



Sialyl-Lewis^x – ein „präorganisiertes Wasseroligomer“?**

Florian P. C. Binder, Katrin Lemme, Roland C. Preston und Beat Ernst*

In memoriam Daniel Bellús

Lectine, wie die Familie der Selectine,^[1] Galectine^[2] oder Siglecs,^[3] haben in jüngster Vergangenheit zunehmend Beachtung als therapeutische Zielstrukturen gefunden. Selectine wurden dabei am umfassendsten erforscht, da ihnen eine Schlüsselrolle im Frühstadium von Entzündungen zukommt. Dies macht die Selectine zu vielversprechenden Angriffs punkten für die Behandlung von Krankheiten mit einer Entzündungskomponente, z.B. Infarkt, Psoriasis oder rheumatoide Arthritis.^[4] Die Schlüsselrolle der Selectine liegt im ersten Schritt der Entzündungskaskade, in dem sie Leukozyten das Rollen entlang der vaskulären Endotheloberfläche ermöglichen. Dieser Schritt ist eine wichtige Voraussetzung für die folgende Integrin-vermittelte Adhäsion und die abschließende Extravasation zum Entzündungsort.^[5]

Die spezifische Wechselwirkung zwischen E-Selectin und dessen physiologischem Ligand ESL-1 (E-Selectin Ligand-1), wird durch das Tetrasaccharid Sialyl-Lewis^x (sLe^x, **1**) vermittelt.^[6] Auf der Suche nach hochaffinen Selectin-Antagonisten mit wirkstoffähnlichen Eigenschaften wurde sLe^x folglich zur Leitstruktur.^[1,7] Die Aufklärung der Struktur-Wirkungs Beziehungen (SAR),^[8] Mutationsstudien,^[9] trNOE-NMR (transferred nuclear Overhauser enhancement NMR)^[10] und STD-NMR-Spektroskopie (saturation transfer difference NMR),^[11] Molecular Modeling^[12] und schließlich Röntgen strukturanalyse^[13] lieferten ein präzises Bild der Wechselwirkungen zwischen sLe^x und E-Selectin auf atomarer Ebene (Abbildung 1). Da Docking-Studien^[7] und STD-NMR Experimente^[11] lediglich schwache Wechselwirkungen zwischen *N*-Acetyl- α -D-glucosamin (α -GlcNAc) und *N*-Acetyl- α -D-neuraminsäure (α -Neu5Ac) mit dem Protein erkennen ließen,^[12] wurden diese durch strukturell vereinfachte Mimetika ersetzt. Dies führte zwar zu E-Selectin-Antagonisten mit deutlich

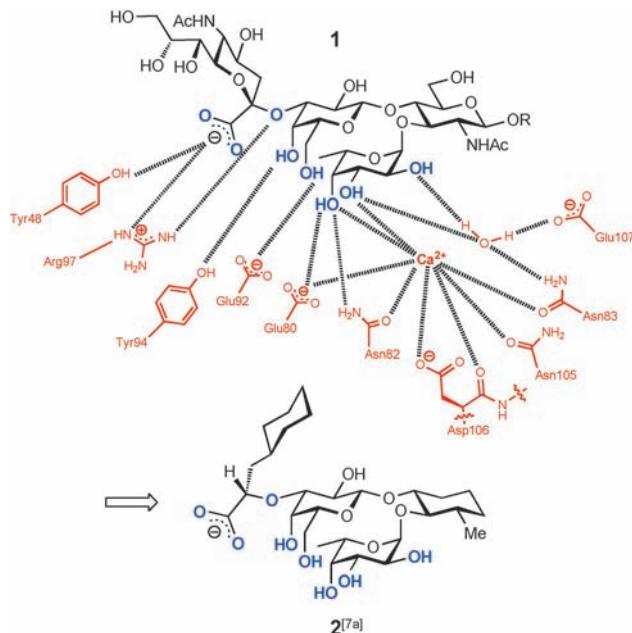


Abbildung 1. Oben: Detaillierte Darstellung der Wechselwirkungen zwischen sLe^x (**1**) und E-Selectin gemäß einer Kristallstrukturanalyse;^[13] pharmakophore Gruppen von **1** sind blau hervorgehoben. Unten: Das Glykomimetikum **2** hat eine Affinität von 13 μM in einem zellfreien, ligandbasierten Bindungssassay.^[7a]

verbesserten, allerdings immer noch nur mikromolaren Bindungsaffinitäten, z.B. Antagonist **2** in Abbildung 1.^[7a]

