

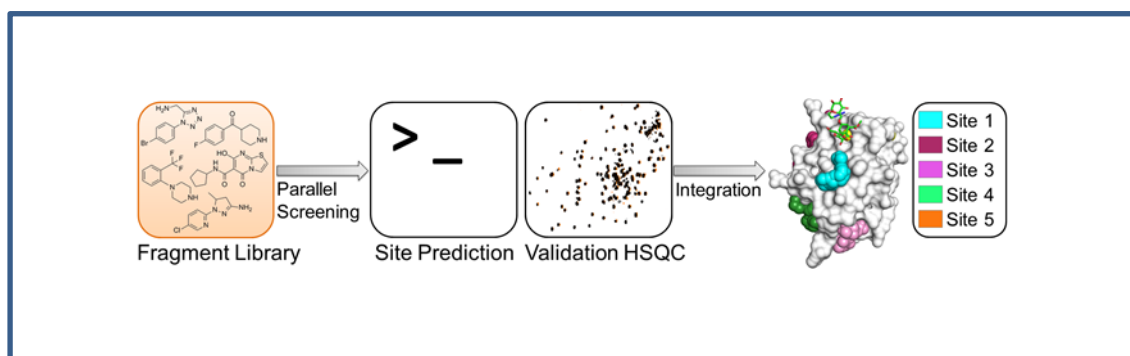


Published in final edited form as:

Aretz, J., Baukmann, H., Shanina, E., Hanske, J., Wawrzinek, R., Zapol'skii, V. A., et al. (2017).
Identifikation sekundärer Bindestellen auf DC-SIGN mithilfe eines Fragment-Screenings.
Angewandte Chemie, 129(25), 7398-7402. doi:10.1002/ange.201701943.

Identifikation sekundärer Bindestellen auf DC-SIGN mithilfe eines Fragment-Screenings

Jonas Aretz, Hannes Baukmann, Elena Shanina, Jonas Hanske, Robert Wawrzinek, Viktor A. Zapol'skii,
Peter H. Seeberger, Dieter E. Kaufmann, Christoph Rademacher



Mehrere Bindetaschen: DC-SIGN, seit 15 Jahren bekannt für seine Rolle in der HIV trans-Infektion von T Zellen, ist eines der attraktivsten Zielproteine aus der Familie der Glykan-bindenden Proteine. Trotzdem sind nur wenige wirkstoffähnliche Effektoren bekannt, was sich möglicherweise mit Hilfe von sekundären Bindetaschen umgehen lassen könnte, die druggable sind.

Identifikation sekundärer Bindestellen auf DC-SIGN mit Hilfe eines Fragmentscreenings

Jonas Aretz^[a,b], Hannes Baukmann^[a,b], Elena Shanina^[a,b], Jonas Hanske^[a,b], Robert Wawrzinek^[a], Viktor A. Zapol'skii^[c], Peter H. Seeberger^[a,b], Dieter E. Kaufmann^[c], Christoph Rademacher^{*[a,b]}

Zusammenfassung: Der Oberflächenrezeptor DC-SIGN ermöglicht die Aufnahme unterschiedlicher Krankheitserreger, wie HIV, Ebolavirus oder *Mycobacterium tuberculosis*. In den letzten fünfzehn Jahren wurden deshalb zahlreiche Versuche unternommen, Inhibitoren gegen die Bindung dieses Rezeptors an Kohlenhydratstrukturen dieser Pathogene zu entwickeln. Aufgrund der hydrophilen und wenig markanten Glykan-Bindungsstelle gibt es nur eine begrenzte Anzahl wirkstoffähnlicher Liganden für DC-SIGN. In der vorliegenden Studie beschreiben wir parallele Fragmentscreenings mit SPR und einem *Reporter Displacement Assay*, welche unsere vorherigen Screenings mit ¹⁹F NMR und chemischen Microarrays ergänzen. Die Validierung von aktiven Substanzen mit SPR und ¹H-¹⁵N HSQC NMR zeigte, dass kein Fragment in die primäre Kohlenhydrattasche bindet, dafür jedoch fünf sekundäre Bindestellen vorhanden sind, die mit wirkstoffähnlichen Molekülen interagieren können. Mit Hilfe der Schlüsselinteraktionen der hier gezeigten Fragmente können diese Regionen gezielt erkundet und zukünftige Ansätze zur Entwicklung von DC-SIGN Inhibitoren beschleunigt werden.

