

Strukturbasiertes Design von Hemmstoffen der Aspartylprotease Endothiapepsin mittels dynamischer kombinatorischer Chemie**

Milon Mondal, Nedyalka Radeva, Helene Köster, Ahyoung Park, Constantinos Potamitis, Maria Zervou, Gerhard Klebe* und Anna K. H. Hirsch*

Abstract: Strukturbasiertes Design (SBD) wird für den Entwurf und/oder die Optimierung neuer Hemmstoffe für biologische Targets verwendet. Während De-novo-SBD selten benutzt wird, befassen sich Berichte über SBD meistens mit der Optimierung eines anfänglichen Hits. Dynamische kombinatorische Chemie (DKC) hat sich bei der Identifizierung biologisch aktiver Liganden bewährt, da sie es dem Target ermöglicht, die Synthese der stärksten Binder zu steuern. Aus einer Bibliothek möglicher Hemmstoffe (Acylhydrazone), aus je fünf Aldehyden und Hydraziden erzeugt, haben wir mithilfe von DKC den besten Binder identifiziert. Nach Zugabe der Aspartylprotease Endothiapepsin haben wir die an das Protein gebundenen Bibliotheksmitglieder mittels Sättigungstransferrendifferenz (STD)-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Cokristallstrukturen bestätigen den vorhergesagten Bindungsmodus der beiden stärksten Hemmstoffe und zeigen, dass die Kombination von De-novo-SBD und DKC eine effiziente Identifizierung und Optimierung von Hits ermöglicht.

Im letzten Jahrzehnt hat sich die dynamische kombinatorische Chemie (DKC)^[1] als leistungsstarke Strategie für die Identifizierung von Liganden für biologische Zielstrukturen entwickelt.^[2] DKC ermöglicht die Bildung einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek (DKB), worin die Verknüpfung zwischen den Bausteinen im chemischen Gleichgewicht reversibel sind. Nach Zugabe einer Zielstruktur werden ein

oder mehrere Bibliotheksmitglieder gebunden, dieses hat die Selektion und Amplifikation des stärksten Binders aus der DKB zur Folge. Sättigungstransferrendifferenz (STD)-NMR-Spektroskopie, welche die direkte Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen dem Ligand und seiner Zielstruktur in Lösung ermöglicht,^[3] wurde angewendet, um die an diese gebundenen DKB-Mitglieder zu identifizieren.^[4] Neben DKC stellt auch strukturbasiertes Design (SBD) eine leistungsstarke Strategie für das Design und die Optimierung biologisch aktiver Verbindungen dar.^[5] Während De-novo-SBD wenig verwendet wird,^[6] befassen sich die meisten Berichte über SBD mit der Optimierung eines anfänglichen, auf andere Art und Weise gefundenen „Hits“. Deshalb sollte die Kombination von SBD und DKC eine höchst effiziente Strategie für die Identifizierung von „Hits“ in einer Reihe von medizinalchemischen Projekten darstellen. Hier haben wir De-novo-SBD in Kombination mit acylhydrazonebasierter DKC und ¹H-STD-NMR-Spektroskopie verwendet, um eine neue Familie potenter Hemmstoffe für Endothiapepsin, welches zur bekannterweise anspruchsvollen Klasse der Aspartylproteasen gehört,^[7] zu identifizieren. Schlussendlich haben wir den vorgeschlagenen Bindungsmodus mittels Röntgenkristallographie validiert.

Endothiapepsin gehört zur Familie der pepsinartigen Aspartylproteasen, die an einer Vielzahl von Krankheiten wie Bluthochdruck und Malaria ursächlich beteiligt sind.^[7] Endothiapepsin wurde als Modellenzym für mechanistische Studien^[8] sowie für die Entwicklung von Hemmstoffen für Renin^[9] und β -Secretase verwendet.^[10] Eukaryotische Aspartylproteasen bestehen aus zwei strukturell ähnlichen Untereinheiten, die jeweils einen Aspartylrest zur katalytischen Diade beitragen (Asp35 und Asp219 in Endothiapepsin), welche die Spaltung der Peptidbindung des Substrats mithilfe eines Wassermoleküls ermöglicht.