Trotz des bisher erzielten Fortschritts wurden die treibenden Kräfte der Wechselwirkung zwischen E-Selectin und seinen Liganden bisher nicht vollständig charakterisiert, weder für sLe^x (**1**), noch für irgendeinen niedermolekularen Selectin-Antagonisten. Allerdings schätzten Wild et al. die Enthalpiebeiträge der E-Selectin/ESL-1-Wechselwirkung durch eine Van't Hoff-Analyse ab, die auf der Korrelation der Bindungsaffinitäten bei unterschiedlichen Temperaturen beruht. Die Ergebnisse zeigten, dass Enthalpieänderungen lediglich 10 bis 25% der freien Bindungsenergie ΔG ausmachen und dass die Wechselwirkung hauptsächlich auf günstigen Entropieänderungen beruht.^[14]

In der Wirkstoffentwicklung wurden in letzter Zeit vermehrt thermodynamische Aspekte von Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersucht,^[15] da die Änderungen der Enthalpie und der Entropie wertvolle Informationen zur Leitstrukturoptimierung liefern können. Hier berichten wir über das thermodynamische Profil einer Serie von E-Selectin-Antagonisten.

Die freie Bindungsenergie ΔG einer Protein-Ligand-Wechselwirkung setzt sich aus enthalpischen (ΔH) und en-

[*] Dr. F. P. C. Binder,^[+] Dr. K. Lemme,^[+] R. C. Preston, Prof. Dr. B. Ernst
Institut für Molekulare Pharmazie, Universität Basel
Klingelbergstrasse 50, 4056 Basel (Schweiz)
E-Mail: beat.ernst@unibas.ch

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Die Autoren verdanken die finanzielle Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfond (Fördernummer 200020-103875/1) und GlycoMimetics Inc. (Gaithersburg, MD, USA). Weiter sind wir Dr. Francis Bitsch und Peggy Brunet-LeFeuvre (Novartis, Basel, Schweiz) für ihre Unterstützung bei den ITC-Experimenten zu Dank verpflichtet. Schließlich bedanken wir uns bei Dr. Martin Smiesko (Institut für Molekulare Pharmazie, Universität Basel, Schweiz) für die Illustrationen der sLe^x/E-Selectin-Wechselwirkung.

█ Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zur Synthese von Antagonist **4**, der Expression und Reinigung von E-Selectin/IgG, dem kompetitiven Bindungssassay und den ITC-Experimenten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202555> zu finden.

tropischen ($-T\Delta S$) Beiträgen zusammen ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Die freie Bindungsenergie unter Standardbedingungen (ΔG°), bei denen alle Reaktanten und Produkte in einer Konzentration von 1 mol L^{-1} vorliegen, lässt sich aus der Dissoziationskonstante K_D berechnen ($\Delta G = RT \ln K_D$). Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)^[16] ermöglicht die direkte Messung der Dissoziationskonstante K_D und der Enthalpie ΔH , vorausgesetzt dass keine Änderung des Protonierungsgrades während der Wechselwirkung stattfindet. Der Enthalpieterm (ΔH) enthält alle Beiträge aus nichtkovalenten Wechselwirkungen (WW) des Bindungsvorganges,^[15b] z. B. von Wasserstoffbrücken, elektrostatischen WW und Dipol-Dipol-WW zwischen Ligand und Rezeptor.^[17] Der Entropieterm setzt sich aus Translations- und Rotationsentropie,^[18] sowie Solvatationsentropie^[19] und Konformationsentropie^[20] zusammen.

Für unsere Studie wurde ein E-Selectin/IgG-Konstrukt bestehend aus der Lectin-Domäne, der EGF-ähnlichen Domäne und sechs „Short-Consensus-Repeat“-Domänen, gebunden an den Fc-Teil von humanem IgG1, verwendet.^[21] Das 148 kDa Protein wurde in Chinese Hamster Ovarian (CHO)-Zellen exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt, erstens mit einer Protein-A-Sepharosesäule und zweitens mit dem funktionellen monoklonalen Anti-hE-Selectin-Antikörper 7A9 (siehe die Hintergrundinformationen). Die hohe Reinheit und Funktionalität des Proteins spiegelt sich in der Stöchiometrie (N) der kalorimetrischen Experimente wider (Tabelle 1). Um c -Werte nahe 1 zu erreichen waren bis zu 50 mg E-Selectin/IgG pro ITC-Experiment nötig.