Der C-Typ Lektin-Rezeptor (CLR) DC-SIGN erkennt Lewis-Antigene und hoch-mannosylierte Kohlenhydrate durch Komplexierung mit Ca²⁺^[1]. DC-SIGN ist ein homöostatischer Immunrezeptor, der Immuntoleranz vermittelt, solange keine proinflammatorischen Signale vorliegen, ein Prozess mit hoher Relevanz bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, Fibrose und Toleranz gegenüber Transplantaten^[2]. Daneben werden Antigene verschiedener Pathogene erkannt, was eine Immunstimulation oder, wie im Fall von HIV, Ebolavirus oder *M. tuberculosis*, eine Immunevasion hervorrufen kann^[3]. Auf Grund seiner selektiven Expression auf Antigen-präsentierenden Zellen ist DC-SIGN ein interessantes Zielprotein für neuartige Vakzinierungsstrategien, die auf dem Prinzip des *Targeted Delivery* basieren^[4].

Die extrazelluläre Domäne von DC-SIGN bildet Homotetramere, die jeweils aus einer Hals- und einer Kohlenhydraterkennungsdomäne (CRD) bestehen. Die Tetramerisierung ermöglicht Aviditätsgewinn, wodurch die Bindung von niedrigaffinen, monovalenten Kohlenhydraten (K_d

(Mannose) = 3,5 mM^[5]) durch multivalente Interaktionen in den nanomolaren Bereich verstärkt wird (K_d (gp120) = 1 – 2 nM^[6]). So konnten durch die Präsentation einfacher Kohlenhydrate auf multivalenten Trägermaterialien nano- bis picomolare Inhibitionskonstanten erreicht werden^[7], während monovalente Kohlenhydratderivate im mikromolaren Bereich angesiedelt und somit nur schwach aktiv sind^[8]. Daneben sind wirkstoffähnliche DC-SIGN Inhibitoren bisher auf Quinoxalon-Derivate beschränkt^[9].

Die Entwicklung von Inhibitoren gegen Säugerlektine wird durch die flachen und hydrophilen Bindungsstellen erschwert. Eine vielversprechende Strategie basiert auf einer Modifizierung des ursprünglichen Kohlenhydrats oder eines Glykomimetikums^[10]. Dieser Ansatz setzt jedoch die Existenz von ausgedehnten Bindetaschen voraus, die zusätzliche Interaktionen mit z.B. hydrophoben Substituenten ermöglichen. Solche sekundären Bindestellen sind selten beschrieben und häufig nicht aus der Analyse von Kristallstrukturen ersichtlich, da sie durch geringe Veränderungen in der Geometrie des Proteins entstehen können. Frühere Studien zeigten, dass DC-SIGN wirkstoffähnliche Substanzen erkennt^[9, 11]. Da diese Inhibitoren keine funktionellen Gruppen besitzen, die mit dem primären Ca²⁺ Kation interagieren können, wurde ein allosterischer Wirkmechanismus vermutet^[12]. Jedoch blieb die Existenz solcher Bindetaschen ungeklärt. Daher verwenden wir in dieser Studie Fragment-basiertes Screening, um wirkstoffähnliche Liganden mit niedrigem Molekulargewicht zu finden und ihre jeweiligen Bindetaschen in DC-SIGN zu identifizieren.