Die Bildung von Imin-artigen Bindungen wurde schon in medizinalchemischen DKC-Projekten angewendet.^[11] In wässriger Lösung, die für jede biologische Anwendung verwendet werden muss, sind Imine nicht ausreichend stabil, Acylhydrazone hingegen bieten den richtigen kinetischen und thermodynamischen Kompromiss.^[12] Trotz ihrer pH-Abhängigkeit erhält diese Bindungsart zunehmende Aufmerksamkeit.

Allerdings erfordert ihre Anwendung, dass das Zielprotein bei Raumtemperatur eine Woche lang stabil ist (pH 7.2),^[2c] die Verwendung von Anilin als nukleophiles Katalysator (pH 6.2)^[13] oder eines sauren Puffersystems (pH < 6). Acylhydrazone sind attraktiv für biologische DKC, da die Bausteine einfach erhältlich sind, eine Amid-artige Bindung enthalten, Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren sowie eine hydrophobe Gruppe.

[*] M. Mondal, Dr. A. K. H. Hirsch
Stratingh Institute for Chemistry, University of Groningen
Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen (Niederlande)
E-Mail: A.K.H.Hirsch@rug.nl
Homepage: <http://www.rug.nl/research/bio-organic-chemistry/hirsch/>

N. Radeva, Dr. H. Köster, Dr. A. Park, Prof. Dr. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
E-Mail: Klebe@Staff.Uni-Marburg.de

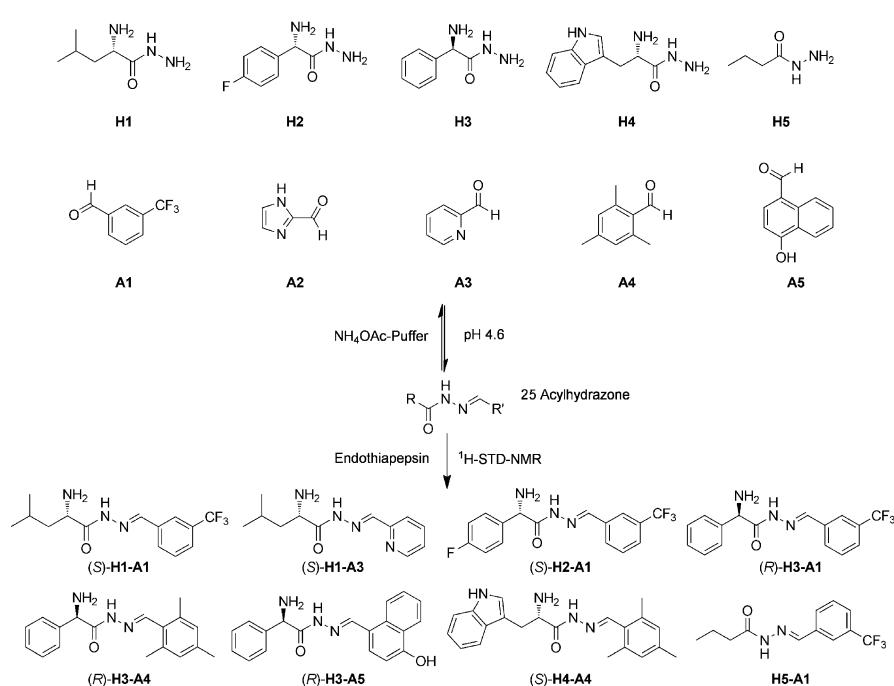
Dr. C. Potamitis, Dr. M. Zervou
Institute of Biology, Medicinal Chemistry & Biotechnology
National Hellenic Research Foundation
48, Vas. Constantinou Ave, Athens 11635 (Griechenland)

[**] Wir danken Pieter van der Meulen für hilfreiche Vorschläge und Gespräche über STD-NMR-Spektroskopie. Finanzierung wurde durch die Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO-CW, VENI grant für A.K.H.H.), das Dutch Ministry of Education, Culture, Science (Gravity program 024.001.035) und das siebte Rahmenprogramm der Europäischen Union (FP7-REGPOT-2009-1; grant agreement No. 245866 für C.P. und M.Z.) und den ERC advanced grant No. 268145 DrugProfilBind ermöglicht.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309682> zu finden.

toren für molekulare Erkennung durch die Zielstruktur aufweisen und im saurem Bereich sowie bei physiologischem pH ausreichend stabil sind (Abbildung S1), um die direkte Analyse der DKB zu ermöglichen. Das pH-Optimum von Endothiapepsin liegt bei 4.5, und wir haben gezeigt, dass das Enzym unter diesen Bedingungen bei Raumtemperatur mehr als 20 Tage lang stabil ist (Abbildung S2). Somit ist es ein ideales Zielenzym für ein SBD-Projekt, das acylhydrazonebasierte DKC verwendet.

