

Die β -Schleife als Selektivitätsschalter: β I oder β II'? – Das ist hier die Frage**

Gerhard Müller*

Ein zentrales Thema der medizinisch-chemischen Forschung ist die Entdeckung meist niedermolekularer Substanzen, die möglichst selektiv die Funktion von Enzymen oder Rezeptoren modulieren. Die Entwicklung einer identifizierten Leitstruktur hin zum potentiellen Wirkstoffkandidaten verläuft nach einem repetitiven Muster, wobei aufeinanderfolgende Generationen von Analoga synthetisiert und biologisch charakterisiert werden. Der Medizinische Chemiker sucht dabei immer wieder nach neuen, für ein Indikationsgebiet patentierbaren molekularen Templetten, die ihm die Kontrolle über die räumliche Orientierung von interaktionsfähigen Gruppen und damit über den sterisch kontrollierten Aufbau des Pharmakophors ermöglichen.

Die Natur verfügt offenbar über einen universellen Satz solcher Präsentationsmodule, da biochemische Abläufe höchste Anforderungen an die molekulare Erkennung stellen. So ist die biologische Aktivität endogener Peptidhormone häufig in exponentiellen Schleifenregionen kodiert, in denen zwei bis vier für die Aktivität essentielle Aminosäuren z. B. in β -Schleifenkonformationen vorliegen^[1]. Diese β -Schleifen hat man sich als Strukturprinzip zum Design biologisch aktiver Oligopeptide zunutze gemacht, wofür das Forschungsgebiet der antiadhäsiven Arg-Gly-Asp(RGD)-Mimetica (RGD ist eine universelle Zelladhäsionserkennungssequenz^[2]) ein exzellentes Beispiel ist^[3]. Mit graduell verfremdeten RGD-Peptidanalogen sowie mit nicht-peptidischen RGD-Mimetica versucht man die endogen vorhandenen Rezeptoren aus der Familie der Integrine selektiv zu adressieren^[4]. Die Wechselwirkung z. B. mit dem blutplättchenassoziierten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin hemmt die Thrombusbildung, während das tumorzellassoziierte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin das Adhäsionsverhalten metastatisierender Zellen zu beeinflussen scheint. RGD-Mimetica eignen sich somit zur Entwicklung von Antithrombotika und als Inhibitoren der für das Tumorwachstum notwendigen Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese), was sie als potentielle antimetastatische Therapeutika^[3, 4] qualifiziert. Darüber hinaus beginnt man die Bedeutung der Integrine in den pathogenen Mechanismen der Osteoporose zu verstehen, was ein ernstzunehmendes biomedizinisches Potential birgt^[5].

Diese therapeutisch vielversprechenden Perspektiven motivierten anfang der 90er Jahre mehrere Arbeitsgruppen zum Studium cyclischer RGD-Peptide^[3], da deren Strukturen Rückschlüsse auf die biologisch aktive, d. h. rezeptorkomplementäre Konformation zulassen^[6]. Aus dem systematischen Studium von β -Schleifen als Präsentationsmodulen resultierten hochaktive, vor allem aber rezeptorselektive Adhäsionsantagonisten^[3, 7]. In diesem Zusammenhang berichteten kürzlich Wis-

senschaftler vom amerikanischen Pharmaunternehmen DuPont-Merck über die Strukturaufklärung einiger RGD-Peptide (**1a–c**, Abb. 1), die eine ausgesprochene $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Selektivität aufweisen^[8].

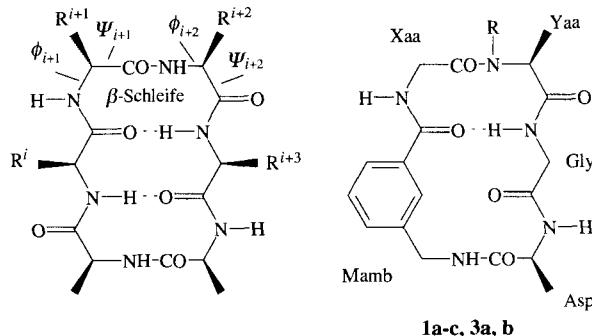


Abb. 1. Vergleich eines aus zwei β -Schleifen aufgebauten cyclischen Hexapeptids (links) mit der Grundstruktur der cyclischen Peptide **1a–c** und **3a,b** (rechts).

