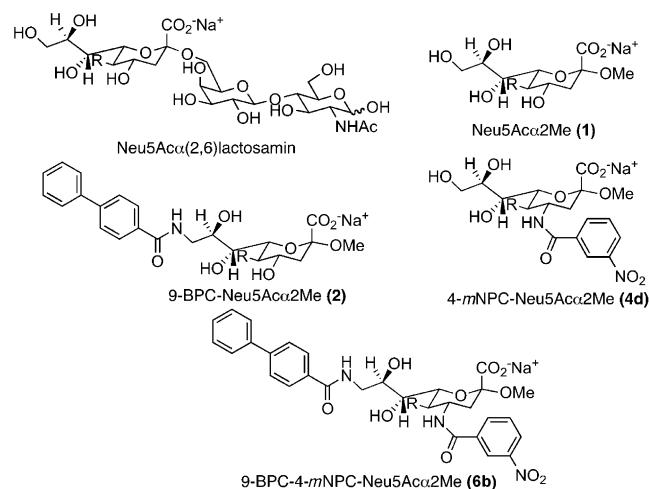


C-4-Modifikation von Sialosiden verstärkt die Bindung an Siglec-2 (CD22) – auf dem Weg zu potenten Siglec-Inhibitoren für eine Immunglykotherapie**

Sørge Kelm,* Paul Madge, Tasneem Islam, Ryan Bennett, Hendrik Koliwer-Brandl, Mario Waespy, Mark von Itzstein und Thomas Haselhorst*

Siglecs (Sialinsäure bindende Immunglobulin-ähnliche Lectine) sind an der Regulation des Immunsystems beteiligt, was eine Basis für innovative Strategien zur Therapie von Immunkrankheiten oder Krebs (Immunglykotherapie) bildet.^[1] Siglec-2 (CD22) spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen und ist daher ein vielversprechendes Ziel für Therapien von Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), die von B-lymphatischen Zellen ausgehen, sowie von verschiedenen Autoimmunerkrankungen. In den USA starben 2010 über 20000 Menschen an NHL, das damit zu den zehn häufigsten Krebsarten gehört.^[2] Siglec-2 bindet bevorzugt α (2,6)-verknüpfte Sialinsäuren (Sia),^[3] z. B. in Neu5Aca(2,6)lactosamin (Schema 1). Neu5Aca2Me (**1**) wechselwirkt mit Siglec-2 hauptsächlich über **1**) die negative Ladung der Carboxygruppe, 2) die C-5-N-Acetamidogruppe und 3) die Glycerin-Seitenkette. Es konnte gezeigt werden, dass die C-9-Hydroxygruppe durch eine Aminogruppe ersetzt werden kann, ohne die Bindung an Siglecs zu beeinträchtigen.^[3] Ausgehend von der Kristallstruktur von Siglec-1 (Sialoadhesin, Sn)^[4] wurden Neu5Ac-Derivate entwickelt, bei denen eine Acylierung dieser Aminogruppe die Affinität des Liganden zu Siglecs um zwei bis drei Größenordnungen verstärkt.^[5] Der erste Durchbruch bei der Entwicklung von potentiellen Siglec-2-Inhibitoren gelang mit der Synthese von 9-Biphenylcarboxamido-9-deoxy-Neu5Aca2Me (9-BPC-Neu5Aca2Me, **2**), das um mehr als zwei Größenordnungen affiner zu Siglec-2 ist als **1**^[5d] und **2** und sich damit eignet, B-Zellsignaltransduktion



Schema 1. Derivate der N-Acetylneuraminsäure (R = NHAc).

zu modulieren. Ferner wurden auf **2** basierende Substanzen entwickelt, die B-Zell-Lymphomzellen abtöten.^[6] Strukturstudien^[4a,b] und Modifikationen der C-5-N-Acylgruppe sowie des C-2-Aglykons von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) führten zu weiteren Verbesserungen der Affinität.^[5a-c,e,f]

Hier berichten wir über Design, Synthese und Evaluierung einer neuen Klasse von disubstituierten Neu5Ac-Derivaten, die an den Positionen C-4 und C-9 von **1** modifiziert wurden. Unser strukturbasiertes Designkonzept führte zu der vielversprechenden Verbindung 9-Biphenylcarboxamido-4-*m*-nitrophenylcarboxamido-4,9-dideoxy-Neu5Aca22Me (9-BPC-4-*m*NPC-Neu5Aca2Me, **6b**), die eine submikromolare Affinität zu Siglec-2 aufweist und somit einen möglichen Weg für eine Immunglykotherapie ebnet.