Dazu wurde eine Bibliothek bestehend aus 986 Fragmenten, die der „Rule of Three“ folgen, parallel mit Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und einem *Reporter Displacement Assay* (RDA) gegen DC-SIGN getestet. Zusammen mit den Ergebnissen unserer vorherigen Screenings gegen 281 Fragmente mit ¹⁹F NMR und einem chemischen Microarray standen uns somit eine Vielzahl von Hits aus orthogonalen Screeningmethoden zur Verfügung. Dieser Datensatz wurde, wie im Anhang beschrieben, ausführlich analysiert und diskutiert (Abbildungen 1, S2, S3)^[11, 13]. An dieser Stelle befassen wir uns mit den 49 Treffern (5,0% Trefferquote) aus dem SPR- und den 46 Treffern (16,3%) aus dem ¹⁹F NMR-Screening (Abbildungen 1a, S2a). Diese 95 Substanzen wurden anschließend im SPR und RDA auf Aktivität überprüft (Abbildung 1 b,c). Daraus resultierten 61 (64%) validierte Treffer im SPR und vier (4%) in SPR und RDA. Mit einer Affinität von etwa 0,3 mM ist 6 eine Substanz mit einer der höchsten bekannten Ligandeneffizienzen gegen DC-SIGN (LE = 0,34 kcal HA⁻¹ mol⁻¹). Weiterhin weisen diese Ergebnisse auf eine moderate *Druggability* von DC-SIGN hin^[14], was unsere vorherigen Ergebnisse bestätigt^[11]. Jedoch waren nur vier Substanzen mit Inhibitionskonstanten schlechter als 1 mM im RDA aktiv. Da dieser Test nicht Bindung, sondern direkte Konkurrenz mit natürlichen Liganden misst, spricht dies für eine niedrige *Druggability* der Kohlenhydratbindestelle^[14]. Zusammengefasst deutet die Diskrepanz zwischen der Anzahl

[a] J. Aretz, H. Baukmann, E. Shanina, Dr. J. Hanske, Dr. R. Wawrzinek, Dr. P. H. Seeberger, Dr. C. Rademacher
Abteilung für Biomolekulare Systeme
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam
E-Mail: christoph.rademacher@mpikg.mpg.de

[b] J. Aretz, H. Baukmann, Dr. J. Hanske, Dr. P. H. Seeberger, Dr. C. Rademacher
Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie
Freie Universität Berlin
Takustraße 3, 14195 Berlin

[c] Dr. V. A. Zapol'skii, Dr. D. E. Kaufmann
Institut für organische Chemie
Technische Universität Clausthal
Leibnizstraße 6, 38678 Clausthal-Zellerfeld

der Binder und der Anzahl der Inhibitoren auf die Existenz sekundärer Bindetaschen hin, die potentiell *druggable* sind.

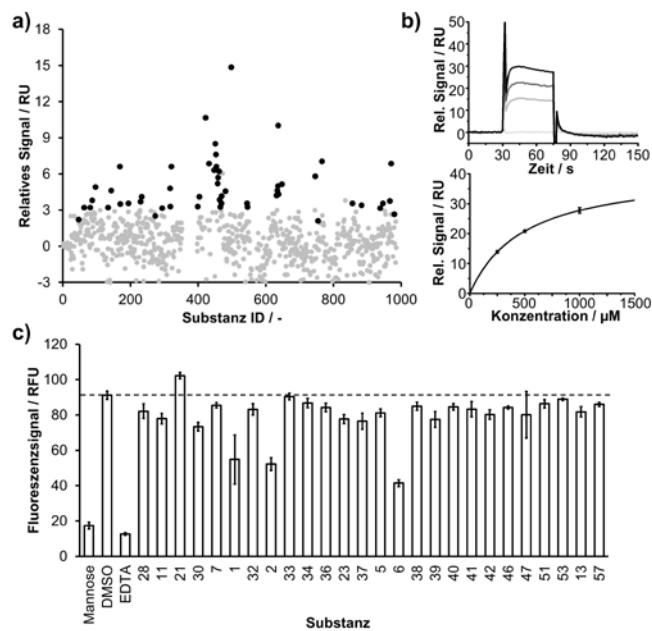


Abbildung 1. Beispiele aus dem Fragmentscreening gegen DC-SIGN und anschließenden Validierungsexperimenten. a) Punktdiagramm der relativen Signaländerung in relativen Einheiten (RU) aufgetragen gegen die Substanznummer aus dem SPR-Screening. Eine RU von mehr als 3,0 bzw. eine berechnete LE > 0,5 wurden als Trefferdefinition verwendet (schwarz). Substanzen, deren Signale die berechnete RU_{max} überschritten, negative Signale oder eine langsame bzw. irreversible Kinetik zeigten, wurden als Falschpositive ausgeschlossen. b) SPR-Sensorgramme und nicht-lineare Regression eines *one-site-binding* Modells aus einem Validierungsexperiment von **8**. Die apparente Dissoziationskonstante wurde mit 500 µM abgeschätzt (n=3). c) Orthogonales Validierungsexperiment mit einem FITC-Dextran-basierten RDA. Substanzen wurden in Dreifachbestimmung bei einer Konzentration von 1 mM gemessen und mit einer DMSO-Kontrolle verglichen. 30 mM des Liganden Mannose dienten als weitere Kontrolle.