Diese Verbindungen resultierten aus einer bei DuPont-Merck systematisch angelegten Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen cyclischer RGD-Peptidanalogen^[9], die basierend auf der experimentell aufgeklärten räumlichen Struktur des disulfidverbrückten Pentapeptids *cyclo*-(1,5)-[Ac-Cys-(NMe)-Arg-Gly-Asp-Pen-NH₂] (Pen: Penicillamin, β,β' -Dimethylcysteine) **2** (SK & F 106 760) der Firma SmithKline Beecham^[10] rational entworfen wurden. Die primäre Zielsetzung war damals die Entwicklung aktiver Antithrombotica, also selektiver $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin-bindender RGD-Mimetica, woraus bei DuPont-Merck die Verbindung DMP 728 **3a** als Entwicklungsubstanz hervorging^[11].

Die Kernaussage der von der DuPont-Merck-Gruppe vorgestellten Arbeit^[8] bezieht sich auf den Austausch der Dipeptidseinheit D-Abu-(NMe)Arg (in **3a**, D-Abu: D-2-Aminobuttersäure) sowie D-Ala-(NMe)Arg (in **3b**) gegen L-Xxx-Arg (Xxx = Ala, Pro in **1a** bzw. **1c**), wonach aus einer $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selektiven Verbindung ein $\alpha_v\beta_3$ -selektives Peptid resultiert (Tabelle 1). Dies scheint a priori nicht sonderlich erwähnenswert, da zum einen bereits 1991 von der Gruppe um H. Kessler die Struktur des aktiven $\alpha_v\beta_3$ -selektiven cyclischen Pentapeptids *cyclo*-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] **4** publiziert wurde^[3a, 12] und zum anderen sich heute bereits mehrere oral verfügbare, nichtpeptidische $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten in Phase III der klinischen Entwicklung befinden^[3e].

Tabelle 1. Vergleich der biologischen Aktivitäten der diskutierten DuPont-Merck-Peptide mit denen des tumorzellassoziierten ($\alpha_v\beta_3$ -) und des blutplättchenassoziierten ($\alpha_{IIb}\beta_3$ -) Integrins. Yaa = L-Arg.

Verbindung	Xaa	R	IC ₅₀ ($\alpha_v\beta_3$) [nM]	IC ₅₀ ($\alpha_{IIb}\beta_3$) [nM]	β -Schleifentyp
1a	L-Ala	H	20	18 000	I
1b	Aib	H	36	9 000	I
1c	L-Pro	H	13	45 000	I
3a	D-Abu	CH ₃	500	2	II'
3b	D-Ala	CH ₃	500	8	II'

* Dr. G. Müller
Bayer AG, MD-IM-FA, Geb. Q18
D-51368 Leverkusen
Telefax: Int + 214/30-50351
E-mail: DEBAY829@IBMAIL.COM

** Der Autor dankt William F. DeGrado und Alvin C. Bach für die Bereitstellung der Strukturkoordinaten einiger in diesem Beitrag beschriebenen Peptide.

Stellt man allerdings die von Bach et al. beschriebenen Resultate in Beziehung zu den experimentell aufgeklärten dreidimensionalen Strukturen der hier angesprochenen Peptide, sind die Konformations-Wirkungs-Daten äußerst interessant und diskussionswürdig.

