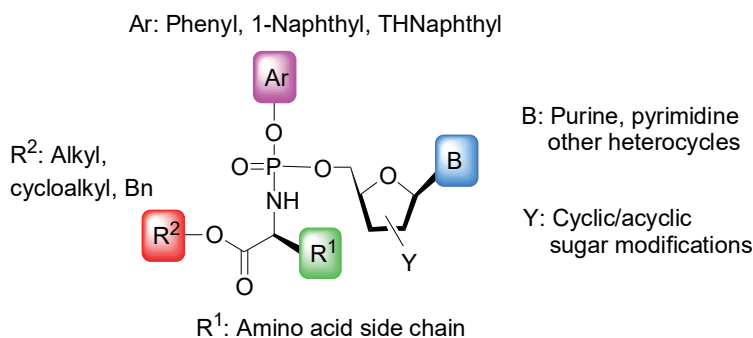


图 14 核苷-磷酸氨基酸酯抗病毒药物结构

4 结语

McGuigan 教授发明的磷酸酯前药策略和 ProTide 技术从 20 世纪 90 年代开始应用于抗病毒药物研发领域,特别是抗丙肝病毒重磅炸弹药物索非布韦和抗乙肝病毒药物替诺福韦艾拉酚胺的获批上市,使得 ProTide 技术的独特优点以及临床研究出色的成果得到药物研发科学家的广泛重视和肯定。手性核苷-磷酸酯已经在抗病毒研发领域取得可喜的研究进展,在诸如 HIV、HBV、HCV、HSV 病毒,以及一些罕见的病毒如埃博拉病毒(EBov)等抗病毒药物研发方面发挥了重大作用。目前手性核苷-磷酸酯前药合成还存在对映选择性差、手性催化剂合成步骤繁琐、催化效率低等问题,还有待有机化学家不断探索新的高效合成方法,实现磷酸酯前药的不对称合成。未来随着磷酸酯前药策略和 ProTide 技术的不断完善,一定会有更多更好的抗病毒药物研发成功,为人类战胜病毒保障健康做出更大贡献。

参 考 文 献

- [1] Schinazi, R. F.; Shi, J.; Whitaker, T. *In Innovative Drug Synthesis*; Li, J. J.; Johnson, D. S. Ed.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, New Jersey, USA, 2016; p. 61.
- [2] Thornton, P. J.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Mehellou, Y. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10400.
- [3] Babusis, D.; Phan, T. K.; Lee, W. A.; Watkins, W. J.; Ray, A. S. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 459.
- [4] 聂飏, 金传飞, 钟文和, 任青云, 张英俊, 张霁. *有机化学*, **2017**, *37*, 2818.
- [5] Mehellou, Y.; Balzarini, J.; McGuigan, C. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1779.
- [6] Corson, T. W.; Crews, C. M. *Cell* **2007**, *130*, 769.
- [7] Holshue, M. L.; DeBolt, C.; Lindquist, S.; Lofy, K. H.; Wiesman, J.; Bruce, H.; Spitters, C.; Ericson, K.; Wilkerson, S.; Tural, A.; *et al.* *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 929.
- [8] Cho, A.; Saunders, O. L.; Butler, T.; Zhang, L. J.; Xu, J.; Vela, J. E.; Feng, J. Y.; Ray, A. S.; Kim, C. U. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2705.
- [9] McGuigan, C.; Serpi, M.; Bibbo, R.; Roberts, H.; Hughes, C.; Caterson, B.; Gibert, A. T.; Verson, C. R. A. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 5807.
- [10] Maiti, M.; Persoons, L.; Andrei, G.; Snoeck, R.; Balzarini, J.; Herdewijn, P. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 985.

-
- [11] Ross, B. S.; Reddy, P. G.; Zhang, H. R.; Rachakonda, S.; Sofia, M. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8311.
- [12] 蔡国伟. 四氢噻吩螺吡唑酮类衍生物不对称合成和抗丙肝新药索非布韦绿色合成[D]. 天津: 南开大学, 2016.
- [13] Tran, K.; Beutner, G. L.; Schmidt, M.; Janey, J.; Chen, K.; Ros-so, V.; Eastgate, M. D. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 4994.
- [14] DiRocco, D. A.; Ji, Y. N.; Sherer, E. C.; Klapars, A.; Reibarkh, M.; Dropinski, J.; Mathew, R.; Maligres, P.; Hyde, A. M.; Limanto, J.; *et al.* *Science* **2017**, *356*, 426.
- [15] Warren, T. K.; Jordan, R.; Lo, M. K.; Ray, A. S.; Mackman, R. L.; Soloveva, V.; Siegel, D.; Perron, M.; Bannister, R.; Hui, H. C.; *et al.* *Nature* **2016**, *531*, 381.
- [16] Heim, M. H. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 535.
- [17] Gardelli, C.; Attenni, B.; Donghi, M.; Meppen, M.; Pacini, B.; Harper, S.; Di Marco, A.; Fiore, F.; Giuliano, C.; Pucci, V.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5394.
- [18] Osgerby, L.; Lai, Y. C.; Thornton, P. J.; Amalfitano, J.; Le Duff, C. S.; Jabeen, I.; Kadri, H.; Miccoli, A.; Tucker, J. H. R.; Muqit, M. M. K.; *et al.* *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3518.
- [19] Liu, C.; Dumbre, S. G.; Pannecouque, C.; Huang, C. S.; Ptak, R. G.; Murray, M. G.; De Jonghe, S.; Herdewijin, P. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9513.
- [20] Velanguparackel, W.; Hamon, N.; Balzarini, J.; McGuigan, C.; Westwell, A. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2240.
- [21] Derudas, M.; Carta, D.; Brancale, A.; Vanpouille, C.; Lisco, A.; Margolis, L.; Balzarini, J.; McGuigan, C. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5520.