Ausgehend von unseren Homologiemodellen (siehe Hintergrundinformationen) von Siglec-2 und anderen Siglecs stellten wir die Hypothese auf, dass zusätzliche Wechselwirkungen über eine Substitution an C-4 erzielt werden können. Um diese Theorie zu prüfen, stellten wir uns folgende Fragen:

- 1) Können Substitutionen an C-4 die Wechselwirkungen mit Siglecs verbessern?
- 2) Kommt es dabei zu spezifischen Wechselwirkungen?
- 3) Wirken Modifikationen an C-4 und C-9 synergistisch?
- 4) Binden die C-4-substituierten Neu5Ac-Derivate an die gleiche Bindungsstelle wie andere Sialinsäuren, z. B. **1**?

Um die Frage zu beantworten, ob Modifikationen an der C-4-Position von Neu5Aca2Me (**1**) die Wechselwirkung mit

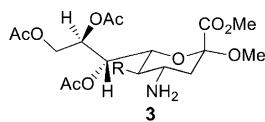
[*] Prof. S. Kelm, Dr. H. Koliwer-Brandl, Dipl.-Chem. M. Waespy
Centrum für Biomolekulare Interaktionen Bremen,
Fachbereich Biologie und Chemie, Universität Bremen
28334 Bremen (Deutschland)
E-Mail: skelm@uni-bremen.de
Homepage: <http://www.cbib.uni-bremen.de>

Prof. S. Kelm, P. Madge, Dr. T. Islam, R. Bennett,
Prof. M. von Itzstein, Dr. T. Haselhorst
Institute for Glycomics, Gold Coast Campus,
Griffith University, Queensland, 4222 (Australien)
E-Mail: t.haselhorst@griffith.edu.au
Homepage: <http://www.griffith.edu.au/glycomics>

[**] Wir danken für finanzielle Unterstützung durch die Volkswagenstiftung (S.K.), die Deutsche Forschungsgemeinschaft (S.K.), die Tönjes-Vagt-Stiftung (S.K.) und den Australian Research Council (T.H., M.v.I.). S.K. dankt für das Sir Allan Sewell Fellowship, das von der Griffith University vergeben wird. Wir danken Mary Murphy (Reichert, Inc., Depew, USA) für die SPR-Analyse.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201207267> zu finden.

Siglec-2 und anderen Siglecs verbessern, wurden neuartige C-4-substituierte Verbindungen ausgehend von **1** synthetisiert (**4b–4g**). Dazu wurde per-O-acyliertes 4-Amino-4-desoxy-Neu5Aca2Me (**3**), das anhand einer bereits beschriebenen



Methode^[7] synthetisiert worden war, mit Acyl- oder Sulfonylchloriden umgesetzt, um nach anschließendem Entfernen der Schutzgruppen die Produkte **4b–4g** zu erhalten (Tabelle 1).

Siglec-2 (CD22), Siglec-4 (Myelin-assoziiertes Glykoprotein, MAG) und Siglec-9 wurden als Modell-Siglecs ausgewählt, um die synthetisierten Substanzen als mögliche Inhibitoren mithilfe des Hapten-Inhibitionstests, bei dem Fetuin als Bindungspartner der Siglecs immobilisiert wurde, zu charakterisieren (Tabelle 1). Die Substanzen **1** und **4a**,^[7c] die in Position C-4 eine Hydroxy- bzw. Aminogruppe tragen, zeigen dabei nur schwache Bindungen an alle drei Siglecs ($IC_{50} \approx 20$ mM oder mehr).

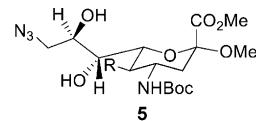
Tabelle 1: Inhibition von Siglec-4 (MAG), Siglec-2 (CD22) und Siglec-9 durch C-4-modifizierte Sia.

| R = NHAc R' | Siglec-2 | Siglec-4 | Siglec-9 |
|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| | rIC ₅₀ ^[a] | IC ₅₀ [mM] ^[b] | |
| 1 OH | 1.0 | 1.0 | k.I. ^[c] |
| 4a NH ₂ | 0.6 | 1.7 | k.I. ^[c] |
| 4b | 2.2 | 0.2 | k.I. ^[c] |
| 4c | 1.7 | 0.6 | k.I. ^[c] |
| 4d | 15 | 0.4 | 6.5 |
| 4e | 10 | 0.5 | k.I. ^[d] |
| 4f | 0.5 | k.I. ^[d] | k.I. ^[d] |
| 4g | 0.7 | k.I. ^[d] | k.I. ^[d] |