Um die Existenz dieser sekundären Bindetaschen nachzuweisen, wurden 1H - ^{15}N HSQC NMR-Experimente mit ^{15}N -markierter DC-SIGN CRD^[15] (Abbildung 2 a) sowie eine rechnergestützte Vorhersage von Bindetaschen durchgeführt. Als experimentelle Kontrolle diente eine Titration mit dem millimolaren Liganden Mannose, die zu den erwarteten Änderungen in chemischer Verschiebung (CSPs) und verringerten Intensitäten von Signalen in der Nähe der primären Bindetasche führte – vergleichbar mit vorherigen Daten zu Lewis X^[15] (Abbildungen 2 b,c, S6, S7). Als nächstes untersuchten wir 28 Fragmente aus den RDA- und SPR-Screenings und lokalisierten ihre Bindetaschen (Abbildung 2). 14 von 19 (74%) validierten Fragmenten aus dem SPR-Screening und alle zehn Substanzen (100%) aus dem ^{19}F NMR-Screening veränderten Resonanzen in den jeweiligen HSQC-Spektren. Die hervorgerufenen Änderungen unterschieden sich sowohl zwischen einzelnen Fragmenten als auch deutlich von Mannose (Abbildungen 2 b,c, S8-15). Dies bekräftigt unsere Hypothese über die Existenz mehrerer sekundärer Bindetaschen.

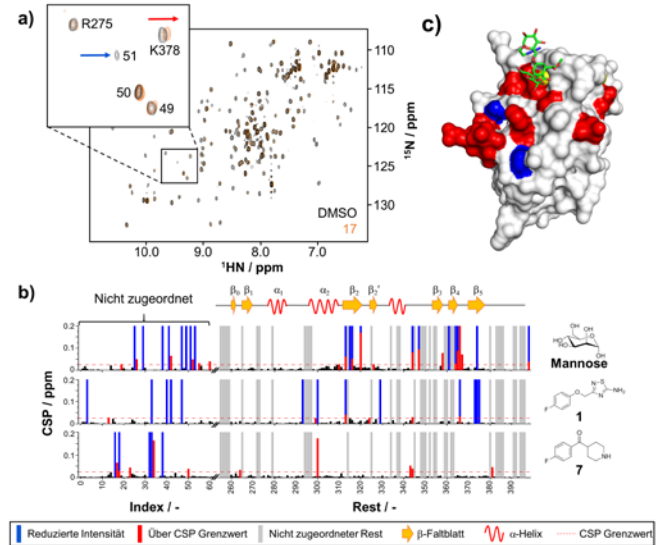


Abbildung 2. Validierung von Treffern und Bestimmung ihrer Bindestelle mit 1H - ^{15}N HSQC NMR. a) Beispiel eines 1H - ^{15}N HSQC NMR-Spektrums von DC-SIGN CRD in Anwesenheit von 1% DMSO (schwarz) und 1 mM **17** (orange, Tabelle S6). Änderungen der chemischen Verschiebung (CSP) und Signalintensität sind durch einen roten bzw. blauen Pfeil hervorgehoben. Nicht zugeordnete Signale wurden indiziert. b) CSP Zuordnungen von Mannose, **1**, und **7**. CSPs, die einen Grenzwert von 0,025 ppm überschritten (rot), Signale, deren Intensitäten um mehr als 50% sanken (blau), sowie Daten für nicht zugeordnete Signale (graue Balken und links) wurden für die Bestimmung der Bindestellen der Fragmente in DC-SIGN verwendet. c) CSPs über und Intensitäten unter dem Grenzwert (rot bzw. blau), welche von Mannose hervorgerufen wurden, sind auf einer Struktur von DC-SIGN CRD (PDB: 2XR6)^[17] in Komplex mit Pseudotrimannosid (grün) dargestellt.

