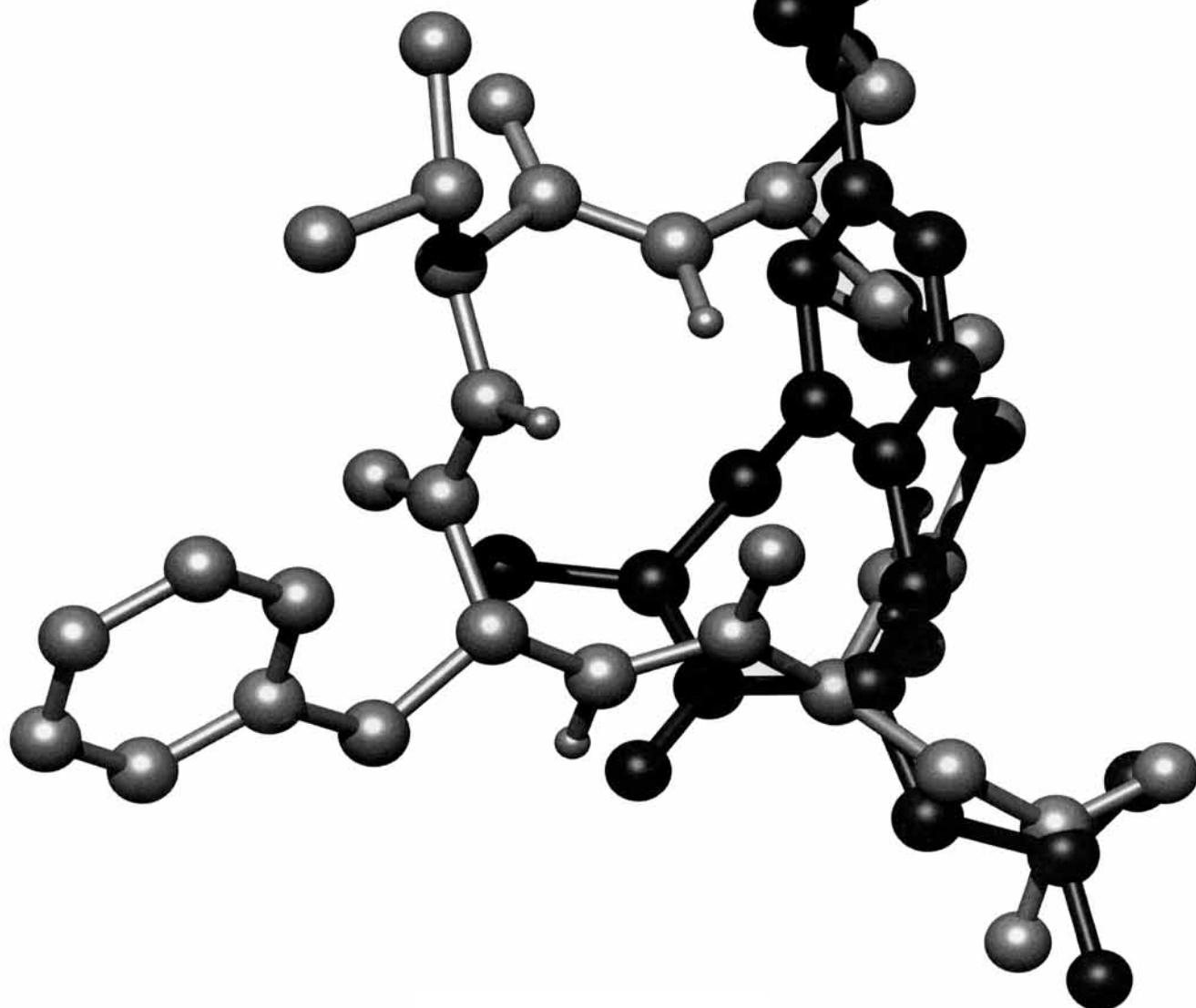
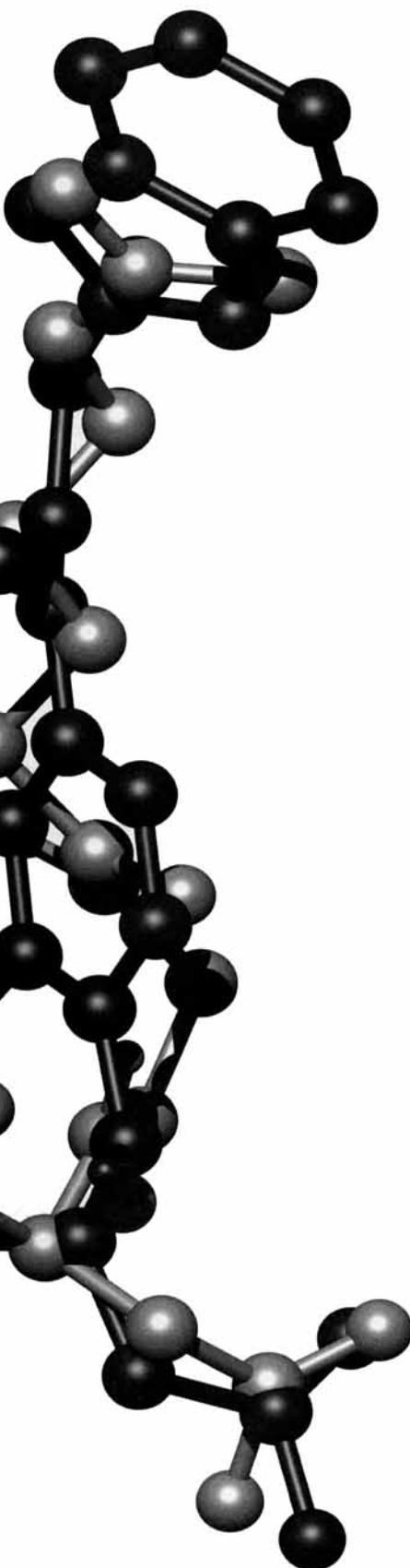