Wir haben zwei Cokristallstrukturen von Endothiapepsin (PDB: 3PBD und 3PIO) genutzt, die zwei alternativen Bindungsmodi aufweisen: mit und ohne kristallographisch lokalisiertem Wassermolekül. Wir haben nicht die mit den Strukturen komplexierten Fragmente als Startpunkt verwendet, sondern einzige die Struktur des Enzyms.^[14] Wir haben mit der Molecular-Modeling-Software MOLOC^[15] und dem FlexX-Dockingmodul in der LeadIT-Suite^[16] eine Reihe von Acylhydrazenen entworfen, um die katalytische Diade über Wasserstoffbrücken zu adressieren. Die Acylhydrazoneinheit erschien uns als geeignetes zentrales Gerüst, weil die Modellierung eine Verankerung im aktiven Zentrum durch ein starkes Wasserstoffbrückennetzwerk mit der katalytischen Diade zeigte. Wir haben eine α -Aminogruppe eingeführt, die ladungsvermittelte Wasserstoffbrücken mit der katalytischen Diade sowie mit Asp81, Asp33, Gly221 oder Thr222 bilden kann. Wir haben zwei alternative Bindungsposen modelliert, worin die Acylhydrazone die katalytische Diade entweder direkt oder über das katalytische Wassermolekül adressieren (Abbildung 1). Während der



Schema 1. Dynamische Bildung der Acylhydrazonebibliothek und enzymatische Selektion der besten Hemmstoffe über Analyse der ^1H -STD-NMR-Spektren.

Modellierung haben sich die *E*-Isomere als geeignetstes Gerüst erwiesen, welches zwei Vektoren aufweist, die in die S2-, S1-, S1'- und S2'-Taschen gerichtet sind. Eine Inspektion der Cokristallstrukturen von Endothiapepsin mit elf Fragmenten^[14] sowie Hot-Spot^[17]-Analysen des aktiven Zentrums von Endothiapepsin zeigen, dass sowohl aromatische als auch aliphatische Substituenten in den S2-, S1-, S1'- und S2'-Taschen benachbart zu der katalytischen Diade aufgenommen werden können. Laut unserer Modellierung, finden sowohl mono- als auch bicyclische aromatische Einheiten in der S1'/S2'-Tasche Platz, während die hydrophobe S2-Tasche am besten durch einen Mesitylsubstituenten gefüllt wird. Die S1/S1'-Tasche kann einen Indolyl-, Isobutyl- oder Phenylrest aufnehmen. Wir haben eine Reihe acylhydrazonebasierter Hemmstoffe ausgewählt (siehe Abbildung S3 und Tabelle S1 für ausgewählte Docking-Resultate) deren Retrosynthese zu fünf Hydraziden **H1-H5** und fünf Aldehyden **A1-A5** führte (Schema 1).

Während alle Aldehyde sowie das Hydrazid **H5** kommerziell erhältlichen sind, konnten die Hydrazide **H1-H4**, ausgehend von den entsprechenden enantiomerenreinen Methylestern, durch Behandlung mit Hydrazin-Monohydrat in 80–90% Ausbeute erhalten werden (Schema S1). Für die Synthese von Hydrazid **H2** haben wir von einer asymmetrischen Strecker-Reaktion, ausgehend von kommerziell erhältlichem *para*-Fluorbenzaldehyd, Gebrauch gemacht (Schema S2).^[18]

Wir haben ^1H -STD-NMR-Experimente verwendet, um die besten Kombinationen von Komponenten zu identifizieren, die an Endothiapepsin gebunden werden, da diese Methode die Messung gebundener Liganden ermöglicht und nur

