

# Erhöhte CXCR4-Affinität und Anti-HIV-Aktivität eines Peptoids durch Konformationsfixierung\*\*

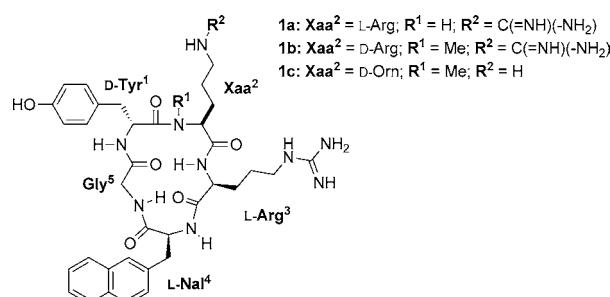
Oliver Demmer, Andreas O. Frank, Franz Hagn, Margret Schottelius, Luciana Marinelli, Sandro Cosconati, Ruth Brack-Werner, Stephan Kremb, Hans-Jürgen Wester und Horst Kessler\*

Der Chemokinrezeptor CXCR4 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und bildet mit seinem natürlichen Liganden CXCL12 (früher SDF-1 genannt) einen zentralen Teil des Kommunikationssystems im menschlichen Körper. Die Bandbreite seiner Funktionen reicht dabei vom Dirigieren der Stammzellen während der Embryogenese über die Entwicklung von kardiovaskulärem, hämatopoetischem und Gehirngewebe bis hin zur Signalgebung im Nerven- und Immunsystem.<sup>[1–6]</sup> Darüber hinaus ist CXCR4 einer der zwei wichtigsten Korezeptoren, die vom humanen Immundefizienzvirus (HIV) beim Eintritt in die Zelle verwendet werden, wobei Viren, die CXCR4 nutzen, eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von AIDS spielen.<sup>[7,8]</sup> Damit ist CXCR4 ein wichtiger Angriffspunkt für die Therapie einer Vielzahl von Krankheiten, wie Entzündungen, Krebs<sup>[9]</sup> und HIV/AIDS.<sup>[10]</sup> Die vor Kurzem erteilte Zulassung des CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Mozobil) als Medikament für die Stammzellmobilisierung ebnet den Weg für die Entwicklung weiterer Wirkstoffe gegen Krankheiten, die mit CXCR4 in Verbindung stehen.<sup>[1,11]</sup> Da mo-

mentan noch keines der von der FDA zugelassenen HIV-Medikamente gegen CXCR4 wirkt, wäre dieser Rezeptor ein interessanter Angriffspunkt für die Entwicklung einer neuen Klasse von Wirkstoffen gegen HIV.

Einer der interessantesten CXCR4-Antagonisten wurde vom natürlichen bicyclischen Peptid Polypeptidin II abgeleitet, das schrittweise zum monocyclischen T140 reduziert wurde.<sup>[12]</sup> Letzteres und seine Derivate sind selektiv für CXCR4 und haben als inverse Agonisten Vorteile gegenüber partiellen Agonisten wie AMD3100.<sup>[13,14]</sup> Bei unserer Suche nach hochaffinen CXCR4-Liganden als geeignete Radio-pharmaka für die molekulare Bildgebung<sup>[15–17]</sup> verwenden wir das Konzept des Liganden-basierten Designs, das sich auf konformativ Überlegungen und Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) stützt. Hier stellen wir erstmals CXCR4-Antagonisten mit pikomolarer Affinität vor und erklären ihren Bindungsmodus sowie ihre Eigenschaft, die HIV-Infektion von Zellen zu inhibieren.

Die Arbeiten von Fujii et al. haben gezeigt, dass der peptidische CXCR4-Antagonist T140 von 14 Aminosäuren auf ein vom N- zum C-Terminus cyclisiertes Pentapeptid verkleinert werden kann, das eine Bindungsaffinität ( $IC_{50}$ ) von 8 nm (FC131; **1a**) aufweist.<sup>[18]</sup> Dieses Peptid wurde weiter zum N-Methylanalogon *cyclo*(-D-Tyr<sup>1</sup>-D-[NMe]Arg<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Nal<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-) (Nal = L-3-(2-Naphthyl)alanin) **1b** modifiziert, woraus eine weitere Erhöhung der Bindungsaffinität folgte ( $IC_{50} = 3$  nm; Abbildung 1).<sup>[19]</sup> Dies ist die höchste bekannte CXCR4-Bindungsaffinität von cyclischen Pentapeptiden.