Parallel zu diesen HSQC-Experimenten wurden drei Algorithmen zur Vorhersage von Bindestellen auf der DC-SIGN CRD angewendet⁷. Zusätzlich zu vorherigen Ergebnissen aus DogSiteScorer^[11, 16] wurden Hotspots für mögliche Interaktionen mit wirkstoffähnlichen Substanzen mit einem *in silico solvent mapping* in FTMap^[17] sowie potentiell induzierbare Bindestellen in CryptoSite vorausgesagt^[18]. Mit Hilfe von FTMap bestimmten wir fünf Bindestellen, die sich vor und hinter der primären Kohlenhydratbindestelle (Tasche I bzw. II), in der Nähe der Halsdomäne (Tasche III bzw. IV) und zwischen der α_1 - und α_2 -Helix, entgegengesetzt zur primären Tasche (Tasche V), befinden (Tabelle S3, Abbildungen 3, S16). In diesen fünf Bindetaschen identifizierte CryptoSite ebenfalls potentiell induzierbare Aminosäurereste in den Taschen II bis V. Die Taschen I, III, IV und V wurden ebenfalls mit DogSiteScorer vorhergesagt (Tabellen S4, S5). Interessanterweise wurde die primäre Kohlenhydratbindestasche von keinem der Algorithmen gefunden, was sich wiederum mit unseren HSQC-Daten deckt. Tasche I war weiterhin das Ziel von Naphthyl-substituierten Kohlenhydratanaloga^[8d]. Zusammenfassend bietet DC-SIGN wahrscheinlich fünf sekundäre Bindetaschen für die Bindung wirkstoffähnlicher Substanzen an. Vier hiervon könnten ebenfalls kryptische Taschen sein, d.h. sie öffnen sich erst durch Bindung des Liganden und sind in der statischen Kristallstruktur unsichtbar.

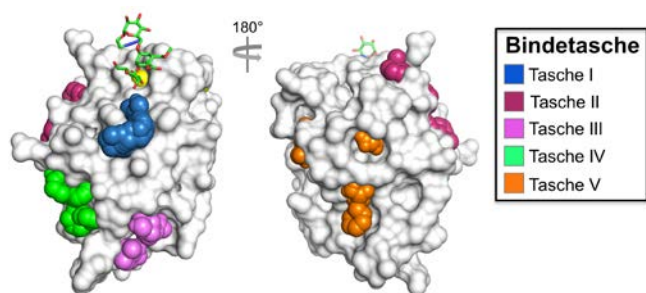


Abbildung 3. Fünf mögliche sekundäre Bindestellen auf DC-SIGN können wirkstoffähnliche Substanzen binden. Diese sind hier durch organische Lösungsmittelmoleküle aus einem *organic solvent mapping* mit FTMMap dargestellt.

Abschließend wurden die berechneten Bindestaschen mit den experimentellen Ergebnissen verglichen. Von 22 aktiven Liganden wurden sechs (27%) Tasche I, vier (18%) Tasche II, zwei (9%) Tasche III, drei (14%) Tasche IV und neun (41%) Tasche V zugeordnet (Tabelle S6, Abbildungen S8-S15). Die mit SPR abgeschätzten Affinitäten der Fragmente in den Taschen III und IV betrug maximal 1 mM, während Binder der Taschen I, II und V hochmikromolar waren (Tabellen 1, S6). Alle vier Inhibitoren aus dem RDA-Screening binden ausschließlich in Tasche I. Auf Grund der Nähe zur primären Bindestelle ist ein Mechanismus wahrscheinlich, der auf sterischer Verdrängung beruht, da eine direkte Interaktion mit Ca^{2+} unwahrscheinlich ist. Zusammengefasst lassen die experimentellen und rechnergestützten Daten eine moderate *Druggability* für die Taschen I, II und V annehmen, während die Taschen III und IV eine niedrige *Druggability* aufzeigen. Weiterhin zeigen Fragmente, die in die Taschen I und V binden, ein SAR (Abbildungen S17, S18).

Tabelle 1. Zusammenfassung der Validierungsergebnisse und Bestimmungen der Bindestellen ausgewählter Treffer^[a].