Die Strukturen der Peptide **1a–c**, **3a** und **3b** entsprechen weitgehend dem generischen Strukturtemplat eines aus zwei β -Schleifenmodulen aufgebauten cyclischen Hexapeptids^[7] (Abb. 1). Da dem meta-Aminomethylbenzoësäure(Mamb)-Baustein in **1a–c**, **3a** und **3b** am C2-Atom des Benzolrings eine Wasserstoffbrückenbindungs-Donorfunktionalität fehlt, wird anders als beim cyclischen Hexapeptid nur eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Gly-NH und Mamb-CO gebildet. Diese stabilisiert eine β -Schleife mit den Aminosäuren L-Ala (**1a**), L-Pro (**1c**), D-Abu (**3a**) bzw. D-Ala (**3b**) in der (*i*+1)- und L-Arg (**1a**, **1c**) bzw. L-(NMe)Arg (**3a**, **3b**) in der (*i*+2)-Position. Der wesentliche Strukturunterschied zwischen dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selektiven DMP 728 **3** und den $\alpha_v\beta_3$ -selektiven Peptiden **1a–c** besteht im Typ der β -Schleife. Während alle L-Xaa^{*i*+1}-L-Arg^{*i*+2} Peptide den Typ β I bilden, liegen die Sequenzen D-Abu^{*i*+1}-L-(NMe)Arg^{*i*+2} in **3a** und D-Ala^{*i*+1}-L-(NMe)Arg^{*i*+2} in **3b** als β II'-Schleife vor. Abgesehen von der bezüglich der Peptid-Ringebene entgegengesetzten Orientierung der Wasserstoffbrückenbindung unterscheiden sich die Schleifen des Typs β I und β II' in der relativen Orientierung des eingehenden und ausgehenden Peptidstranges (Abb. 2).

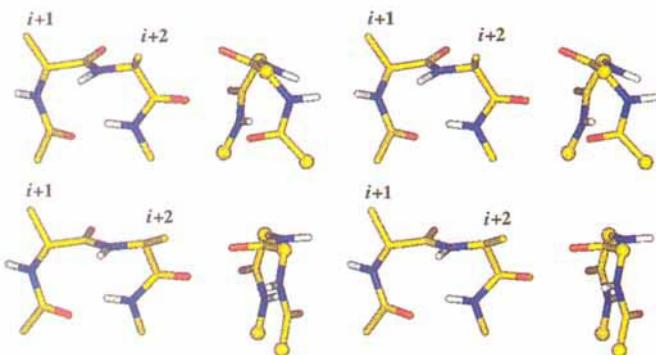


Abb. 2. Stereodarstellung einer β I- (oben) und einer β II'-Schleife (unten). Aus Gründen der Übersicht sind nur die Schweratome und die Amidwasserstoffatome der Modellverbindungen Ac-L-Ala-L-Ala-NHCH₃ (oben) bzw. Ac-D-Ala-L-Ala-NHCH₃ (unten) dargestellt. Die linke Struktur zeigt die Schleife in der Aufsicht und die rechte in einer Art Newman-Projektion, wobei die vier C_α-Atome (als Kugeln dargestellt) der β -Schleife einen Pseudodiederwinkel aufspannen.

Betrachtet man den Pseudodiederwinkel, der von den vier C_α-Atomen der Aminosäuren in den Schleifenpositionen *i* bis *i*+3 aufgespannt wird, so findet man für die β I-Schleife mit 49° (unter Annahme von Idealwerten für die Rückgrattorsionen^[11]) eine annähernd synclinale (+ sc, gauche) Stellung, während für die β II'-Schleife eine synperiplanare (– sp, eclipsed) Anordnung (– 3° für Idealwerte der Rückgrattorsionen^[11]) resultiert (Abb. 2). Dieser Unterschied im β -Schleifentyp hat profunde Auswirkungen auf die relative vektorielle Orientierung der Arg- und Asp-Seitenketten und damit auf das differenzierende Selektivitätsprofil der Peptide. Diese das Pharmakophor konstituierenden Aminosäureseitenketten sind in den Peptiden **1a–c** pseudodiazial angeordnet, während die β II'-Schleife in **3a** und **3b** eine diäquatoriale Ausrichtung ermöglicht (Abb. 3).