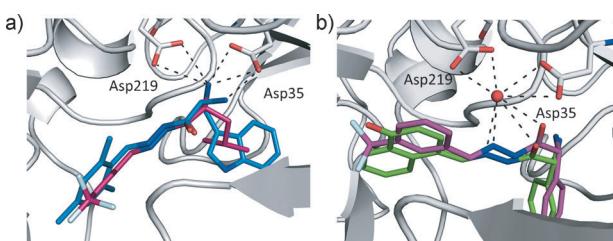


Abbildung 1. Überlagerung des mithilfe von MOLOC erzeugten Molekülmodells möglicher Hemmstoffe mit a) direkten H-Brücken an die katalytische Diade im aktiven Zentrum von Endothiapepsin (PDB-Code: 3PBD) und b) über das katalytische Wassermolekül vermittelten H-Brücken mit der katalytischen Diade im aktiven Zentrum von Endothiapepsin (PDB-Code: 3PIO). Farbkodierung: gefaltetes Proteinrückgrat: grau; Hemmstoffgerüste: C grün, violett, rosa, blau; N dunkelblau; F türkis; O rot; kristallographisch lokalisiertes Wassermolekül: rote Kugel.

geringe Mengen nichtmarkierten Proteins benötigt.^[3] Um die Analyse zu vereinfachen, haben wir die gesamte Bibliothek in fünf Teilbibliotheken aufgeteilt, bestehend aus jeweils fünf Hydraziden und einem Aldehyd, die zur Bildung von fünf möglichen Acylhydrazenen führt (zehn Isomere, einschließlich *E/Z*-Isomere), die im Gleichgewicht mit den anfänglichen Bausteinen sind (Schema S3). Die Möglichkeit der Bildung von Iminen mit der freien Aminogruppe der Hydrazide **H1–H4** oder einer Lys-Seitenkette an der Proteinoberfläche kann im saurem pH-Bereich ausgeschlossen werden.^[19] Nach Zugabe des Zielenzyms zu den Bibliotheken, die bereits im Gleichgewicht vorlagen, wurden die Acylhydrazone durch Analyse der Signale für ihre Imin-artigen (Abbildungen S4, S5, S6 und S7) und α -Kohlenstoff-gebundenen (Abbildung S8) Protonen in den ^1H -STD-NMR-Spektren identifiziert. In den fünf Teilbibliotheken wurden acht Binder identifiziert (Schema 1). Um spezifische von nichtspezifischer Bindung zu unterscheiden, haben wir den starken Hemmstoff Saquinavir ($K_i = 48 \text{ nm}$) zur **H1–A4**-Teilbibliothek gegeben, worauf dessen Signale im ^1H -STD-NMR-Spektrum sichtbar wurden, während die Acylhydrazone-Signale verschwanden. Dies bestätigt die spezifische Bindung der Acylhydrazone **H3–A4** und **H4–A4** (Abbildung S9).

Um die biologische Aktivität der ^1H -STD-NMR-spektroskopisch identifizierten Verbindungen zu untersuchen, haben wir Inhibitionstudien mit den aus den entsprechenden Aldehyd- und Hydrazidvorstufen synthetisierten Acylhydrazenen (**S–H1–A1**, **S–H1–A3**, **S–H2–A1**, **R–H3–A1**, **R–H3–A4**, **R–H3–A5**, **S–H4–A4** und **H5–A1**) durchgeführt (Schemata S4 und S5). Die Hemmwirkung wurde für die Mischungen von *E/Z*-Isomeren bestimmt, wozu ein Fluoreszenz-Assay zum Einsatz kam, der analog aus einem HIV-Protease-Assay übernommen wurde (Abbildungen S10–S15).^[20]

Der Enzyminhibitionstest bestätigte das Resultat der ^1H -STD-NMR-Experimente: Die acht Acylhydrazone hemmen Endothiapepsin mit IC_{50} -Werten im Bereich von 13–365 μM . Die stärksten Hemmer, Acylhydrazone (**S–H4–A4** und **R–H3–A5**) zeigen IC_{50} -Werte von 12.8 μM und 14.5 μM (Tabelle 1). Die experimentellen freien Bindungsenergien (ΔG) und Ligandeneffizienzen (LE), die wir von den IC_{50} -Werten über die Cheng-Prusoff-Gleichung erhalten haben,^[21]