ID	Struktur	Screen ^[b]	SPR EDTA ^[c]	SPR Ca^{2+} ^[c]	RDA ^[d]	Tasche ^[e]
1		NMR, Array	0.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1	Ja	I
2		NMR, Array	4.8 ± 0.9	3.6 ± 0.3	Ja	I
6		NMR	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	Ja	I
7		NMR	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.2	Nein	II
10		SPR		0.4 ± 0.1	Nein	II

11		NMR, SPR, Array	1.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1 1.8 ± 0.3	Nein	III
14		SPR		0.7 ± 0.1	Nein	IV
16		SPR		0.8 ± 0.2	Nein	V
19		SPR		0.6 ± 0.2	Nein	V
21		NMR, Array	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	Nein	V

[a] Kompletter Datensatz in Tabelle S6. [b] Screening, in dem das Fragment identifiziert wurde (NMR: ^{19}F und T_2 -gefilterte ^{19}F NMR, Array: chemischer Microarray). [c] Mit SPR abgeschätzte Affinität in mM in Anwesenheit von 0,5 mM EDTA oder 2 mM CaCl_2 . [d] Inhibition wurde bei 1 mM finaler Konzentration im RDA überprüft. Substanzen, die das Signal signifikant im Vergleich zu einer DMSO Kontrolle reduzierten, wurden als Treffer gewertet (Dunnett-Test, $p < 0,001$). [e] Experimentelle Bestimmung der Bindestelle (Abbildung 3) mit ^1H - ^{15}N HSQC NMR.

Die Identifikation dieser Taschen könnte die Entwicklung neuer DC-SIGN-Effektoren ermöglichen. Wir haben sechs Substrukturen (**3 bis 7** und **9**) wirkstoffähnlicher Inhibitoren (**24, 25**) den in der Nähe der primären Bindungsstellen befindlichen Taschen I und II zugeordnet (Abbildung S19). Es ist anzunehmen, dass diese *in vitro* und *in vivo* aktiven Effektoren^[2b, 9] ebenfalls in eine dieser Taschen binden (Abbildung S19). Um die Effizienz dieser wirkstoffähnlichen Inhibitoren^[9] zu steigern, könnten Fragmente **1 bis 10** unter Beibehaltung ihrer Schlüsselinteraktionen verbessert werden, was wir mit einem ersten SAR von **5** und **6** demonstrieren konnten (Abbildung S17, **96**). Die Inhibitoren **1, 2, 4** und **6** sind inaktiv im RDA gegen das ebenfalls Mannose-bindende Lektin Concanavalin A und zeigen keine signifikante Aktivität gegenüber verwandten CLRs, was einen falsch-positiven Inhibitionsmechanismus ausschließt (Abbildung S20). Vergleichbar mit **24** und **25** könnten Liganden, die in Tasche I binden, in Richtung der primären Bindestasche erweitert werden und die Interaktion von DC-SIGN mit seinen natürlichen Liganden sterisch behindern (Abbildung S21). Alternativ könnten Binder der Taschen I und II mit einem Glykomimetikum verknüpft werden, um deren Schlüsselinteraktionen mit denen der primären Bindestelle zu kombinieren. Vergleichbare Strategien waren bereits bei der Entwicklung von Inhibitoren gegen $\text{MAG}^{[10c]}$ und E-Selektin^[10a] erfolgreich. Somit könnte die Inhibitorserie, die substituierte D-Mannoside nutzte, um hydrophobe Interaktionen mit Tasche I zur Affinitätssteigerung einzugehen, durch Ersetzen der Naphthyl-Reste mit den Fragmenten **1-6** verbessert werden^[8d]. Interessanterweise konnten Änderungen der Resonanzen von Aminosäuren durch Zugabe von Mannose sowie der meisten Fragmente beobachtet werden, die weit von ihrer zugeordneten Tasche lokalisiert sind. Ein Beispiel ist G264, welches Teil des β_0 -Faltblatts in der Nähe der Halsdomäne ist (Abbildung S16) und seine chemische Verschiebung durch