Ziel unserer kalorimetrischen Untersuchungen war zum einen die Bestimmung der K_D -Werte einer Serie von E-Selectin-Liganden und der Vergleich mit den Daten aus Mes-

sungen mit einem kompetitiven Bindungsassay (Tabelle 1),^[22] zum anderen die Aufklärung des thermodynamischen Profils dieser Liganden. Der mit ITC bestimmte K_D -Wert für die Bindung von sLe^x (1) an E-Selectin beträgt $(878 \pm 93) \mu\text{M}$ und stimmt somit gut mit bisherigen Daten überein (z. B. $1.1 \pm 2.0 \text{ mM}$,^[23] $(0.7 \pm 0.4) \text{ mM}$ ^[10b]). Zudem korrelieren die relativen K_D -Werte (rK_D) für die Antagonisten **2** bis **6** auch gut mit den dazugehörigen relativen IC_{50} -Werten ($r\text{IC}_{50}$). In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen^[7a] verbesserte der Austausch von D-GlcNAc durch carbocyclische Mimetika die Bindungsaffinität um das bis zu 25-fache (**1**→**4**), während der Austausch von D-Neu5Ac durch (S)-Cyclohexylmilchsäure die Affinität um das Zwei- bis Fünffache verbesserte (**1**→**5**; **3**→**6**; **4**→**2**).

Von einigen Ausnahmen abgesehen^[14,27] sind Lectin-Oligosaccharid-WW typischerweise enthalpisch getrieben mit zumeist ungünstigen Entropiebeiträgen.^[28] Dagegen beruht die Bindung von sLe^x an E-Selectin auf einem starken Entropiebeitrag ($-T\Delta S = -23 \text{ kJ mol}^{-1}$). Offensichtlich wird der Entropieverlust, der durch das Einfrieren von translatorischen und rotatorischen Freiheitsgraden sowie durch Konformationsänderungen des Liganden und des Proteins bei der Bindung entsteht, durch die günstige Entropie der Freisetzung von gebundenen Wassermolekülen überkompensiert.^[29] Diese Argumentation wird durch zwei experimentelle Beobachtungen gestützt. Zum einen wurde die biologisch aktive Ligandkonformation als eine von zwei energetisch günstigen Lösungskonformationen von sLe^x identifiziert,^[30] womit nur minimale konformativ Anpassungen bei der Bindung nötig sind. Zum anderen zeigt ein Vergleich zwischen der Kristallstruktur von Apo-E-Selectin und der des sLe^x-E-Selectin-Komplexes lediglich geringfügige Konformationsunterschiede.^[13]

Der günstige Entropieterm wird allerdings durch ungünstige Enthalpieänderungen zum Teil kompensiert. Um WW der pharmakophoren Gruppen von sLe^x (**1**) mit dem Protein zu ermöglichen, muss eine Oberfläche von ca. 275 \AA^2 ^[13a] auf beiden Kontaktseiten desolvatisiert werden. Da die neu gebildeten polaren WW zwischen den pharmakophoren Gruppen von sLe^x und E-Selectin den Enthalpieverlust der Desolvatisierung der polaren Kontaktfläche (Abbildung 2)^[31] nicht vollständig kompensieren, wird ein Nettoverlust an Enthalpie beobachtet ($\Delta H = +5.4 \text{ kJ mol}^{-1}$). Die gerichteten polaren WW des Liganden tragen folglich eher zur Spezifität als zur Affinität bei.