**Abbildung 1.** Konstitutionell ähnliche cyclische Pentapeptide, die durch die Einführung einer N-Methylgruppe und einer veränderten Chiralität in Position 2 ein unterschiedliches Konformationsverhalten aufweisen.

Trotz der hohen Affinität des N-methylierten Peptids weist sein NMR-Spektrum zwei Konformationen in langsamem Austausch miteinander auf. Die Hauptkonformation ist ähnlich zu der von **1a** und wird von Ueda et al.<sup>[19]</sup> für die bioaktive Konformation gehalten. Wir haben die beiden

[\*] Dr. O. Demmer, Dr. A. O. Frank, Dr. F. Hagn, Prof. Dr. H. Kessler

Institute for Advanced Study am Department Chemie,  
Technische Universität München

Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)  
und

Chemistry Department, Faculty of Science,  
King Abdulaziz University, Dschidda (Saudi Arabien)

E-Mail: kessler@tum.de

Homepage: <http://www.org.chemie.tu-muenchen.de>

Dr. M. Schottelius, Prof. Dr. H.-J. Wester  
Lehrstuhl für Pharmazeutische Radiochemie,  
Garching (Deutschland)

Prof. Dr. L. Marinelli

Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica,  
Università di Napoli „Federico II“, Neapel (Italien)

Dr. S. Cosconati

Dipartimento di Scienze Ambientali,  
Seconda Università di Napoli, Caserta (Italien)

Prof. Dr. R. Brack-Werner, Dr. S. Kremb

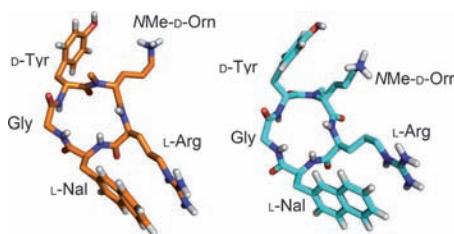
Helmholtz Zentrum München, Institute of Virology  
Neuherberg/München (Deutschland)

[\*\*] Wir danken M. Wolff und B. Cordes für technische Unterstützung sowie E. Gourni für die Hilfe bei den Zellbindungsassays. Diese Arbeit wurde unterstützt vom Center of Integrated Protein Science Munich (CIPSM). Wir danken für finanzielle Unterstützung durch die DFG (SFB 824, Projekt B5). Die Abbildung des HI-Virus in der Grafik des Inhaltsverzeichnisses stammt von den US National Institutes of Health (Genehmigung PD-USGov-HHS-NIH)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202090> zu finden.

Konformationen von **1c** ( $IC_{50} = (6 \pm 1) \text{ nM}$ ) in Wasser NMR-spektroskopisch unter anschließender Zuhilfenahme von Moleküldynamik(MD)-Simulationen bestimmt, um einen detaillierten Einblick in die verschiedenen Bindungsmodi zu erhalten. Bei diesen Experimenten wurde das Ornithin<sup>2</sup>-Orn<sup>2</sup>-Derivat anstatt von Arg<sup>2</sup> verwendet, wie wir es für unsere vorhergehenden Arbeiten zur molekularen Bildgebung verwendet hatten.<sup>[15–17]</sup> Es ist davon auszugehen, dass diese Substitution keinerlei Einfluss auf die Rückgratkonformation hat; unter Verwendung von peptoidischen Pentapeptiden, die nur in einer Konformation vorlagen, konnte die Affinität dieser Liganden weiter gesteigert werden.

Die von uns in Wasser bestimmte Struktur des Hauptkonformers **1c** ist derjenigen in DMSO sehr ähnlich (Abbildung 2).<sup>[19]</sup> Der einzige größere Unterschied zwischen beiden



**Abbildung 2.** Das Haupt- (*trans*-Amidbindung zwischen D-Tyr<sup>1</sup> und D-Orn<sup>2</sup>, orange) und Nebenkonformer (*cis*, blau) von **1c** weisen eine ähnliche Gesamtstruktur des Peptidrückgrats auf, wenn man von der Orientierung des *N*-Methylamids zwischen D-Tyr<sup>1</sup> und D-Orn<sup>2</sup> absieht, die von *trans* nach *cis* geflippt ist. Beide Strukturen sind die repräsentativsten Konformere aus der jeweiligen unbeschränkten MD-Trajektorie in explizitem Wasser (siehe Hintergrundinformationen für weitere Details). Aliphatische Protonen sind nicht gezeigt.