[a] rIC₅₀-Werte wurden mit **1** ($IC_{50}=2.0$ mM) als Referenzsubstanz aus den IC₅₀-Werten berechnet. Es wurden mindestens drei Dreifachbestimmungen durchgeführt; die Standardabweichungen waren unter 15%. [b] rIC₅₀-Werte konnten nicht berechnet werden, da **1** bis zu 20 mM nicht inhibierte. [c] Keine Inhibition bei 20 mM. [d] Keine Inhibition bei 2 mM.

Eine N-Acetamidgruppe an C-4 (**4b**) erhöhte die Affinität zu Siglec-2, verbesserte aber nicht die Affinität zu Siglec-9 und verringerte sogar die Bindung an Siglec-4. Für Siglec-2 wurde der größte Anstieg der Bindungsaffinität mit der Einführung einer meta-Nitrophenylcarboxamidgruppe (*m*NPC) in **4d** erreicht ($IC_{50}=0.13$ mM; rIC₅₀=15); dagegen war die Inhibition von Siglec-4 ($IC_{50}=6.3$ mM; rIC₅₀=0.4) oder Siglec-9 ($IC_{50}=6.5$ mM) wesentlich schwächer. Darüber hinaus verdeutlichen die Befunde, dass **4d** und **4e** spezifische Inhibitoren für Siglec-2 sind. Dabei reicht das Vorhandensein eines aromatischen Restes allein (**4c**, **4f** oder **4g**) nicht aus, um die Bindung von Siglec-2 zu verstärken. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der spezifischen Wechselwirkungen der Substituenten an C-4 in **4d** und **4e** mit Aminosäuren in der Nähe der Sialinsäure-Bindungsstelle. Für die genauere Charakterisierung dieser Wechselwirkungen wurden die Interaktionen von **4d** mit Siglec-2, Siglec-4 und Siglec-9 mithilfe von Sättigungstransfer-Differenz(STD)-NMR-Spektroskopie untersucht.^[8] Die STD-NMR-Signale von **4d** wurden auf die Methylprotonen der N-Acetamidgruppe normiert. Das relative Signal des *H*_α-Protons des *m*NPC-Restes war am stärksten im Komplex Siglec-9:**4d**; es war beinahe doppelt so hoch wie für Siglec-2:**4d** und dreimal so hoch wie für Siglec-4:**4d**. Diese Befunde bestätigten unsere Hypothese, dass die *m*NPC-Gruppe an C-4 in **4d** wesentlich zum Inhibitionspotenzial der Substanz beiträgt. Die Protonen der *O*-Methylgruppe von **4d** erhalten im Komplex mit Siglec-2 80% Sättigung, während die entsprechenden Protonen im Komplex mit Siglec-4 und Siglec-9 nur 36 bzw. 16% erhalten.

Als nächster Schritt wurden difunktionalisierte Derivate von **1** mit Modifikationen an C-4 und C-9 synthetisiert, um zu untersuchen, ob solche Modifikationen synergistisch wirken. Die Aminogruppe an C-4 von **3** wurde zunächst durch eine *tert*-Butyloxycarbonyl(Boc)-Gruppe geschützt, um die Zahl der Reaktionsschritte zu minimieren. Dadurch konnte nach Einführung einer Azidgruppe an C-9 in **5**^[9] und anschlie-



ßender Reduktion zum Amin leicht eine BPC-Gruppe eingeführt werden. Nach Entfernen der C-4-Boc-Schutzgruppe wurden die verschiedenen Substituenten am freien Amin in guter Ausbeute an C-4/C-9-modifizierten Substanzen (**6a–d**) eingeführt (siehe Hintergrundinformationen).