Summa summarum stellt sLe^x (**1**) ein Cluster von Wassermolekülen dar, die auf einem Gerüst angeordnet sind. Als ein solches „präorganisiertes Wasseroligomer“

Tabelle 1: Affinität und thermodynamische Parameter der Wechselwirkung von **1**–**6** mit E-Selectin.^[a]

Ligand	$r\text{IC}_{50}$	rK_D	$K_D [\mu\text{M}]$	ΔG [kJ mol $^{-1}$]	ΔH [kJ mol $^{-1}$]	$-T\Delta S$ [kJ mol $^{-1}$]	N
1	1	1	878 ± 93	-17.5 ± 0.2	$+5.4 \pm 0.7$	-23 ± 1	1
3	0.3	0.36	317	-20.0	-0.5	-19.5	1
4	0.05	0.04	38	-25.3	+0.9	-26.2	0.94
5	0.27	0.30	260	-20.5	-2.2	-18.3	1
6	0.08	0.07	59 ± 4	-24.2 ± 0.2	-5.3 ± 0.4	-18.9 ± 0.6	0.93 ± 0.08
2	0.014	0.02	19 ± 2	-27.1 ± 0.2	-5.8 ± 0.1	-21.3 ± 0.4	0.97 ± 0.01

[a] Relative IC_{50} -Werte ($r\text{IC}_{50}$) und relative K_D -Werte (rK_D) beziehen sich auf die Referenzsubstanz sLe^x (**1**). Die IC_{50} -Werte wurden mit einem kompetitiven Bindungsassay bestimmt.^[22] K_D und ΔH wurden in ITC-Experimenten ermittelt, ΔG und $T\Delta S$ wurden aus den Gleichungen $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ und $\Delta G = RT \ln K_D$ berechnet. N: Stöchiometrie der Bindung von Ligand und Protein.

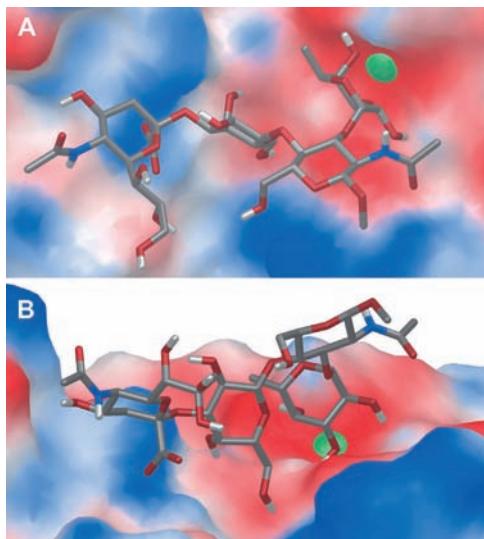


Abbildung 2. sLe^x (**1**) gebunden an E-Selectin, gemäß einer Kristallstrukturanalyse (PDB 1G1T).^[13a] A) Draufsicht: Das Bindungsepitop auf E-Selectin wird von polaren Gruppen dominiert [polare Gruppen sind rot (positiv geladen) und blau (negativ geladen), unpolare Gruppen weiß kenntlich gemacht]. Die Kontaktfläche beträgt 275 Å². B) Seitenansicht: Nur ein kleiner Teil von sLe^x trägt direkt zur Bindung bei. (Docking-Bilder wurden mit Maestro erstellt.^[32])

bietet es eine Anordnung von gerichteten Wasserstoffbrücken, welche die hochspezifische Bindung an E-Selectin ermöglichen. Der offensichtliche Entropiegewinn, welcher aus der Freisetzung von Wassermolekülen aus den Kontaktflächen von Ligand und Protein in das umgebende Wasser resultiert, sowie der hohe Grad an Präorganisation von sLe^x (**1**), führen zu dem beobachteten beträchtlichen Entropiegewinn. Dieser bildet letztlich die Triebkraft für den Bindungsprozess.