Strukturen ist die bevorzugte Orientierung der Peptidbindung zwischen Nal<sup>4</sup> und Gly<sup>5</sup>. Die Nebenkonformation weist eine *cis*-Peptidbindung an der Stelle der *N*-Methylierung auf, worauf bereits die große ROE-Intensität (ROE = rotating frame nuclear Overhauser effect) zwischen den beiden H<sup>α</sup>-Atomen an Tyr<sup>1</sup> und Orn<sup>2</sup> (siehe Hintergrundinformationen) schließen lässt. Dies zeigt, dass die Allylspannung, die durch die Einführung der *N*-Methylgruppe entsteht, stark genug ist, um einen Flip der Peptidbindung von *trans* nach *cis* auszulösen.<sup>[20]</sup>

Abbildung 2 zeigt, wie nah die Seitenketten von Tyr<sup>1</sup> und Orn<sup>2</sup> in Lösung beieinander stehen und dass sie einander zugewandt sind. Ein ähnliches Phänomen ist bei Somatostatinpeptiden beobachtet worden, bei dem hydrophobe Wechselwirkungen die Haupttriebkraft für die bevorzugte Seitenkettenorientierung sind.<sup>[21]</sup> Nach diesen ersten konformativen Untersuchungen wurden neue Analoga entworfen, bei denen die Orn-(bzw. Arg-)Seitenkette vom α-Kohlenstoff- zum benachbarten Stickstoffatom übertragen wird. Dies geschah unter der Annahme, dass diese Umwandlung in ein Peptoid<sup>[22]</sup> Strukturen begünstigt, in denen die Peptidbindung (*cis-trans*) in ihrer *trans*-Konformation fixiert ist. Eine ähnliche konformative Auswirkung des Peptoidmotivs mit verbesserten biologischen Eigenschaften ist bereits früher beobachtet worden.<sup>[23]</sup>

Zur Synthese der Peptoide wurde D-Orn durch D-Ala ersetzt, und die Aminoalkylgruppen am N<sup>α</sup>-Atom wurden mithilfe der Fukuyama-Mitsunobu-Reaktion an der festen Phase eingeführt und mit der üblichen Fmoc-Chemie kombiniert.<sup>[24]</sup> Im Detail wurde dabei ein mit *o*-Nitrobenzolsulfonyl (*o*-Nosyl; Ns) geschütztes Amin mithilfe eines Alkohols unter Mitsunobu-Bedingungen alkyliert. Nach der Abspaltung der Ns-Gruppe wurde das sekundäre Amin mit 2-(7-Aza-1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HATU) acyliert. Die linearen Pentapeptide wurden mit Diphenylphosphorylazid (DPPA) und NaHCO<sub>3</sub> in verdünnter Lösung cyclisiert. Die Entschüttung mit Trifluoressigsäure (TFA) mit nachfolgender HPLC-Aufreinigung lieferte die in Tabelle 1 aufgeführten Peptide. Vor der Alkylierung wurden die Aminoalkohole mit *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) geschützt; 7-Aminoheptan-1-ol wurde nach Literaturvorschriften synthetisiert.<sup>[25–27]</sup>

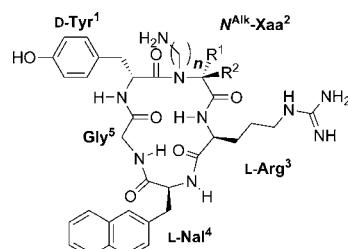
Die Peptoide **2–8** (siehe Hintergrundinformationen) zeigten alle, unabhängig von der *N*-Alkylkettenlänge *n*, mindestens doppelt so starke Bindung an CXCR4 wie das Ausgangspeptid **1c** (Abbildung 3 und Tabelle 1). D-Ala im Rückgrat des aktivsten Liganden **4** wurde durch L-Ala (**7**) und Gly (**6**) ausgetauscht. **6** und **7** zeigten eine um zwei Größenordnungen verringerte Affinität, was darauf schließen lässt, dass sowohl die Methylgruppe als auch deren Chiralität in der Seitenkette des D-Ala wichtig sind, um die Konformation nahe an der bioaktiven zu halten.