Unter den Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsrezeptoren spielt das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin eine besondere Rolle. Dessen Blockierung ist für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen wie Krebs, Osteoporose, akutes Nierenversagen und Retinopathie von Bedeutung. Neuartig ist vor allem die Inhibierung der Angiogenese, wodurch man Krebsmetastasen geradezu „verhungern“ lassen kann. Das Bild zeigt die Überlagerung der Strukturen eines hochaffinen und hochspezifischen peptidischen Inhibitors (helle Kugeln) für  $\alpha_v\beta_3$  sowie einer auf der Basis der Peptidkonformation entwickelten nichtpeptidischen Wirksubstanz (dunkle Kugeln).



# Stereoisomere Peptid-Bibliotheken und Peptidmimetika zum Design von selektiven Inhibitoren des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins für eine neuartige Krebstherapie

Roland Haubner, Dirk Finsinger und Horst Kessler\*

Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen spielen eine entscheidende Rolle im biologischen Geschehen. Sie regeln unter anderem im Rahmen der Signaltransduktionskaskade das Gleichgewicht zwischen Leben und Tod (Apoptose) der Zelle. Eine wichtige Klasse von Oberflächenrezeptoren sind die Integrine, von denen eine ganze Reihe von Subtypen existieren, die an verschiedenen biologischen Prozessen wie der Embryogenese,

der Blutgerinnung, der Osteoporose und dem Krebsgeschehen beteiligt sind. Eine selektive Inhibierung von einzelnen Integrin-Subtypen ist daher von eminentem pharmazeutischem Interesse. Mit einem neuartigen Verfahren zum „räumlichen Screening“ ist es möglich, hochselektive und aktive Inhibitoren für Integrine und speziell für den  $\alpha_v\beta_3$ -Subtyp zu erhalten. Diese  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten sind im nanomolaren Bereich aktiv und un-

terdrücken die tumorinduzierte Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen). Gesundes Gewebe mit ausgebildeten Blutgefäßen wird offenbar nicht tangiert. Dies eröffnet einen neuen, hoffnungsvollen Weg für die Tumorthерапie.

**Stichworte:** Cyclopeptide · Integrine · Rezeptoren · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

## 1. Einleitung

Physiologische Prozesse sind von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen entscheidend geprägt. So sind Embryogenese, Zelldifferenzierung, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort nur einige Beispiele für Vorgänge, bei denen adhäsive Wechselwirkungen von Zellen eine bedeutende Rolle spielen. Schon im frühesten embryonalen Stadium bestimmt die Adhäsion der Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix in Verbindung mit Zellwachstum und Zellteilung die morphologische Entwicklung. Bei Verletzungen unterstützen Wechselwirkungen mit den Proteinen der extrazellulären Matrix die Wundheilung, denn sie ermöglichen die Anheftung der Blutplättchen an die Wundränder und somit eine Unterbindung der Blutung durch Aggregation der Blutplättchen unter Bildung eines Blutpfropfens.<sup>[1–5]</sup>