Das Konzept der konformativen Präorganisation wurde auch bei der Entwicklung von E-Selectin-Antagonisten angewendet (Abbildung 3). Genauer gesagt wirkt D-GlcNAc in sLe^x (**1**) als strukturgebendes Element, das die korrekte räumliche Orientierung von L-Fuc und D-Gal in der biologisch aktiven Konformation sicherstellt. Das heißt, die Aufgabe von D-GlcNAc ist die Präorganisation des Le^x-Kerns und nicht die direkte WW mit dem Zielprotein. D-GlcNAc selbst hat nur schwache Kontakte mit dem Zielprotein (Abbildung 2B).^[13] Eine vergleichbare Funktion wird D-Neu5Ac zugeschrieben, das ausschließlich mit einer Salzbrücke der Carboxylgruppe zur Bindung beiträgt.^[13] Folglich wurden Mimetika von D-GlcNAc und D-Neu5Ac so konzipiert, dass sie die biologisch aktive Konformation stabilisieren und den Entropieverlust bei der Bindung niedrig oder praktisch identisch mit dem des in hohem Maße präorganisierten sLe^x (**1**) halten. Die Einführung von (R,R)-Cyclohexan-1,2-diol (→**3**), das sich als mittelmäßiges Mimetikum von D-GlcNAc herausgestellt hatte,^[7a] brachte einen erheblichen Entropieverlust mit sich ($-T\Delta S: 3.5 \text{ kJ mol}^{-1}$). Ein ähnliches Ergebnis wurde durch den Austausch von D-Neu5Ac in Verbindung **3** durch (S)-Cyclohexylmilchsäure (→**6**, $-T\Delta S: 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) erzielt. Letztlich erwies sich (1R,2R,3S)-3-Methylcyclohexan-1,2-diol (→**2**) als ein perfekter Ersatz für D-GlcNAc (Abbildung 3),^[7a] da es zu einem Entropieterm

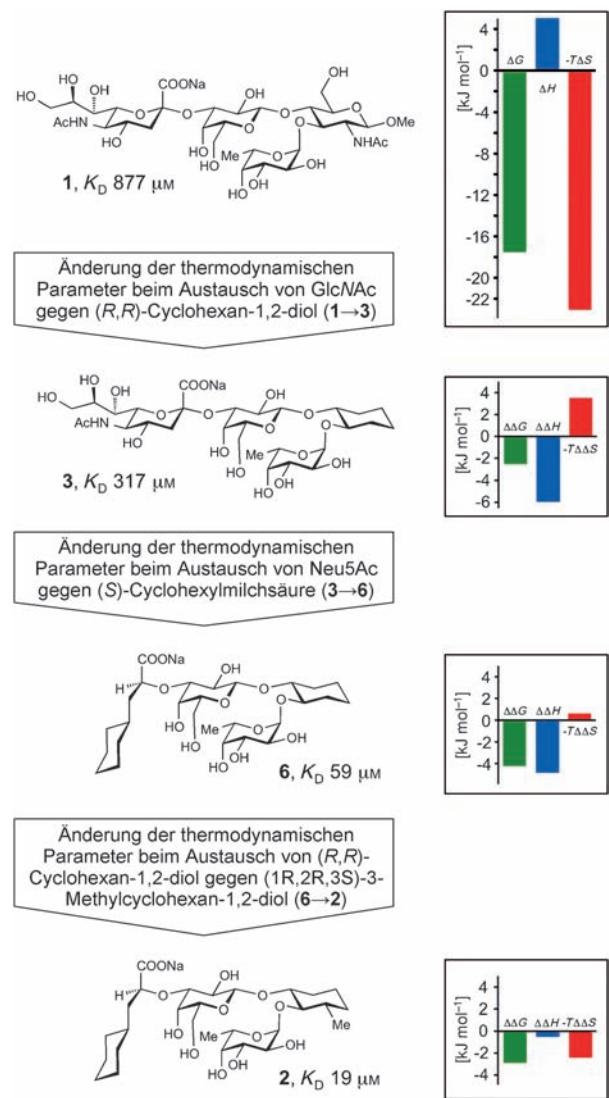


Abbildung 3. Thermodynamisches Profil (ΔG , ΔH , $-T\Delta S$) von sLe^x (**1**) (die entsprechenden Werte für **2–6** finden sich in Tabelle 1) und die Änderungen der thermodynamischen Parameter ($\Delta\Delta G$, $\Delta\Delta H$ und $-T\Delta\Delta S$), wenn D-GlcNAc in **1** durch (R,R)-Cyclohexan-1,2-diol (**1–3**), D-Neu5Ac in Antagonist **3** durch (S)-Cyclohexylmilchsäure (**3–6**) und (R,R)-Cyclohexan-1,2-diol in Antagonist **6** durch (1R,2R,3S)-3-Methylcyclohexan-1,2-diol (**6–2**) ersetzt wird.