Bindung von **2**, **3**, **7**, **8** und **9** in den Taschen I und II veränderte. Solche Veränderungen, die über eine weite Distanz hervorgerufen werden, könnten durch ein allosterisches Netzwerk vermittelt werden. Ein solches haben wir kürzlich im verwandten CLR Langerin bei der Regulation der Ca²⁺-Bindung nachgewiesen^[19]. Die Aktivierung eines solchen allosterischen Netzwerks könnte über die Halsdomäne ins Zellinnere weitergegeben werden, was die Initiierung von DC-SIGN-abhängigen Signalkaskaden durch monovalente Liganden erklären könnte^[2b]. Größere strukturelle Umlagerungen in DC-SIGN nach Kohlenhydraterkennung wurden kürzlich mit Hilfe von Oberflächenkraftmessungen beobachtet^[20]. Da die Aktivierung von DC-SIGN-abhängigen Signalwegen eine Rolle bei der Behandlung von Fibrose^[2b] und der Entwicklung von Immuntoleranz bei der Organtransplantation^[2c] spielen könnte, ergäben sich dadurch wichtige klinische Implikationen für DC-SIGN-Agonisten.

In dieser Studie wurden Fragmente aus einem parallelen Screening gegen DC-SIGN mit orthogonalen Methoden validiert und mit ¹H-¹⁵N HSQC NMR analysiert. Durch einen Abgleich experimenteller NMR-Daten mit rechnergestützten Vorhersagen von möglichen Bindestellen wurden schließlich fünf potentielle sekundäre Taschen identifiziert, die wirkstoffähnliche Substanzen binden können. Da drei dieser Taschen moderat *druggable* sind, stellen sie geeignete Ziele zukünftiger Kampagnen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen DC-SIGN dar.

Experimentelles

Experimentelle Details sind im elektronischen Anhang zu finden.

Danksagung

Die Autoren danken der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, RA1944/2-1) und der Boehringer Ingelheim Stiftung für ihre finanzielle Unterstützung. Weiterhin danken wir Olaf Niemeyer für die Wartung der NMR-Spektrometer.

Stichwörter: Wirkstoffentdeckung • Fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung • Glykan-bindende Proteine • NMR-Spektroskopie • Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