Um die Effektivität des Immunsystems gewährleisten zu können, müssen sich die Leukozyten auf der Suche nach infektiösen Organismen im Körper einerseits frei bewegen können, andererseits aber auch an verschiedenste Zellen und Proteine der extrazellulären Matrix binden können. Dies ist nötig, um die Endothel- und Basalmembranbarrieren zu überwinden, an die Stellen

der Infektion zu gelangen und dort an fremdes Antigen präsentierende Zellen zu binden. In diesem Zusammenspiel zwischen Adhäsion und freier Beweglichkeit übernehmen ganz unterschiedliche Adhäsionsrezeptoren wichtige Aufgaben.<sup>[6, 7]</sup>

Eine Vorstellung von der Komplexität der Zelladhäsionsvorgänge gewinnt man auch, wenn man bedenkt, daß während der Evolution zwei Milliarden Jahre lang lediglich Einzeller existierten und sich erst in den letzten 600 Millionen Jahren mehrzellige Organismen entwickelt haben. Ein komplexes Netz aus Informationsübertragung, Spezialisierung und funktionalem Zusammenwirken war nötig, um die neuen Lebensformen in Genotyp und Phänotyp zu organisieren.<sup>[8]</sup> So wurde erkannt, daß die Zelladhäsion auch in Signaltransduktionskaskaden und damit in die Informationsübertragung zwischen den Zellen eingebunden ist.<sup>[9]</sup> Aber auch die Bindung an die extrazelluläre Matrix kann zu einer Signalübertragung ins Innere der bindenden Zelle und damit zu Umorientierungen des Cytoskeletts sowie zu funktionalen Änderungen des zellulären Verhaltens führen<sup>[10, 11]</sup> und z. B. die Apoptose<sup>[12–14]</sup> (programmierter Zelltod) unterbinden oder eine Wachstumsstimulation einleiten.

Die Aufklärung der molekularen Vorgänge dieses Zusammenspielwirkens ist eine spannende Aufgabe für die moderne Zellbiologie, die Medizin und die Chemie. Störungen der hochkomplexen Regelkreise zwischen Zelladhäsion und Zellwandern spiegeln sich in pathogenen Veränderungen wider. So kann eine unkontrollierte Koagulation der Thrombozyten zu Schlaganfall, Embolie oder Herzinfarkt führen.<sup>[4, 15–18]</sup> Adhäsionsphänomene haben auch für die Tumormetastasierung eine entscheidende Bedeutung, denn auf dem Weg vom Primärtumor zu den Orten der Sekundärtumore gehen Tumorzellen eine

[\*] Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. D. Finsinger  
Institut für Organische Chemie und Biochemie  
der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching  
Telefax: Int. + 89/289-13210  
E-mail: kessler@artus.org.chemie.tu-muenchen.de  
Dr. R. Haubner  
Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München

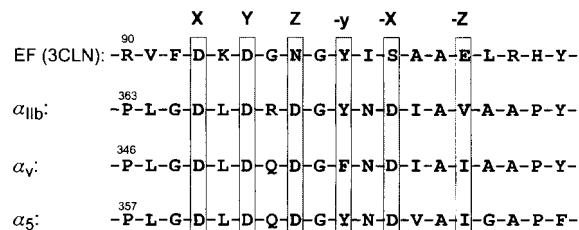
Reihe von adhäsiven Wechselwirkungen ein.<sup>[19, 20]</sup> Im Zusammenhang mit der Osteoporose<sup>[21–24]</sup> und bei Krankheitsbildern, bei denen eine unkontrollierte Bildung von Blutgefäßen<sup>[25–27]</sup> beobachtet wird, wie bei Arthritis, bei einigen Erkrankungen des Auges<sup>[28]</sup> sowie beim Tumorwachstum,<sup>[29, 30]</sup> wird ein Therapieansatz diskutiert, der auf der Inhibition adhäsiver Wechselwirkungen beruht.

Es gibt vier große Klassen von Zelloberflächenrezeptoren, die an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt sind: Cadherine, Selektine, die Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie und die Integrine. Im folgenden Kapitel wollen wir auf die Integrine und dort speziell auf das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und seine Rolle bei verschiedenen Erkrankungen eingehen. Anschließend werden wir die Entwicklung von selektiven Antagonisten unter Verwendung von Stereoisomeren-Bibliotheken („spatial screening“) sowie die konformativ kontrollierte Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) besprechen und am Ende auf die Entwicklung nichtpeptidischer Inhibitoren eingehen.