ähnlich dem von sLe^x (**1**) führte (Tabelle 1). Verglichen mit dem Antagonist **6** kann durch eine verbesserte Präorganisation des Kerns der Entropieterm substantiell verbessert werden ($-T\Delta\Delta S: -2.4 \text{ kJ mol}^{-1}$). Durch die verminderte Polarität der untersuchten Mimetika kommt ein weiterer Effekt zum Tragen, nämlich eine erhebliche Änderung der Solvatisierungseigenschaften. Obwohl sie nur partiell desolvatisiert werden müssen, ist der Enthalpieverlust bei der Desolvatisierung der carbocyclischen Mimetika erheblich geringer als für die polareren Zucker D-GlcNAc oder D-Neu5Ac.^[31]

Auffällenderweise hat die Einführung von (R,R)-Cyclohexan-1,2-diol (→**3**) den gleichen relativen Effekt auf Enthalpie und Entropie wie der Austausch von D-Neu5Ac gegen (S)-Cyclohexylmilchsäure (→**5**), was sich in der gleichen

Steigung der zugehörigen Kurven im Entropie-Enthalpie-Diagramm in Abbildung 4 widerspiegelt. In beiden Fällen wird ein signifikanter Gewinn an Enthalpie durch einen Entropieverlust teilweise aufgehoben. Werden beide Mimetika in einem Molekül kombiniert (\rightarrow **6**), ist der Effekt nicht additiv, d.h. der Entropieverlust ist zwar geringer als erwartet, aber auch der Enthalpiegewinn fällt niedriger aus (vgl. **6** und **6_{erwartet}**, Abbildung 4). Offensichtlich verändert der Austausch von Kohlenhydratteilen nicht nur die lokalen Konformations- und Solvatisierungseigenschaften, sondern vielmehr die Eigenschaften des Liganden als Ganzes.

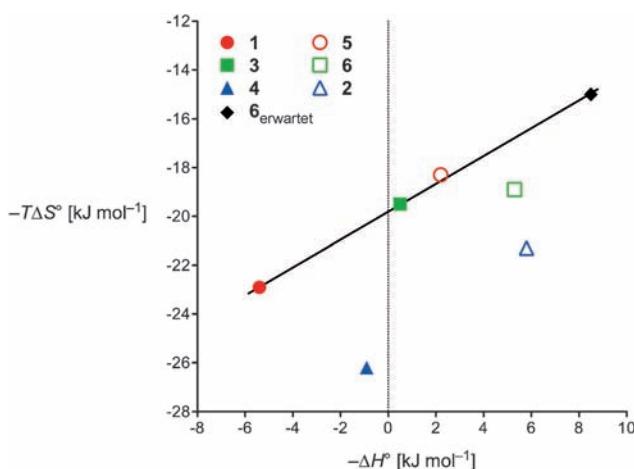


Abbildung 4. Entropie-Enthalpie-Diagramm der Liganden **1–6** und den für **6** zu erwartenden Wert, wenn die durch den Austausch von D-GlcNAc gegen Cyclohexan-1,2-diol und D-Neu5Ac gegen (S)-Cyclohexylmilchsäure verursachten Effekte additiv wären (**6_{erwartet}**).

Zusammenfassend wurden die thermodynamischen Bindungsparameter der WW von E-Selectin mit sLe^x (**1**) und den Glykomimetika **2–6** mit ITC untersucht. Die WW von sLe^x mit E-Selectin wird durch einen starken Entropieterm getrieben, der zum Teil durch einen ungünstigen Enthalpieterm kompensiert wird. Der Austausch von Strukturelementen mit Gerüstfunktion durch weniger polare Mimetika, z.B. D-Neu5Ac gegen (S)-Cyclohexylmilchsäure oder D-GlcNAc gegen (R,R)-Cyclohexan-1,2-diol, führt zu verbesserten Bindungsenthalpien, die jedoch mit einem Verlust an Bindungsentropie einhergehen. Nur für Mimetika welche die pharmakophoren Gruppen analog zu sLe^x (**1**) in der biologisch aktiven Konformation präsentieren, wie es beim Austausch von D-GlcNAc gegen (1R,2R,3S)-3-Methylcyclohexan-1,2-diol (**1**→**4** oder **5**→**2**) der Fall ist, wurde ein ähnlicher Entropiebeitrag gefunden. Insgesamt resultiert die, verglichen mit sLe^x (**1**), beinahe 50-fach bessere Bindungsaffinität von **2** aus einem Gewinn an Bindungsenthalpie, während sich die Bindungsentropie nicht signifikant ändert.