Tabelle 1: IC_{50} -Werte, berechnete K_i -Werte, ΔG und LEs der acht als Hemmstoffe von Endothiapepsin identifizierten Acylhydrazone.^[a]

Hemmstoff	IC_{50} [μM]	K_i [μM]	ΔG [kJ mol^{-1}]	LE
(S – H4–A4)	12.8 ± 0.4	6 ± 0.2	–30	0.27
(R – H3–A5)	14.5 ± 0.5	7 ± 0.2	–30	0.29
(S – H1–A1)	150 ± 17	71 ± 8	–24	0.27
(S – H2–A1)	177 ± 13	83 ± 6	–23	0.23
(R – H3–A4)	206 ± 19	97 ± 9	–23	0.25
(R – H3–A1)	352 ± 13	166 ± 6	–22	0.22
(S – H1–A3)	365 ± 95	172 ± 45	–22	0.30
H5–A1	unlöslich	–	–	–

[a] Werte geben die Inhibitionskonstante (K_i), die Gibbsche freie Bindungsenergie (ΔG) und Ligandeneffizienz (LE) an, die aus der Cheng-Prusoff-Gleichung abgeleitet wurden.^[21] Die Details des Protokolls für den biologischen Assay sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

korrelieren mit den berechneten Werten der Scoring-Funktion HYDE in der LeadIT-Suite ($\Delta G_{\text{HYDE}}((S)\text{–H4–A4}) = -32 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G_{\text{HYDE}}((R)\text{–H3–A5}) = -26 \text{ kJ mol}^{-1}$; siehe Tabelle 1 und Tabelle S1).^[22]

Um den mittels SBD vorhergesagten Bindungsmodus zu bestätigen, ließen wir die beiden stärksten Hemmstoffe in Endothiapepsin-Kristalle eindiffundieren. So konnten wir die Kristallstrukturen von (**R**–**H3–A5** (PDB-Code: 3T7P) und (**S**–**H4–A4** (PDB-Code: 4KUP) als Komplex mit Endothiapepsin bei 1.25 \AA bzw. 1.31 \AA Auflösung bestimmen (Abbildungen S16–S19). Bei den „Soaking“-Experimenten wählt das Enzym das *E*-Isomer aus der *E/Z*-Isomerenmischung aus.

Die Co-Kristallstruktur von (**R,E**–**H3–A5** zeigt im aktiven Zentrum zwei Liganden: einer bindet an die katalytische Diade, während der zweite Richtung Lösungsmittel zeigt. Wegen der Zugänglichkeit für das Lösungsmittel und dem Fehlen von Kontakten mit dem Protein ist der Teil dieses Liganden, der in der Elektronendichtheckarte nicht sichtbar ist, wahrscheinlich höchst ungeordnet und nimmt verschiedene Konformationen ein. Auch der Komplex (**S,E**–**H4–A4** weist zwei Ligandenmoleküle in der Bindetasche auf. Nur das erste bindet an die katalytische Diade, während das zweite Ligandenmolekül dem Lösungsmittel ausgesetzt ist und, analog zum vorangehenden Fall, nur teils in der Elektronendichtheckarte sichtbar und partiell populierte ist (63%; Abbildung 2).

Um zu erörtern, ob die zusätzlich gebundenen Liganden nur wegen der hohen Ligandenkonzentrationen während des „Soaking“-Experiments beobachtet wurden, haben wir Kristalle bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen präpariert (2 mM , 20 mM und 100 mM) und unterschiedliche Datensätze gesammelt (PDB-Codes: 4LHH, 4KUP und 4LBT). Bemerkenswerterweise, wurde bei der niedrigsten Konzentration nur der Bindungsmodus beobachtet, bei dem der Ligand einen Kontakt mit der katalytischen Diade eingeht. Bei der höchsten Konzentration ist ein dritter Bindungsmodus zu sehen (Abbildung S20). Deswegen nehmen wir an, dass nur die Bindungsposen von (**R,E**–**H3–A5** und (**S,E**–**H4–A4** in der Nähe der katalytischen Diade für unsere Überlegungen relevant sind.