Tabelle 2 fasst die Inhibitionspotenziale der Substanzen **6a–d** im Hapten-Inhibitionstest zusammen und zeigt, dass die Modifikationen an C-4 signifikant die Bindung von Siglec-2 verändern. Ein Naphthylamidsubstituent (**6a**) verstärkt die Bindung an Siglec-2 ungefähr auf das Vierfache der Bindung von **2**, während das Dibenzylamidderivat (**6d**) die Bindungsaffinität zu Siglec-2 um den Faktor 13 verringert. Die bedeutendste Erhöhung der Bindungsaffinität wurde für 4-*m*NPC- (**6b**; rIC₅₀=14) oder 4-Toluolsulphonylamidderivate (**6c**; rIC₅₀=20) beobachtet. Dies stimmt sehr gut mit den

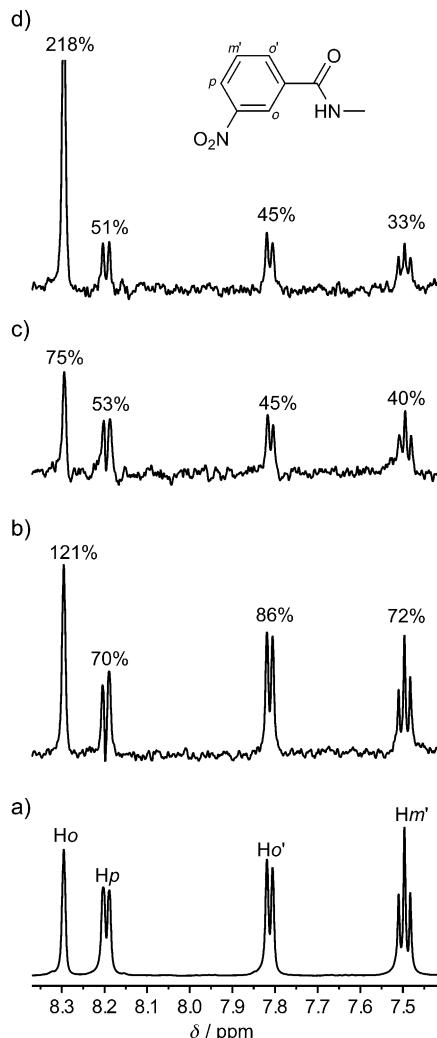
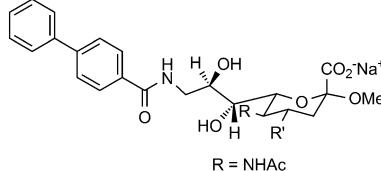


Abbildung 1. a) ^1H -NMR-Spektrum von **4d**; STD-NMR-Spektren von 500 μM **4d** im Komplex mit 5 μM b) Siglec-2, c) Siglec-4 und d) Siglec-9.

rIC₅₀-Werten der Sia-Derivate ohne BPC-Rest an C-9 (Tabelle 1) überein, laut derer der *m*NPC-Rest an C-4 (**4d**) die inhibitorische Potenz um den Faktor 15 erhöht. Sehr deutlich zeigt sich der synergistische Effekt der Modifikationen an C-4 und C-9, der bei **6b** zu einer 9100-fach stärkeren Inhibition als bei **1** führt.

Absolute Bindungsaffinitäten wurden mithilfe von Oberflächenplasmonenresonanz(SPR)-Messungen bestimmt. Dabei wurden Dissoziationskonstanten (K_D) für die Schlüsselverbindungen **1** ($K_D = 31 \text{ mM}$), **2** ($K_D = 7 \mu\text{M}$) und **6b** ($K_D = 660 \text{ nM}$) erhalten (siehe Hintergrundinformationen). Um die Frage zu klären, ob C-4- und/oder C-9-substituierte Sialinsäurederivate an die gleiche Siglec-2-Bindungsstelle wie **1** und **2** binden, wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt. Eine Mischung aus 5 μM Siglec-2 und 500 μM **1** wurde schrittweise mit **4d** versetzt (Abbildung 2 a). Die abnehmenden STD-NMR-Signalintensitäten der Methylprotonen der *N*-Acetamido-Gruppe von **1** zeigen, dass eine Konzentration von 200 μM **4d** ausreicht, um das STD-NMR-Signal von **1** um ca. 50 % zu reduzieren. Bei einer äquimolaren Liganden-

Tabelle 2: rIC₅₀-Werte der C-4/C-9-modifizierten Sia für Siglec-2 (CD22).



| Substanz | R' | rIC ₅₀ ^[a] | |
|-----------|----|----------------------------------|----------|
| | | 2 | 1 |
| 2 | OH | 1.0 | 667 |
| 6a | | 3.8 | 2500 |
| 6b | | 14 | 9100 |
| 6c | | 20 | 13 000 |
| 6d | | 0.1 | 50 |