Die Entwicklung von Glykomimetika mit verbesserten Bindungseigenschaften ist aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Ligand (= Kohlenhydrat) und Lösungsmittel (= Wasser) intrinsisch schwierig. Die Ergebnisse dieser Thermodynamikstudie legen nahe, dass für eine erfolgreiche Entwicklung von Glykomimetika Kohlenhydratteile mit überwiegend struktu-

reller Funktion und keinen oder lediglich schwachen Kontakt mit dem Zielprotein durch hydrophobe Mimetika ersetzt werden sollten. Dies führt zu geringeren Enthalpieverlusten durch Desolvatisierung und damit zu verbesserten enthalpischen Beiträgen zur Bindung. Damit auch der Entropieterm optimiert wird, sollte das Mimetikum zudem zu einer optimalen Präorganisation der Bindungskonformation beitragen. Wenn der Kohlenhydratligand in Lösung bereits nahezu perfekt präorganisiert ist, wie das für sLe^x der Fall ist, stellt die Identifizierung solcher Mimetika eine echte Herausforderung dar.^[7a]

Eingegangen am 2. April 2012
Online veröffentlicht am 2. Juli 2012

Stichwörter: E-Selectin · Glykomimetika · Isotherme Titrationskalorimetrie · Kohlenhydrate · Sialyl-Lewis^x

- [1] a) B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 661–677; b) N. Kaila, B. E. Thomas, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 566–601; c) E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 833–862.
- [2] a) C. T. Öberg, H. Leffler, U. J. Nilsson, *Chimia* **2011**, *65*, 18–23; b) L. Ingrassia, I. Camby, F. Lefranc, V. Mathieu, P. Nshimirumukiza, F. Darro, R. Kiss, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3513–3527.
- [3] P. R. Crocker, J. C. Paulson, A. Varki, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 255–266.
- [4] S. A. Mousa, D. A. Cheresh, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 187–199.
- [5] a) G. S. Kansas, *Blood* **1996**, *88*, 3259–3287; b) D. B. Cines, E. S. Pollak, J. Loscalzo, C. A. Buck, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle, B. S. Schwartz, E. S. Barnathan, K. R. McCrae, B. A. Hug, A.-M. Schmidt, D. M. Stern, *Blood* **1998**, *91*, 3527–3561.
- [6] M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singhal, S. I. Hakomori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, *250*, 1130–1132; G. Walz, A. Aruffo, W. Kolamus, M. Bevilacqua, B. Seed, *Science* **1990**, *250*, 1132–1134.
- [7] a) D. Schwizer, J. Patton, B. Cutting, M. Smiesko, B. Wagner, A. Kato, C. Weckerle, F. P. C. Binder, S. Rabbani, O. Schwardt, J. L. Magnani, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1342–1351; b) P. W. Bedard, N. Kaila, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, *20*, 781–793; c) N. Kaila, B. E. Thomas, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2003**, *13*, 305–317; d) G. Thoma, R. Bänteli, W. Jahnke, J. L. Magnani, J. T. Patton, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3756–3759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3644–3647; e) G. Thoma, J. L. Magnani, J. T. Patton, B. Ernst, W. Jahnke, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1995–1999; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1941–1945; f) H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1571–1578.
- [8] a) W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2186–2188; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2096–2098; b) J. Y. Ramphal, Z. L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. Defrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3459–3463; c) B. K. Brandley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivasatava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology* **1993**, *3*, 633–641; d) D. Tyrrell, P. James, N. Rao, C. Foxall, S. Abbas, F. Dasgupta, M. Nashed, A. Hasegawa, M. Kiso, D. Asa, J. Kidd, B. K. Brandley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10372–10376.
- [9] D. V. Erbe, B. A. Wolitzky, L. G. Presta, C. R. Norton, R. J. Ramos, D. K. Burns, J. M. Rumberger, B. N. N. Rao, C. Foxall, B. K. Brandley, L. A. Lasky, *J. Cell Biol.* **1992**, *119*, 215–227.