Die detaillierten Bindungsmodi beider Liganden sind in Abbildung 2 sowie in den Abbildungen S11 und S12 gezeigt. Das Amid-NH von (**R,E**–**H3–A5** bildet eine über das katalytische Wassermolekül vermittelte H-Brücke mit der katalytischen Diade aus (Abbildung 2a). Das Imin-artige N-Atom des Acylhydrazonlinkers akzeptiert eine H-Brücke vom Rückgratamid-NH von Gly80 (2.9 \AA). Eine weitere H-Brücke ist zwischen der Carbonylgruppe des Acylhydrazone und dem Rückgratamid-NH von Asp81 (3.0 \AA) zu sehen. Die Hydroxygruppe der Naphtholyleinheit des zweiten Liganden stellt das Proton für eine H-Brücke zu dem äußeren O-Atom der Seitenkette von Asp219 bereit (2.8 \AA). Außerdem bildet die α -Aminogruppe des Liganden eine schwache H-Brücke mit einem benachbarten Wassermolekül aus. Der Rest des Liganden ist in den S1'- und S2-Taschen gebunden und zeigt in Richtung Lösungsmittel.

(**S,E**–**H4–A4** wechselwirkt mit der katalytischen Diade auf eine andere Art und Weise (Abbildung 2b), da es die α -Aminogruppe nutzt, um eine direkte H-Brücke mit Asp35 (2.8 \AA , 3.2 \AA) und Asp219 (2.9 \AA) zu bilden; die α -Amino-

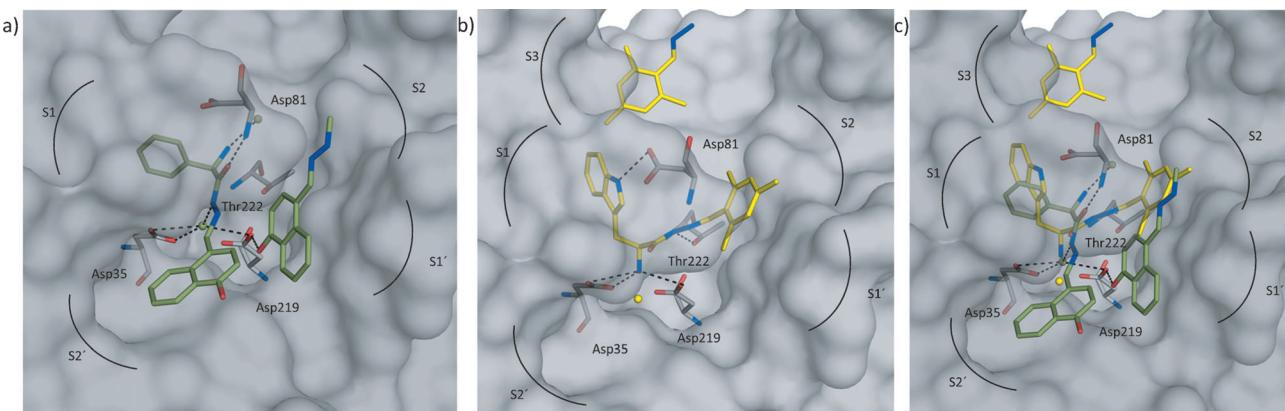


Abbildung 2. Röntgenkristallstrukturen von Endothiapepsin, cokristallisiert mit Liganden: a) Übersicht über die beiden Moleküle von (R,E)-H3-A5 (C grün, Wassermoleküle: grüne Kugeln), gebunden im aktiven Zentrum (PDB-Code: 3T7P). Der zentrale Ligand bindet über das katalytische Wassermolekül an Asp35 und Asp219. b) Übersicht über die zwei Moleküle von (S,E)-H4-A4 (C gelb, Wassermolekül: gelbe Kugel, PDB-Code: 4KUP). Der zentrale Ligand adressiert Asp35 und Asp219 direkt über seine α -Aminogruppe. c) Überlagerung von (R,E)-H3-A5 und (S,E)-H4-A4. Nur die Oberfläche des Komplexes mit (R,E)-H3-A5 ist gezeigt.

gruppe belegt nahezu dieselbe Position wie das katalytische Wassermolekül im Komplex mit (R,E)-H3-A5. Während die Amid-artige NH-Gruppe des Acylhydrazoneinkers eine H-Brücke mit der Hydroxygruppe der Seitenkette von Thr222 (2.8 Å) bildet, geht das indolische NH eine H-Brücke mit der Carboxygruppe von Asp81 ein (3.0 Å).