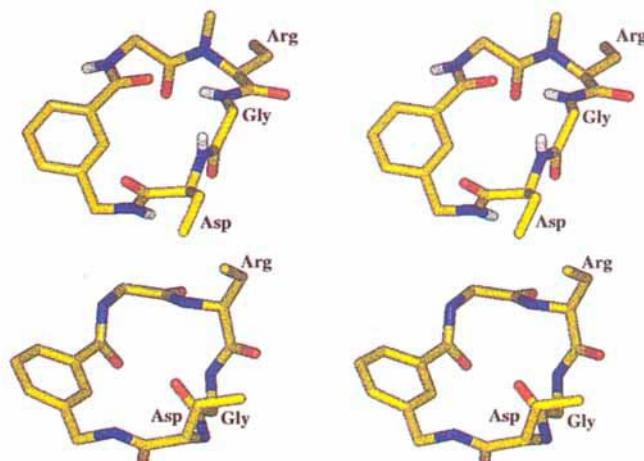


Abb. 3. Vergleich der dreidimensionalen Struktur von **3a** (oben) mit **1c** (unten; Stereodarstellung). Aus Gründen der besseren Übersicht sind nur die Rückgratatome sowie die C_α- und C_β-Atome der Arg- und Asp-Seitenketten gezeigt. Die Struktur von **3a** wurde der Cambridge-Kristallstruktur-Datenbank (Code: HAJRAP) entnommen.

Den Autoren ist es in dieser Studie gelungen^[8], die Rezeptorselektivität mit der vektoriellen Orientierung der Arg- und Asp-Seitenketten zu korrelieren. Der Wechsel im β -Schleifentyp von β II' nach β I führt zu einem invertierten Selektivitätsprofil der beschriebenen Peptide. Dieser Befund deckt sich mit den Strukturcharakteristika des bereits erwähnten $\alpha_v\beta_3$ -selektiven Prototyp-Peptids **4**^[8, 12, 13]. Die in Abbildung 4 gezeigten superpositi-

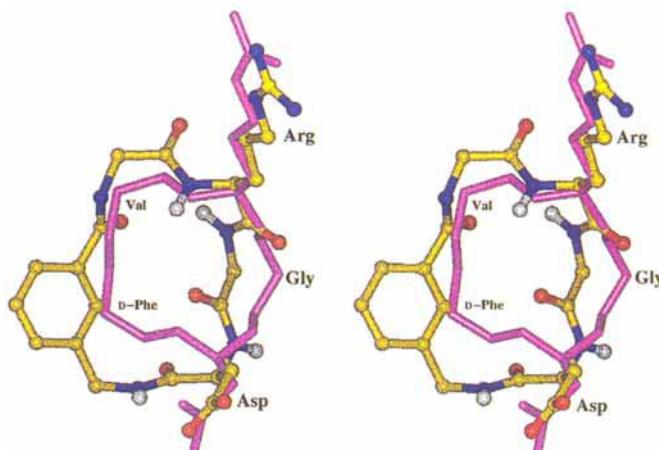


Abb. 4. Stereodarstellung der superpositionierten Strukturen von **1c** und **4** (magenta). Als Referenzatome zur Überlagerung dienten die C_α- und C_β-Atome der Arg- und Asp-Seitenketten. Von **4** sind außer den Rückgrataten nur die Arg- und Asp-Seitenketten gezeigt.

tionierten Strukturen der RGD-Sequenz von **4** und **1c** deutet auf eine unerwartete Korrespondenz hin, obgleich die Erkennungssequenz in **1c** an der „Längsseite“ der generischen Hexapeptid-Templatstruktur positioniert ist (siehe Abb. 1), während sie in **4** eine extrem enge γ -Schleife bildet^[12].