- [10] a) R. Harris, G. R. Kiddle, R. A. Field, M. J. Milton, B. Ernst, J. L. Magnani, S. W. Homans, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2546–2551; b) L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1727–1736; c) K. Scheffler, J. R. Brisson, R. Weisemann, J. L. Magnani, W. T. Wong, B. Ernst, T. Peters, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 423–436; d) K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W. T. Wang, R. Weisemann, T. Peters, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2034–2037; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1841–1844.
- [11] M. Rinnbauer, B. Ernst, B. Wagner, J. Magnani, A. J. Benie, T. Peters, *Glycobiology* **2003**, *13*, 435–443.
- [12] T. Ishida, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 3950–3964.
- [13] a) W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell* **2000**, *103*, 467–479; b) B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature* **1994**, *367*, 532–538.
- [14] M. K. Wild, M. C. Huang, U. Schulze-Horsel, P. A. van der Merwe, D. Vestweber, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31602–31612.
- [15] a) J. E. Ladbury, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 888–893; b) J. E. Ladbury, G. Klebe, E. Freire, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 23–27.
- [16] G. A. Holdgate, W. H. Ward, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1543–1550.
- [17] a) J. E. DeLorbe, J. H. Clements, M. G. Teresk, A. P. Benfield, H. R. Plake, L. E. Millspaugh, S. F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16758–16770; b) M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10533–10539.
- [18] A. V. Finkelstein, J. Janin, *Protein Eng.* **1989**, *3*, 1–3.
- [19] a) K. P. Murphy, *Biophys. Chem.* **1994**, *51*, 311–326; b) R. L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8069–8072.
- [20] K. K. Frederick, M. S. Marlow, K. G. Valentine, A. J. Wand, *Nature* **2007**, *448*, 325–330.
- [21] W. Jahnke, H. C. Kolb, M. J. J. Blommers, J. L. Magnani, B. Ernst, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2715–2719; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2603–2607.
- [22] a) G. Weitz-Schmidt, G. Stokmaier, G. Scheel, N. E. Nifant'ev, B. Tuzikov, N. V. Bovin, *Anal. Biochem.* **1996**, *238*, 184–190; b) G. Thoma, J. L. Magnani, R. Oehrlein, B. Ernst, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7414–7415.
- [23] R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah, M. P. Weir, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10591–10596.
- [24] A. Toepper, G. Kretzschmar, E. Bartnik, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9161–9164.
- [25] Siehe die Hintergrundinformationen für die Synthese von **4**.
- [26] K. E. Norman, G. P. Anderson, H. C. Kolb, K. Ley, B. Ernst, *Blood* **1998**, *91*, 475–483.
- [27] a) C. O. Sallum, R. A. Kammerer, A. T. Alexandrescu, *Biochemistry* **2007**, *46*, 9541–9550; b) M. Kapoor, H. Srinivas, E. Kandiah, E. Gemma, L. Ellgaard, S. Oscarson, A. Helenius, A. Surolia, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 6194–6200; c) P. G. Rani, K. Bachhawat, G. B. Reddy, S. Oscarson, A. Surolia, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10755–10760.
- [28] a) M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593–1608; b) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 387–429; c) T. K. Dam, B. S. Cavada, T. B. Grangeiro, C. F. Santos, V. M. Ceccatto, F. A. M. de Sousa, S. Oscarson, C. F. Brewer, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16119–16126; d) E. J. Toone, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 719–728.
- [29] a) P. R. Connelly in *Structure-Based Drug Design: Thermodynamics, Modeling, and Strategy* (Hrsg.: J. E. Ladbury, P. R. Connelly), Springer, Berlin, **1997**, S. 143–157; b) J. D. Dunitz, *Science* **1994**, *264*, 670–670.
- [30] a) T. J. Rutherford, D. G. Spackman, P. J. Simpson, S. W. Homans, *Glycobiology* **1994**, *4*, 59–68; b) Y. Ichikawa, Y. C. Lin, D. P. Dumas, G. J. Shen, E. Garciajunceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9283–9298; c) Y. C. Lin, C. W. Hummel, D. H. Huang, Y. Ichikawa, K. C. Nicolaou, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5452–5454.
- [31] a) A. J. Ruben, Y. Kiso, E. Freire, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 2–4; b) P. R. Connelly, R. A. Aldape, F. J. Bruzzese, S. P. Chambers, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, S. Itoh, D. J. Livingston, M. A. Navia, J. A. Thomson, K. P. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1964–1968; c) S. Cabani, P. Gianni, V. Mollica, L. Lepori, *J. Solution Chem.* **1981**, *10*, 563–595.
- [32] Maestro, Version 9.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2010**.