[a] rIC₅₀-Werte wurden mit **2** ($\text{IC}_{50} = 3.0 \mu\text{M}$) oder **1** ($\text{IC}_{50} = 2.0 \text{ mM}$) als Referenzsubstanzen aus den IC_{50} -Werten berechnet. Es wurden mindestens drei Dreifachbestimmungen durchgeführt, die Standardabweichungen waren unter 15 %.

konzentration verschwindet der STD-NMR-Effekt von **1** fast vollständig (Abbildung 2 a). Dieser Befund ist gut in Einklang damit, dass der rIC₅₀-Wert von **4d** 15-mal höher ist als der von **1** (Tabelle 1).

Bei einem zweiten Verdrängungsexperiment mit 9-BPC-modifizierten Verbindungen wurde eine Mischung aus 5 μM Siglec-2 und 500 μM **2** schrittweise mit **6b** in steigenden

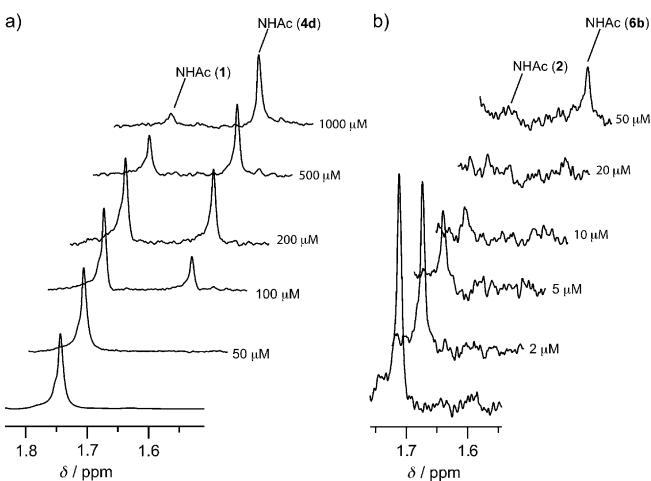


Abbildung 2. STD-NMR-Verdrängungsexperimente von 5 μM Siglec-2 im Komplex mit a) 500 μM **1** und steigender Konzentration an **4d**, b) 500 μM **2** und steigender Konzentration an **6b**. Das ^1H -NMR-Spektrum von **1** bzw. **2** ist am unteren Ende des jeweiligen Elements gezeigt.

Konzentrationen versetzt. Bereits eine sehr geringe Konzentration von **6b** ($5 \mu\text{M}$) war ausreichend, um das STD-NMR-Signal von **2** um über 50% zu reduzieren (Abbildung 2b). Eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ **6b** verringerte die STD-NMR-Effekte von **2** bereits so stark, dass sie kaum nachweisbar waren, was die sehr hohe Affinität von **6b** zu Siglec-2 unterstreicht. Noch deutlicher wurde dies durch die Verdrängung von **1** durch **6b**, da bei einer Konzentration von nur $5 \mu\text{M}$ **6b** keine Bindung von **1** ($500 \mu\text{M}$) an Siglec-2 mehr detektiert werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass **6b** bei äquimolarer Konzentration zum Protein tatsächlich alle verfügbaren Siglec-2-Sialinsäure-Bindungsstellen besetzt.

Das Bindungsepitop von **6b** im Komplex mit Siglec-2 wurde STD-NMR-spektroskopisch bestimmt (Abbildung 3). Das Spektrum zeigt sehr starke STD-NMR-Signale für die *m*NPC-Gruppe des C-4-Substituenten. Die STD-NMR-Effekte der Protonen H^{α} und H^{β} von 181 % bzw. 192 % lassen auf enge Kontakte zum Protein schließen. Diese STD-Effekte sind stärker als die für **4d** bestimmten Intensitäten (Abbildung 1). Die aromatischen Ringe B und C des BPC-