(R,E)-H3-A5 und (S,E)-H4-A4 belegen unterschiedliche Regionen der Bindungstasche von Endothiapepsin. Die unterschiedlichen Bindungsposen werden offensichtlich durch die invertierte Stereochemie am $\text{C}\alpha$ hervorgerufen. Auf diese Weise kann (S,E)-H4-A4 die S1-Tasche mit seiner Indolyleinheit besetzen und so von CH- π -Wechselwirkungen mit Phe116 und Leu125 profitieren. Zusätzlich wird eine Salzbrücke mit der katalytischen Diade gebildet. Außerdem platziert (R,E)-H3-A5 seine hydrophobe Phenylgruppe in der S1-Tasche und ist an CH- π - und π - π -Wechselwirkungen mit Leu125 und Phe116 beteiligt; die Stereochemie ermöglicht allerdings keine Wechselwirkung mit der katalytischen Diade. Stattdessen wird der wasservermittelte Kontakt über den Acylhydrazoneinker erreicht. Dieser Ligand zieht Nutzen aus CH- π -Wechselwirkungen mit Ile77 und Leu133 über die hydrophobe Naphtholeinheit in der S2'-Tasche, während (S,E)-H4-A4 einige hydrophobe Kontakte mit Ile300 und Ile304 in der S2-Tasche eingeht. Die Bindungsposen, die durch die zusätzlichen Liganden, die bei höheren Konzentrationen in die Kristalle eindiffundieren, angezeigt werden, zeigen Orte für sekundäre Wechselwirkungen, die wohl nur geringe Affinitätsbeiträge leisten.

Zusammenfassend haben wir zum ersten Mal gezeigt, dass die Kombination von De-novo-SBD und DKB eine leistungsfähige und effiziente Methode für die schnelle Identifizierung neuer Hemmstoffe der Aspartylprotease Endothiapepsin ist. Wir haben ^1H -STD-NMR-Spektroskopie genutzt, um die Binder direkt aus der DKB zu identifizieren. Die besten gefundenen Verbindungen zeigen IC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Bereich. Darauffolgende Bestimmungen der Cokristallstrukturen haben unsere computerchemischen Vorhersagen bestätigt, dass entweder direkte oder wasservermittelte Wechselwirkungen mit der katalytischen Diade

erlangt werden können. Wir haben über die ersten acylhydrazonebasierten Hemmstoffe von Endothiapepsin und Aspartylproteasen im Allgemeinen berichtet. Unsere Kombination von komplementären Methoden verspricht, die erfolgreiche Suche nach Wirkstoffen, nicht nur für die bekannterweise anspruchsvolle Klasse der Aspartylproteasen, sondern für ein weites Spektrum von Zielstrukturen zu beschleunigen. Da neben der Identifizierung auch die gleichzeitige Optimierung neuer Hemmstoffe möglich wird, bietet sich die Chance, vor allem in den frühen Phasen einer Wirkstoffsuche erfolgreich zu sein.

Eingegangen am 6. November 2013
Online veröffentlicht am 14. Februar 2014

Stichwörter: Dynamische kombinatorische Chemie · Enzymhemmstoffe · Röntgenstrukturanalyse · STD-NMR-Spektroskopie · Strukturbasiertes Design