## 2. Die Integrine

Die Integrine sind heterodimere transmembrane Glycoproteine, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Die größere  $\alpha$ -Untereinheit enthält ca. 1100 Aminosäuren und ist

häufig aus zwei unterschiedlich langen Aminosäureketten aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Der extrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Einheit ist durch drei bis vier Bereiche von jeweils 12 bis 15 Aminosäuren am N-Terminus gekennzeichnet, die zweiwertige Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) binden. In ihrer Sequenz ähnelt die  $\alpha$ -Einheit den EF-Hand-Strukturen der Calcium-Bindungsmotive anderer Proteine wie Calmodulin.<sup>[31]</sup> Ein Sequenzvergleich<sup>[32]</sup> der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand mit den entsprechenden  $\alpha$ -Integrin-Sequenzen zeigt eine Konservierung von fünf der sechs oktaedrischen Bindungsstellen in Calmodulin. Lediglich anstelle der Glutaminsäure 104 (–Z in Schema 1<sup>[34]</sup>) befindet sich eine lipophile Aminosäure. Man nimmt an, daß die Asparaginsäure der RGD-haltigen Liganden (siehe unten) bei der Bindung diese fehlende Stelle besetzt.<sup>[33]</sup>



Schema 1. Sequenzvergleich der EF-Hand aus Calmodulin (3CLN) und drei einzelnen calciumbindenden Wiederholungseinheiten aus  $\alpha$ -Untereinheiten von Integrinen<sup>[34]</sup>.

Horst Kessler (rechts), geboren 1940 in Suhl, Thüringen, studierte Chemie in Leipzig und Tübingen und promovierte 1966 bei Eugen Müller über ein präparativ-organisches Thema. Er habilitierte sich 1969 über den Nachweis innermolekularer Beweglichkeit durch NMR-Spektroskopie und wurde 1971 C4-Professor für Organische Chemie an der Frankfurter Universität. 1989 nahm er einen Ruf an die Technische Universität München an. Er ist Mitglied der Bayerischen Akademie der Wissenschaften. 1986 erhielt er den Otto-Bayer-Preis, 1988 die Max-Bergmann-Medaille für Peptidchemie und 1997 die Emil-Fischer-Medaille der GDCh. Gastprofessuren führten ihn nach Halifax, Tokio, Madison, Haifa und Austin. Seine Arbeitsgebiete umfassen das rationale Moleküldesign auf der Basis der Konformation, die Synthese von Peptiden, Zuckern und Peptidmimetika, sowie die Entwicklung und Anwendung von NMR-Techniken und Rechenverfahren zur Bestimmung von Molekülstrukturen, vor allem von Peptiden und Proteinen.

Roland Haubner (links), geboren 1962 in München, studierte von 1985 bis 1991 als Stipendiat der Bayerischen Begabtenförderung Chemie an der Technischen Universität München. Er wurde 1995 bei Horst Kessler über Design, Synthese und Konformationsanalyse hochaffiner und selektiver  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten promoviert. Seit 1995 ist er an der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München mit der Entwicklung neuer PET-Tracer zur Tumordiagnostik und Therapiekontrolle beschäftigt.

Dirk Finsinger (Mitte), geboren 1968 in München, studierte Chemie an der Technischen Universität München. In seiner Diplomarbeit in der Gruppe von Horst Kessler beschäftigte er sich mit der Synthese und strukturellen Charakterisierung von Thiopeptiden. Seit 1994 untersucht er im Rahmen seiner Dissertation peptidische  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinantagonisten und Peptidmimetika.



R. Haubner

D. Finsinger

H. Kessler

Röntgenstrukturuntersuchungen<sup>[35, 36]</sup> der A-Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit weisen ebenfalls auf eine Metallionenbindungsstelle hin, die für die Ligandbindung wichtig zu sein scheint. Dies wird durch Untersuchungen<sup>[37-40]</sup> bestätigt, die ergaben, daß die Funktion der Integrine von zweiwertigen Metallionen abhängt und daß die Affinität zu ihren Liganden teilweise durch Zugabe von  $Mn^{2+}$ -Ionen gesteigert werden kann.