Restes an C-9 erhalten einen deutlich höheren Sättigungsgrad in **6b** als in Substanz **2**. Dadurch ist anzunehmen, dass sowohl der 4-*m*NPC- als auch der 9-BPC-Anteil einen engen Kontakt mit der Proteinoberfläche einnehmen und wesentlich zur Bindungsaffinität des Liganden beitragen. Im Komplex mit Siglec-2 sind die STD-NMR-Effekte für die Protonen des Sia-Ringes und der Glycerinseitenkette von **6b** deutlich stärker als die der Protonen des Sia-Ringes in **1**, **2** oder **4d**. Dieser Anstieg der Sättigung könnte entweder eine Konsequenz des engen Kontaktes der Sia-Struktur von **6b** mit dem Protein oder die Folge eines intramolekularen Transfers der Sättigung sein, die von den aromatischen Substituenten an C-4 und C-9 vermittelt wird. Insgesamt stützt das Bindungsepitop von **6b** die Hypothese, dass der Bindungsmodus zweifach funktionalisierter Sia-Derivate sehr ähnlich, wenn auch nicht notwendigerweise identisch zu jenem von **1** oder **2** ist. Dieses Resultat stimmt sehr gut mit dem Ergebnis des rechnergestützten Docking-Experiments überein (siehe Hintergrundinformationen). Während alle wichtigen Wechselwirkungen zwischen dem Protein und Sia über die Sia-Carboxygruppe, die N-Acetamidgruppe und die Glycerinseitenkette bestehen bleiben, besetzt der BPC-Substituent eine Tasche. Wie in unserem Substanzdesign beabsichtigt, wechselwirkt der *m*NPC-Substituent mit Aminosäuren der Schlaufe zwischen F- und G-Strang.

Zusammenfassend haben wir neue Leitstrukturen mit submikromolaren Affinitäten zu Siglec-2 entwickelt. Die bei diesen Strukturen eingeführten Funktionalisierungen an der C-4-Position von **1** führten zu einer um mindestens eine Größenordnung besseren Wechselwirkung mit Siglec-2, beispielsweise bei **4d**. Außerdem wirken diese Substituenten synergistisch mit denen an der C-9-Position, wie in **6b**. Wir folgen außerdem, dass **4d** wahrscheinlich an dieselbe Sia-Bindestelle wie **2** und **1** bindet. Dies bekräftigt unsere Ausgangshypothese, dass die Modifikationen an C-4 und C-9 synergistisch wirken und dass das Anbringen passender Substituenten an C-4 und C-9 die Bindung zu Siglec-2 signifikant verstärkt. Auf Grundlage veröffentlichter Erkenntnisse^[5,9] über Siglec-4 und Siglec-2 ist zu erwarten, dass das Anbringen von entsprechenden Substituenten an C-2 zu einem weiteren Anstieg der Affinität führen wird, wie bereits für **2** gezeigt wurde. Ähnlich wie Antikörper, die mit zytotoxischen Medikamenten derivatisiert werden, könnten entsprechende Polymere mit hochaffinen Siglec-2-Inhibitoren wie **6b** funktionalisiert werden, um ähnliche Effekte zu induzieren,^[5b,e,f] und sogar biologisch aktiver Substanzen liefern, als sie für entsprechende Derivate von **2** beschrieben sind.^[6b,10] Unser Ansatz stellt damit Leitstrukturen zum Design einer neuen Generation von Siglec-Inhibitoren als möglichen Wirkstoffen für eine Immunglykotherapie bereit.

Eingegangen am 8. September 2012,
veränderte Fassung am 26. November 2012
Online veröffentlicht am 25. Februar 2013