**4** hat eine subnanomolare Affinität, die 20-mal höher ist als die von **1c**, und weist auf der NMR-Zeitskala eine einzige

**Tabelle 1:** Werte für die Affinität der Bindung an CXCR4 ( $IC_{50}$ ) und Anti-HIV-Aktivität ( $EC_{50}$ ) der synthetisierten Verbindungen.

Verb.	<i>n</i>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$IC_{50}$ [nM] <sup>[a]</sup>	$EC_{50}$ [nM] <sup>[b]</sup>
<b>1b</b>	–	N-Me-D-Arg		3 <sup>[c]</sup>	$66 \pm 5.7$
<b>2</b>	4	Me	H	$0.9 \pm 0.1$	n.d.
<b>3</b>	5	Me	H	$1.6 \pm 0.3$	n.d.
<b>4</b>	6	Me	H	$0.3 \pm 0.2$	$53 \pm 3.7$
<b>5</b>	7	Me	H	$2.4 \pm 0.8$	n.d.
<b>6</b>	6	H	H	$100 \pm 9$	n.d.
<b>7</b>	6	H	Me	$94 \pm 38$	$979 \pm 84$
<b>8<sup>[d]</sup></b>	6	Me	H	$0.04 \pm 0.02$	$29 \pm 1.5$
AMD3100				$651 \pm 37^{[e]}$	$365 \pm 35.0$

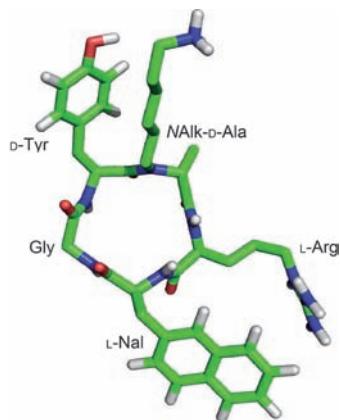
[a] Gemessen gegen [<sup>125</sup>I]FC131. Durchschnittswert von mindestens drei Experimenten. [b] Durchschnittswerte ± Standardabweichung von 3–5 Infektionsbestimmungen. [c] Aus Lit. [19] übernommen. [d] Das Amin in der *N*-Alkylkette ist durch eine Guanidinogruppe ersetzt. [e] Gemessen gegen [<sup>125</sup>I]SDF1-α.<sup>[35]</sup>



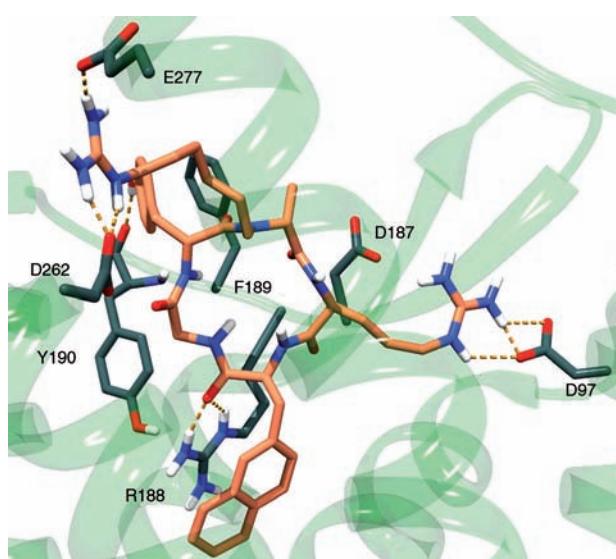
**Abbildung 3.** Peptoide mit unterschiedlicher *N*-Alkylkettenlänge *n* und verschiedener Chiralität. Siehe Tabelle 1 für weiterführende Informationen.

Konformation auf, die der Hauptkonformation von **1c** entspricht; die alkylierten Amidbindungen von **1c** und **4** haben eine ähnliche Orientierung (Abbildung 4). Dies bestätigt die Annahme, dass es sich bei der Hauptkonformation von **1c** um die bioaktive handelt,<sup>[19]</sup> in der die Tyr<sup>1</sup>-Seitenkette und die *N*-Alkylgruppe zueinander in einer gestapelten Konformation angeordnet sind. Diese räumliche Anordnung führt zu einer Hochfeldverschiebung der Protonen des zweiten Kohlenstoffatoms nahe dem Amid in der *N*-Alkylkette zu Werten von 0.58 und 1.17 ppm, während die  $\gamma$ -Protonen eines Argininrests bei durchschnittlich 1.56 ppm liegen. Des Weiteren ist die Nal-Gly-Peptidbindung in entgegengesetzter Richtung zu jener in **1c** orientiert (Abbildung 4). In einem abschließenden Optimierungsschritt wurde die Guanidinfunktion wieder in die Aminoalkylkette eingeführt. Dies führte dazu, dass **8** eine fast zehnmal höhere Affinität als **4** hat, was **8** zum höchstaaffinen, bisher bekannten CXCR4-Liganden macht.