Die β I-Schleife z. B. von **1c** ermöglicht eine annähernd synperiplanare Orientierung zweier Seitenketten in (*i*+2)- und (*i*+4)-Stellung, was offenbar für die $\alpha_v\beta_3$ -Komplementarität wesentlich ist. Diese Orientierung lässt sich nur noch durch Inkorporation des RGD-Tripeptids in die Positionen *i*, *i*+1 und

$i+2$ einer regulären γ -Schleife realisieren, wie mit **4** gezeigt wurde. Allein aus dieser von Bach et al. erarbeiteten Struktur-analogie läßt sich ein neues Peptid-Designprinzip ableiten. Das Mamb-Pro-Element aus **1c** kann in cyclischen Pentapeptiden der Art *cyclo*-[Mamb-Pro-Xaa-Yaa-Zaa] als Strukturklammer eingesetzt werden, die im Xaa-Yaa-Zaa-Tripeptidbereich eine γ -Schleifen-kompatible Konformation induziert.

Diese Ergebnisse liefern somit nicht nur ein verfeinertes Pharmakophormodell, das z. B. als Suchprofil für 3D-Struktur-Datenbankrecherchen zur Leitstrukturforschung α,β_3 -selektiver RGD-Mimetica herangezogen werden kann, sondern sensibilisieren darüber hinaus für die Fragestellung nach kontrollierter Variation des β -Schleifentyps zur räumlichen Feinjustierung pharmakophorer Gruppen. Unter den Medizinischen Chemikern wird dem „Peptid-Designer“ unter anderem durch die hier diskutierten Arbeiten ein Regelwerk zur sterischen Kontrolle über die Ausrichtung funktioneller Gruppen zur Verfügung gestellt. Es ist mehrfach gezeigt worden, daß sich in cyclischen Peptiden positionsspezifisch β -Schleifen induzieren lassen, indem z. B. Prolin, Glycin, D-Aminosäuren oder α,α' -dialkylierte Aminosäuren als schleifeninduzierende Elemente in die Sequenz eingebaut werden^[6, 7]. Die DuPont-Merck-Arbeiten^[8, 9, 11] zeigen darüberhinaus an einem eminent wichtigen biomedizinischen Anwendungsbeispiel, welche Bedeutung der Kontrolle der β -Schleifenarchitektur im Hinblick auf die Selektivität kommt.

Das Potential der β -Schleife als prädestiniertes Präsentations-templat wird angesichts der zahlreichen Projekte der aktuellen Pharmaforschung, die auf die Entwicklung von Peptidrezeptoragonisten sowie -antagonisten abzielen, erst deutlich^[14]. Stellvertretend seien hier nur die Peptidrezeptoren aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren genannt^[15]. Vor diesem Hintergrund gewinnen die hier diskutierten Überlegungen zur Struktur fast Modellcharakter und sollten sich im Rahmen eines strukturbasierten Wirkstoffdesigns auf verwandte Forschungsprojekte projizieren lassen. Im Sinne einer Wirkstoffentwicklung wäre es für die Zukunft wünschenswert, auf nicht-peptidische β -Schleifenmimetica zurückgreifen zu können^[16], die nicht nur die Kontrolle über den nachzubildenden Schleifentyp ermöglichen, sondern optional funktionalisierbar sind, so daß jede Di-, Tri- oder Tetrapeptidsequenz realisiert werden kann. Zweifelsfrei ist dies eine große Herausforderung an den strukturchemisch motivierten Synthetiker, würde aber darüber hinaus auch einen bisher vernachlässigten Aspekt in der chemisch-pharmazeutischen Forschung aufgreifen.

Abschließend läßt sich feststellen, daß gerade das Forschungsgebiet der antiadhäsiven RGD-Mimetica ein exzellentes Beispiel für die Komplementarität des rationalen, strukturorientierten Ansatzes zur Wirkstofffindung und den Screening-

Verfahren ist, und somit beide Ansätze in naher Zukunft zu nichtpeptidischen α,β_3 -selektiven RGD-Mimetica führen werden.