- [1] a) H. Feinberg, D. A. Mitchell, K. Drickamer, W. I. Weis, *Science* **2001**, *294*, 2163-2166; b) E. van Liempt, C. M. Bank, P. Mehta, J. J. Garcia-Vallejo, Z. S. Kwar, R. Geyer, R. A. Alvarez, R. D. Cummings, Y. Kooyk, I. van Die, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6123-6131.
- [2] a) J. J. Garcia-Vallejo, J. M. Illarregui, H. Kalay, S. Chamorro, N. Koning, W. W. Unger, M. Ambrosini, V. Montserrat, R. J. Fernandes, S. C. Bruijns, J. R. van Weering, N. J. Paauw, T. O'Toole, J. van Horsen, P. van der Valk, K. Nazmi, J. G. Bolscher, J. Bajramovic, C. D. Dijkstra, B. A. t Hart, Y. van Kooyk, *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1465-1483; b) N. Cox, D. Pilling, R. H. Gomer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 8385-8390; c) P. Conde, M. Rodriguez, W. van der Touw, A. Jimenez, M. Burns, J. Miller, M. Brahmachary, H. M. Chen, P. Boros, F. Rausell-Palamos, T. J. Yun, P. Riquelme, A. Rastrojo, B. Aguado, J. Stein-Streilein, M. Tanaka, L. Zhou, J. Zhang, T. L. Lowary, F. Ginhoux, C. G. Park, C. Cheong, J. Brody, S. J. Turley, S. A. Lira, V. Bronte, S. Gordon, P. S. Heeger, M. Merad, J. Hutchinson, S. H. Chen, J. Ochando, *Immunity* **2015**, *42*, 1143-1158.
- [3] a) T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, Y. van Kooyk, *Cell* **2000**, *100*, 587-597; b) C. P. Alvarez, F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, R. Delgado, *J. Virol.* **2002**, *76*, 6841-6844; c) L. Tailleux, O. Schwartz, J. L. Herrmann, E. Pivert, M. Jackson, A. Amara, L. Legres, D. Dreher, L. P. Nicod, J. C. Gluckman, P. H. Lagrange, B. Gicquel, O. Neyrolles, *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 121-127.
- [4] P. J. Tacken, I. J. de Vries, K. Gijzen, B. Joosten, D. Wu, R. P. Rother, S. J. Faas, C. J. Punt, R. Torensma, G. J. Adema, C. G. Figdor, *Blood* **2005**, *106*, 1278-1285.
- [5] A. Holla, A. Skerra, *Protein Eng. Des. Sel.* **2011**, *24*, 659-669.
- [6] B. M. Curtis, S. Scharnowske, A. J. Watson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 8356-8360.
- [7] a) C. R. Becer, M. I. Gibson, J. Geng, R. Ilyas, R. Wallis, D. A. Mitchell, D. M. Haddleton, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15130-15132; b) A. Munoz, D. Sigwalt, B. M. Illescas, J. Luczkowiak, L. Rodriguez-Perez, I. Nierengarten, M. Holler, J. S. Remy, K. Buffet, S. P. Vincent, J. Rojo, R. Delgado, J. F. Nierengarten, N. Martin, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 50-57; c) Q. Zhang, J. Collins, A. Anastasaki, R. Wallis, D. A. Mitchell, C. R. Becer, D. M. Haddleton, *Angew. Chem.* **2013**, *52*, 4435-4439.
- [8] a) K. C. Garber, K. Wangkanont, E. E. Carlson, L. L. Kiessling, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6747-6749; b) S. Mari, D. Serrano-Gomez, F. J. Canada, A. L. Corbi, J. Jimenez-Barbero, *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 296-298; c) M. Thepaut, C. Guzzi, I. Sutkeviciute, S. Sattin, R. Ribeiro-Viana, N. Varga, E. Chabrol, J. Rojo, A. Bernardi, J. Angulo, P. M. Nieto, F. Fieschi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 2518-2529; d) T. Tomasic, D. Hajsek, U. Svajger, J. Luzar, N. Obermajer, I. Petit-Haertlein, F. Fieschi, M. Anderluh, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 308-326.
- [9] a) M. J. Borrok, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12780-12785; b) S. L. Mangold, L. R. Prost, L. L. Kiessling, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 772-777.
- [10] a) J. Egger, C. Weckerle, B. Cutting, O. Schwardt, S. Rabbani, K. Lemme, B. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9820-9828; b) N. Firon, I. Ofek, N. Sharon, *Carbohydr. Res.* **1983**, *120*, 235-249; c) S. V. Shelke, B. Cutting, X. Jiang, H. Koliwer-Brandl, D. S. Strasser, O. Schwardt, S. Kelm, B. Ernst, *Angew. Chem.* **2010**, *49*, 5721-5725.
- [11] J. Aretz, E. C. Wamhoff, J. Hanske, D. Heymann, C. Rademacher, *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 323.
- [12] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Disc.* **2009**, *8*, 661-677.
- [13] J. Aretz, Y. Kondoh, K. Honda, U. R. Anumala, M. Nazare, N. Watanabe, H. Osada, C. Rademacher, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9067-9070.
- [14] F. N. Edfeldt, R. H. Folmer, A. L. Breeze, *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 284-287.
- [15] K. Pederson, D. A. Mitchell, J. H. Prestegard, *Biochemistry* **2014**, *53*, 5700-5709.
- [16] siehe [17]
- [17] I. Sutkeviciute, M. Thepaut, S. Sattin, A. Berzi, J. McGeagh, S. Grudin, J. Weiser, A. Le Roy, J. J. Reina, J. Rojo, M. Clerici, A. Bernardi, C. Ebel, F. Fieschi, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1377-1385.
- [18] A. Volkamer, D. Kuhn, T. Grombacher, F. Rippmann, M. Rarey, *J. Chem. Inf. Mod.* **2012**, *52*, 360-372.
- [19] D. Kozakov, L. E. Grove, D. R. Hall, T. Bohnuud, S. E. Mottarella, L. Luo, B. Xia, D. Beglov, S. Vajda, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 733-755.
- [20] P. Cimerancic, P. Weinkam, T. J. Rettenmaier, L. Bichmann, D. A. Keedy, R. A. Woldeyes, D. Schneidman-Duhovny, O. N. Demerdash, J. C. Mitchell, J. A. Wells, J. S. Fraser, A. Sali, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 709-719.
- [21] J. Hanske, S. Aleksic, M. Ballaschk, M. Jurk, E. Shanina, M. Beerbaum, P. Schmieder, B. G. Keller, C. Rademacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12176-12186.
- [22] S. Menon, K. Rosenberg, S. A. Graham, E. M. Ward, M. E. Taylor, K. Drickamer, D. E. Leckband, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 11524-115