Um die enorme Affinität der synthetisierten Peptioide aufzuklären, wurde der aktivste Ligand **8** in die kürzlich publizierte Röntgenkristallstruktur von CXCR4 im Komplex mit dem CVX15-Peptid gedockt (Abbildung 5; PDB-Eintrag 3OE0).<sup>[28]</sup> Der beste Bindungsmodus, der mit dem Dockingprogramm Glide gefunden wurde, positioniert **8** in dieselbe Rezeptorregion, die von CVX15 besetzt wird (siehe zum Vergleich Abbildung 2a in den Hintergrundinformationen), wobei die Tyr<sup>1</sup>-Seitenkette eine gut ausgerichtete  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit F189 und eine Wasserstoffbrücke mit der Rückgrat-CO-Gruppe von Y190 eingeht (Abbildung 2 in den Hintergrundinformationen). Das benachbarte *N*-alkylierte Ala<sup>2</sup> ist optimal ausgerichtet, um die lange Guanidinoalkylkette in eine negativ geladene Region des Rezeptors zu platzieren (siehe Abbildung 3 in den Hintergrundinformationen). Daraus ergibt sich eine starke ionische Wechselwirkung der endständigen Guanidigruppe mit D262 und E277. Die gleiche Wechselwirkung wird durch das Arg<sup>14</sup> des CVX15-Peptids in der Kristallstruktur gebildet (siehe Abbildung 2a in den Hintergrundinformationen). Im Einklang mit den SAR-Daten ist die CXCR4-Affinität von der Länge der *N*-Alkylgruppe und der Art des geladenen Rests abhän-



**Abbildung 4.** **4** liegt anders als seine *N*-methylierte Ausgangsverbindung **1c** nur in einer Konformation vor. Die Tyr<sup>1</sup>-Seitenkette und der *N*-Alkylrest gehen eine hydrophobe Wechselwirkung ein, welche die *trans*-Konformation stabilisiert. Aliphatische Protonen sind nicht gezeigt.



**Abbildung 5.** Konformation des Peptoids **8**, gebunden an die CXCR4-Struktur im Kristall, gemäß Berechnung mit der Software Glide. Rezeptor: grünes Stab- und Bändermodell, Ligand: orangenes Stabmodell, H-Brücken: gelbe gestrichelte Linien. Nur die miteinander wechselwirkenden Reste sind gezeigt.

gig. Die beinahe zehnfach höhere Bindung von **8** gegenüber jener von **4** wird durch die doppelte Salzbrücke zwischen der Guanidigruppe und E277 sowie D262 verursacht. Für letzteren genannte Aminosäure haben Mutagenesestudien gezeigt, dass ihr Austausch die antagonistische Aktivität von Bicyclamen unterbindet.<sup>[29]</sup> Eine Wasserstoffbrücke und elektrostatische Wechselwirkungen werden auch durch Arg<sup>3</sup> in **8** gebildet, wodurch polare Kontakte mit D97 und D187 entstehen, während Nal<sup>4</sup> im inneren Teil des Rezeptors eingebettet ist und eine wohlorientierte Kation- $\pi$ -Wechselwirkung mit R188 aufbaut. Diese Wechselwirkung wird weiter durch die Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Nal<sup>4</sup> und der Guanidigruppe R188 des Rezeptors verstärkt.

Die Peptoidstrukturen können zwar als enge Analoga von **1a–c** angesehen werden, allerdings ermöglicht es die gut definierte (*trans*)-Konformation der Amidbindung zwischen Tyr<sup>1</sup> und dem *N*-alkylierten Ala<sup>2</sup> dem Liganden, mit einer Rezeptorregion zu wechselwirken, die zuvor von der Ausgangsverbindung nicht adressiert wurde (siehe Abbildung 5 sowie Abbildung 2b in den Hintergrundinformationen). Sehr wahrscheinlich liegt darin der Grund für die erhöhte Affinität von **8**.