- [1] a) J.-M. Lehn, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 151–160; b) P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3652–3711; c) J. Li, P. Nowak, S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9222–9239.
- [2] a) O. Ofori, J. Hoskins, M. Nakamori, C. A. Thornton, B. L. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6380–6390; b) M. Demetriadis, I. K. H. Leung, R. Chowdhury, M. C. Chan, M. A. McDonough, K. K. Yeoh, Y. Tian, T. D. W. Claridge, P. J. Ratcliffe, E. C. Y. Woon, C. J. Schofield, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6776–6779; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6672–6675; c) V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490–497; d) S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 219–226; e) O. Ramström, J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 26–36.
- [3] a) J. Angulo, P. M. Nieto, *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 1357–1369; b) B. Claasen, M. Axmann, R. Meinecke, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 916–919; c) S. Di Micco, C. Bassarello, G. Bifulco, R. Riccio, L. Gomez-Paloma, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 230–234; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 224–228; d) T. Dierckx, J. P. Ribeiro, F. J. Canada, S. Andre, J. Jimenez-Barbero, H. Gabius, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 5666–5668; e) S. Mari, D. Serrano-Gomez, F. J. Canada, A. L. Corbi, J. Jimenez-Barbero,

- Angew. Chem.* **2005**, *117*, 300–302; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 296–298; f) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
- [4] R. Caraballo, H. Dong, J. P. Ribeiro, J. Jimenez-Barbero, O. Ramström, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 599–603; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 589–593.
- [5] a) A. Kondaskar, S. Kondaskar, J. C. Fishbein, B. A. Carter-Cooper, R. G. Lapidus, M. Sadowska, M. J. Edelman, R. S. Hosmane, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 618–631; b) S. Kalyanamoorthy, Y. P. Chen, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 831–839; c) G. Schneider, U. Fechner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 649–663.
- [6] a) A. K. H. Hirsch, S. Lauw, P. Gersbach, W. B. Schweizer, F. Rohdich, W. Eisenreich, A. Bacher, F. Diederich, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 806–810; b) S. Ni, Y. Yuan, J. Huang, X. Mao, M. Lv, J. Zhu, X. Shen, J. Pei, L. Lai, H. Jiang, J. Li, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5295–5298.
- [7] J. B. Cooper, *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 155–173.
- [8] a) L. Coates, P. T. Erskine, S. Mall, R. Gill, S. P. Wood, D. A. A. Myles, J. B. Cooper, *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 559–566; b) L. Coates, P. T. Erskine, S. P. Wood, D. A. A. Myles, J. B. Cooper, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13149–13157; c) L. Coates, H. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, J. Cooper, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7235–7237.
- [9] J. Cooper, W. Quail, C. Frazao, S. I. Foundling, T. L. Blundell, C. Humblet, E. A. Lunney, W. T. Lowther, B. M. Dunn, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8142–8150.
- [10] S. Geschwindner, L. Olsson, J. S. Albert, J. Deinum, P. D. Edwards, T. de Beer, R. H. A. Folmer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5903–5911.
- [11] G. R. L. Cousins, S. A. Poulsen, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1999**, 1575–1576.
- [12] a) M. Sindelar, T. A. Lutz, M. Petrera, K. T. Wanner, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1323–1340; b) M. Hochgürtel, H. Kroth, D. Piecha, M. W. Hofmann, C. Nicolau, S. Krause, O. Schaaf, G. Sonnenmoser, A. V. Eliseev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3382–3387; c) T. Bunyapaiboon, H. Ramström, O. Ramström, J. Haiech, J.-M. Lehn, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5803–5811.
- [13] A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15602–15603.
- [14] H. Köster, T. Craan, S. Brass, C. Herhaus, M. Zentgraf, L. Neumann, A. Heine, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7784–7796.
- [15] P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 251–268.
- [16] BioSolveIT GmbH, Sankt Augustin. <http://www.biosolveit.de>, LeadIT, Version 2.1.3.
- [17] H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe, *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, *20*, 115–144.
- [18] Y. Perez-Fuertes, J. E. Taylor, D. A. Tickell, M. F. Mahon, S. D. Bull, T. D. James, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6038–6047.
- [19] C. Godoy-Alcantar, A. K. Yatsimirskey, J.-M. Lehn, *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 979–985.
- [20] M. V. Toth, G. R. Marshall, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 544–550.
- [21] H. C. Cheng, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2001**, *46*, 61–71.
- [22] a) N. Schneider, S. Hindle, G. Lange, R. Klein, J. Albrecht, H. Briem, K. Beyer, H. Claussen, M. Gastreich, C. Lemmen, M. Rarey, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 701–723; b) I. Reulecke, G. Lange, J. Albrecht, R. Klein, M. Rarey, *Chem-MedChem* **2008**, *3*, 885–897.