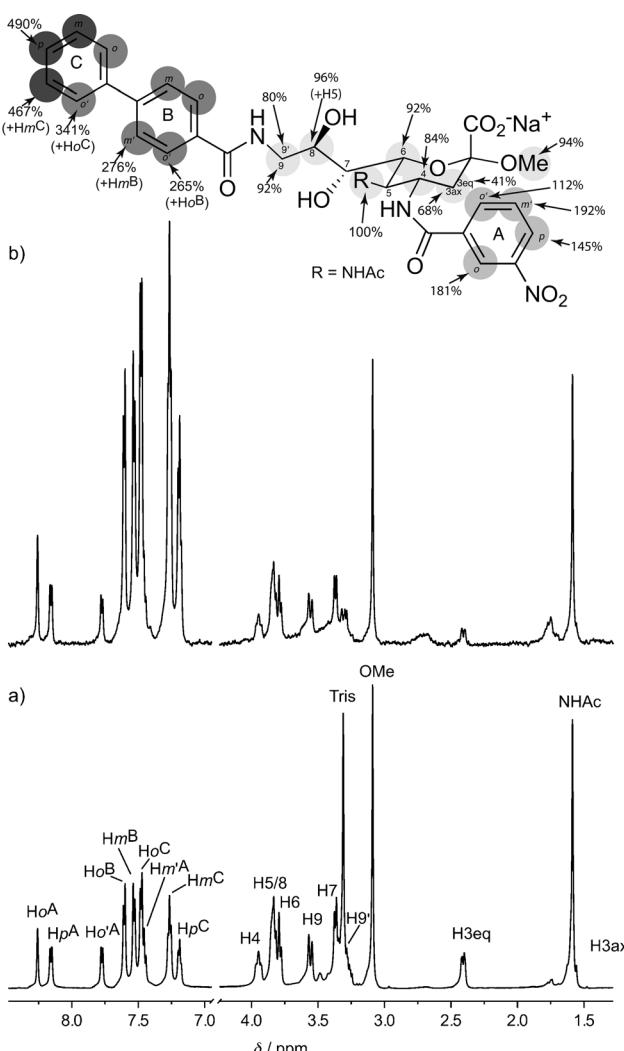


Abbildung 3. a) ^1H -NMR- und b) STD-NMR-Spektren von $500 \mu\text{M}$ **6b** im Komplex mit $5 \mu\text{M}$ Siglec-2; ax = axial, eq = äquatorial, Tris = 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol.

Stichwörter: Immunchemie · Krebs · NMR-Spektroskopie · Sialinsäure · Siglecs

- [1] C. Jandus, H. U. Simon, S. von Gunten, *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 323.
[2] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, *Ca-Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 277.
[3] S. Kelm, R. Grossmer, R. Isecke, H. J. Gross, K. Strenge, R. Schauer, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 663.
[4] a) N. R. Zaccai, A. P. May, R. C. Robinson, L. D. Burtnick, P. R. Crocker, R. Grossmer, S. Kelm, E. Y. Jones, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 1469; b) N. R. Zaccai, K. Maenaka, T. Maenaka, P. R. Crocker, R. Grossmer, S. Kelm, E. Y. Jones, *Structure* **2003**, *11*, 557; c) A. P. May, R. C. Robinson, M. Vinson, P. R. Crocker, E. Y. Jones, *Mol. Cell* **1998**, *1*, 719.
[5] a) S. V. Shelke, B. Cutting, X. Jiang, H. Koliwer-Brandl, D. S. Strasser, O. Schwardt, S. Kelm, B. Ernst, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5857; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5721; b) S. Mesch, K. Lemme, M. Wittwer, H. Koliwer-Brandl, O. Schwardt, S. Kelm, B. Ernst, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 134; c) S. Mesch, K. Lemme, H. Koliwer-Brandl, D. S. Strasser, O. Schwardt, S. Kelm, B. Ernst, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1348; d) S. Kelm, J. Gerlach, R. Grossmer, C. P. Danzer, L. Nitschke, *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 1207; e) H. H. Abdu-Allah, T. Tamanaka, J. Yu, L. Zhuoyuan, M. Sadagopan, T. Adachi, T. Tsubata, S. Kelm, H. Ishida, M. Kiso, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6665; f) H. H. Abdu-Allah, K. Watanabe, G. C. Completo, M. Sadagopan, K. Hayashizaki, C. Takaku, T. Tamanaka, H. Takematsu, Y. Kozutsumi, J. C. Paulson, T. Tsubata, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1966.
[6] a) W. C. Chen, D. S. Sigal, A. Saven, J. C. Paulson, *Leuk. Lymphoma* **2012**, *53*, 208; b) W. C. Chen, G. C. Completo, D. S. Sigal, P. R. Crocker, A. Saven, J. C. Paulson, *Blood* **2010**, *115*, 4778.
[7] a) E. Schreiner, E. Zbiral, R. G. Kleineindam, R. Schauer, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *129*, 0; b) M. von Itzstein, B. Jin, W. Y. Wu, M. Chandler, *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 181; c) S. Ciccosoto, M. von Itzstein, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5405.
[8] a) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864; b) M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784; c) T. Haselhorst, F. E. Fleming, J. C. Dyason, R. D. Hartnell, X. Yu, G. Holloway, K. Santegoets, M. J. Kiefel, H. Blanchard, B. S. Coulson, M. von Itzstein, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 91.
[9] S. V. Shelke, G. P. Gao, S. Mesch, H. Gähde, S. Kelm, O. Schwardt, B. Ernst, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4951.
[10] L. Cui, P. I. Kitov, G. C. Completo, J. C. Paulson, D. R. Bundle, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 546.