Die äußerst hohe Bindungsaffinität hat uns dazu veranlasst, das Potenzial dieser Verbindung zur Inhibition einer HIV-Infektion zu untersuchen. Zu diesem Zweck haben wir ein Testsystem verwendet, das den vollständigen HIV-Replikationszyklus umfasst und für die Entdeckung und Analyse der Effektivität von HIV inhibierenden Molekülen optimiert wurde.<sup>[30]</sup> Dieses Testsystem basiert auf HIV-infizierbaren Zellen, die den CD4-Rezeptor, CXCR4 als Korezeptor sowie ein Reportergen, das durch HIV-Infektion aktiviert wird und dadurch ein rot fluoreszierendes Protein exprimiert, tragen.

Alle getesteten Verbindungen inhibierten die Infektion der Reporterzellen durch HIV-1(LAI), einen prototypischen

Virenstamm, der CXCR4 für den Zelleintritt nutzt (Tabelle 1).<sup>[31]</sup> **4** und **8**, mit den höchsten CXCR4-Affinitäten, zeigten mit EC<sub>50</sub>-Werten von (53 ± 3.7) und (29 ± 1.5) nm auch die stärksten Anti-HIV-Aktivitäten. **7**, mit der geringsten CXCR4-Affinität, wies auch die schwächste Anti-HIV-Aktivität auf und war 30-mal weniger aktiv als **8**. Die Verbindungen **4**, **8** und **1b** zeigten alle eine stärkere Anti-HIV-Aktivität als AMD3100. Keine der Verbindungen konnte die Infektion von CCR5 exprimierenden Reporterzellen durch HIV-1 (AD8) verhindern. Dies ist ein HIV-1-Isolat, das über den CCR5-Korezeptor in Zellen eindringt,<sup>[32]</sup> wenn es an HIV-infizierbaren Zellen, die den CCR5-Korezeptor exprimieren, getestet wird (siehe Abbildung 1 auf Seite S6 in den Hintergrundinformationen). Dies bestätigt die Spezifität der getesteten Verbindungen für CXCR4 nutzende HIV-1-Varianten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zahl der möglichen Konformationen eines bekannten CXCR4-Liganden durch den Einsatz eines Peptoidmotivs auf eine einzige aktive Konformation beschränkt werden kann. In Kombination mit Struktur-Wirkungs-Beziehungen konnte die Bindungsaaffinität auf das 400- bis 1500-Fache von Liganden wie KRH-1636 oder AMD3100, die sich momentan in der klinischen Entwicklung befinden, erhöht werden.<sup>[33,34]</sup> AMD3100 ist von der FDA für die Behandlung von Nicht-Hodgkin-Lymphomen und multiplen Myelomen zugelassen. Seine Eigenschaften, zusammen mit den generellen Vorteilen modifizierter, cyclischer Peptide als Medikamente (z.B. biokompatibler Metabolismus, hohe Stabilität gegen Enzymabbau, Selektivitätsprofil),<sup>[35,36]</sup> machen das hier vorgestellte peptoidische Pentapeptid zu einem vielversprechenden Kandidaten für künftige medizinische Anwendungen bei Krankheiten, die mit CXCR4 in Verbindung stehen.<sup>[29]</sup>

Eingegangen am 16. März 2012,  
veränderte Fassung am 2. Mai 2012  
Online veröffentlicht am 3. Juli 2012

**Stichwörter:** Biologische Aktivität · Medizinische Chemie · Peptide · Peptidmimetika · Wirkstoff-Design

- [1] W.-T. Choi, S. Duggineni, Y. Xu, Z. Huang, J. An, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 977–994.
- [2] C. C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, T. A. Springer, *Nature* **1996**, *382*, 829–833.
- [3] E. Oberlin, A. Amara, F. Bachelerie, C. Bessia, J.-L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J.-M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggolini, B. Moser, *Nature* **1996**, *382*, 833–835.
- [4] C. Murdoch, *Immunol. Rev.* **2000**, *177*, 175–184.
- [5] R. S. Klein, J. B. Rubin, *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 306–314.
- [6] M. Burger, T. Hartmann, M. Krome, J. Rawluk, H. Tamamura, N. Fujii, T. J. Kipps, J. A. Burger, *Blood* **2005**, *106*, 1824–1830.
- [7] P. Lusso, *EMBO J.* **2006**, *25*, 447–456.
- [8] P. R. Gorry, P. Ancuta, *Curr. HIV/AIDS Rep.* **2011**, *8*, 45–53.
- [9] J. A. Burger, T. J. Kipps, *Blood* **2006**, *107*, 1761–1767.
- [10] H. Tamamura, N. Fujii, *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, *9*, 1267–1282.
- [11] J.-P. Levesque, I. G. Winkler, *Curr. Opin. Organ Transplant.* **2008**, *13*, 53–58.