Stichworte: Integrine · Konformation · Peptide · Rezeptoren · β -Turns

- [1] a) J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167–339; b) G. D. Rose, L. M. Giersch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 1–109.
- [2] a) M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33; b) E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491–497; c) S. E. D’Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 246–250.
- [3] a) M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54; b) N. S. Cook, G. Kottrisch, H.-G. Zerwes, *Drugs Future* **1994**, *19*, 135–159; c) T. Weller, L. Alig, M. Hürzeler-Müller, W. C. Kouns, B. Steiner, *ibid.* **1994**, *19*, 461–476; d) V. Austel, F. Himmelsbach, T. Müller, *ibid.* **1994**, *19*, 757–764; e) I. Ojima, S. Chakravarty, Q. Dong, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 337–360; f) P. Raddatz, J. Gante, *Exp. Opin. Ther. Patents* **1995**, *5*, 1163–1183; g) R. Hirschmann, P. A. Sprengeler, T. Kawasaki, J. W. Lachy, C. Shakespeare, A. B. Smith III, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9699–9701; h) J. W. Bean, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, *ibid.* **1992**, *114*, 5328–5334.
- [4] a) R. A. Brown, C. D. McFarland, *Curr. Opin. Ther. Patents* **1993**, 1117–1140; b) D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195–228; c) P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.
- [5] P. G. Robey, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1993**, *28*, 227–236.
- [6] a) H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523; b) V. Hruby, *Life Sci.* **1982**, *31*, 189–199.
- [7] a) M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921; b) G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Design* **1994**, *8*, 709–730; c) H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [8] A. C. Bach II, J. R. Espina, S. A. Jackson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293–294.
- [9] a) A. C. Bach II, C. J. Eyermann, J. D. Gross, M. J. Bower, R. L. Harlow, P. C. Weber, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3207–3219; b) S. A. Jackson, W. F. DeGrado, A. Dwivedi, A. Parthasarathy, A. Highley, J. Krywko, A. Rockwell, J. Markwalder, R. Wexler, S. A. Mousa, R. L. Harlow, *ibid.* **1994**, *116*, 3220–3230.
- [10] J. Samanen, F. Ali, T. Romoff, R. Calvo, E. Sorenson, J. Vasko, B. Storer, D. Berry, D. Bennett, M. Strohsacker, D. Powers, J. Stadel, A. Nichols, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3114–3125.
- [11] a) S. A. Mousa, J. M. Bozarth, M. S. Forsythe, W. Lorelli, S. A. Jackson, N. Ramachandran, W. F. DeGrado, *Cardiology* **1993**, *83*, 374–382; b) S. A. Mousa, S. Flint, W. Lorelli, S. Hassell, J. M. Bozarth, W. F. DeGrado, T. M. Reilly, *Thromb. Res.* **1994**, *76*, 109–119; c) S. A. Mousa, J. M. Bozarth, M. S. Forsythe, S. A. Jackson, A. Leamy, M. M. Diemer, R. P. Kapil, R. M. Knabb, M. C. Mayo, S. K. Pierce, *Circulation* **1994**, *89*, 3–12; d) W. E. Rote, J. H. Davis, S. A. Mousa, T. M. Reilly, B. R. Lucchesi, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1994**, *23*, 681–689.
- [12] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 341–343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 326–328.
- [13] a) M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233–20238; b) E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050–1058.
- [14] a) R. Hirschmann, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1305–1330; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1278–1301; b) A. E. P. Adang, P. H. H. Hermkens, J. T. M. Linders, H. C. J. Ottenheijm, C. J. van Staveren, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, *113*, 63–78.
- [15] T. P. Iismaa, T. J. Biden, J. Shine, *G protein-coupled Receptors*, Springer, **1995**.
- [16] a) G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, 3–12, b) G. Hölzemann, *ibid.* **1991**, 55–63; c) A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267.