- [12] H. Tamamura, Y. Xu, T. Hattori, X. Zhang, R. Arakaki, K. Kanbara, A. Omagari, A. Otaka, T. Ibuka, N. Yamamoto, H. Nakashima, N. Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 877–882.
- [13] M. M. Rosenkilde, L.-O. Gerlach, J. S. Jakobsen, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, T. W. Schwartz, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 3033–3041.
- [14] E. De Clercq, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 1655–1664.
- [15] O. Demmer, E. Gourni, U. Schumacher, H. Kessler, H.-J. Wester, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1789–1791.
- [16] O. Demmer, I. Dijkgraaf, U. Schumacher, L. Marinelli, S. Cosconati, E. Gourni, H.-J. Wester, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7648–7662.
- [17] E. Gourni, O. Demmer, M. Schottelius, C. D'Alessandria, S. Schulz, I. Dijkgraaf, U. Schumacher, M. Schwaiger, H. Kessler, H.-J. Wester, *J. Nucl. Med.* **2011**, *52*, 1803–1810.
- [18] N. Fujii, S. Oishi, K. Hiramatsu, T. Araki, S. Ueda, H. Tamamura, A. Otaka, S. Kusano, S. Terakubo, H. Nakashima, J. A. Broach, J. O. Trent, Z. X. Wang, S. C. Peiper, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3373–3375; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3251–3253.
- [19] S. Ueda, S. Oishi, Z.-X. Wang, T. Araki, H. Tamamura, J. Cluzeau, H. Ohno, S. Kusano, H. Nakashima, J. O. Trent, S. C. Peiper, N. Fujii, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 192–198.
- [20] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172.
- [21] B. H. Arison, R. Hirschmann, D. F. Veber, *Bioorg. Chem.* **1978**, *7*, 447–451.
- [22] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 572–573; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 543–544.
- [23] S. C. Shankaramma, K. Moehle, S. James, J. W. Vrijbloed, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Chem. Commun.* **2003**, 1842–1843.
- [24] O. Demmer, I. Dijkgraaf, M. Schottelius, H.-J. Wester, H. Kessler, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2015–2018.
- [25] J. M. Chong, M. A. Heuft, P. Rabbat, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5837–5838.
- [26] C. C. Forbes, K. M. DiVittorio, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9211–9218.
- [27] A. Nilsen, P. M. England, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4902–4903.
- [28] B. Wu, E. Y. Chien, C. D. Mol, G. Fenalti, W. Liu, V. Katritch, R. Abagyan, A. Brooun, P. Wells, F. C. Bi, D. J. Hamel, P. Kuhn, T. M. Handel, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* **2010**, *330*, 1066–1071.
- [29] S. Hatse, K. Princen, L.-O. Gerlach, G. Bridger, G. Henson, E. De Clercq, T. W. Schwartz, D. Schols, *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 164–173.
- [30] S. Kremb, M. Helfer, W. Heller, D. Hoffmann, H. Wolff, A. Kleinschmidt, S. Cepok, B. Hemmer, J. Durner, R. Brack-Werner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 5257–5268.
- [31] K. Peden, M. Emerman, L. Montagnier, *Virology* **1991**, *185*, 661–672.
- [32] E. O. Freed, G. Englund, M. A. Martin, *J. Virol.* **1995**, *69*, 3949–3954.
- [33] K. Ichiyama, S. Yokoyama-Kumakura, Y. Tanaka, R. Tanaka, K. Hirose, K. Bannai, T. Edamatsu, M. Yanaka, Y. Niitani, N. Miyano-Kurosaki, H. Takaku, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4185–4190.
- [34] S. P. Fricker, V. Anastassov, J. Cox, M. C. Darkes, O. Grujic, S. R. Idzan, J. Labrecque, G. Lau, R. M. Mosi, K. L. Nelson, L. Qin, Z. Santucci, R. S. Y. Wong, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 588–596.
- [35] P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatsky, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 40–56.
- [36] J. Chatterjee, B. Laufer, H. Kessler, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 432–444.