Die  $\beta$ -Untereinheit besteht, mit Ausnahme der  $\beta_4$ -Einheit<sup>[41]</sup> (ca. 1750 Aminosäuren), aus nicht ganz 800 Aminosäuren und enthält vier hochkonservierte, cysteinreiche Domänen von je ca. 40 Aminosäuren nahe der transmembranen Region sowie eine große Schleife am N-Terminus des extrazellulären Teils. Beide Untereinheiten haben eine kurze membranständige Region (20–30 Aminosäuren) und eine cytoplasmatische Domäne (20–50 Aminosäuren). An der Bindung extrazellulärer Liganden sind beide Untereinheiten beteiligt. Die Kontaktstellen befinden sich in Domänen nahe den N-Termini.<sup>[1, 42–45]</sup>

Der C-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit<sup>[2, 42]</sup> verbindet über intrazelluläre Proteine wie Talin,<sup>[46]</sup> Vinculin<sup>[47, 48]</sup> und  $\alpha$ -Actinin<sup>[49]</sup> den Rezeptor mit dem Aktinfilament des Cytoskeletts.<sup>[11]</sup> Damit ermöglichen die Integrine den Zellen sowohl eine feste Bindung zur extrazellulären Matrix und zu anderen Zellen als auch die Informationsübertragung in das Zellinnere (Abb. 1).

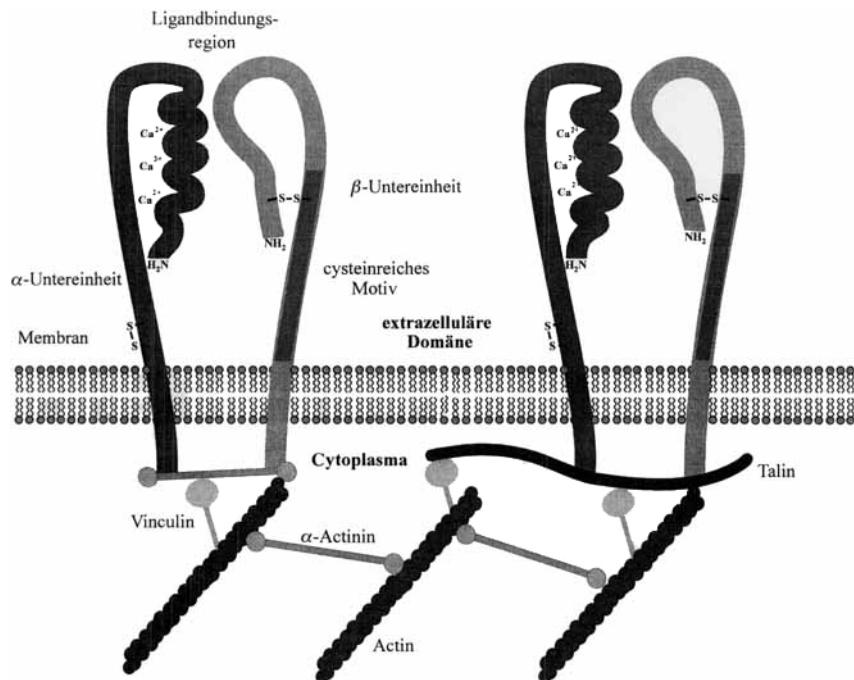
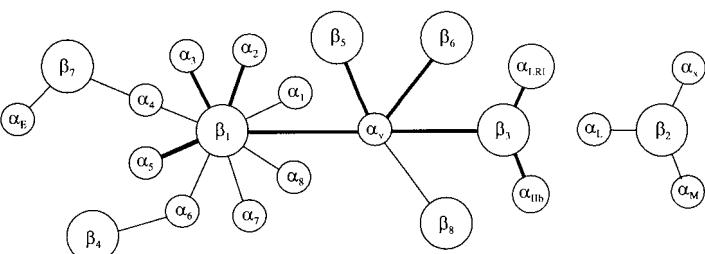


Abb. 1. Schematische Darstellung der Integrine und der Wechselwirkung mit Proteinen des Cytoskeletts.

Es gibt eine große Zahl unterschiedlicher Integrine. Bekannt sind 8  $\beta$ - und 15  $\alpha$ -Untereinheiten (Schema 2). Darüber hinaus sind einige der  $\alpha$ -Untereinheiten (vor allem  $\alpha_v$ ) mit verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert, die in drei Hauptfamilien, die  $\beta_1$ -, die  $\beta_2$ - und die  $\beta_3$ -Subfamilie, eingeteilt werden.<sup>[2, 3, 6, 42]</sup>

Die weit verbreiteten  $\beta_1$ -Integreine spielen eine zentrale Rolle bei der Gewebeorganisation, denn sie sind an der Bindung von Zellen an Moleküle der extrazellulären Matrix in Muskeln, im Nervensystem sowie in Endothel- und Epithelschichten beteiligt.



Schema 2. Die Mitglieder der einzelnen Integrin-Subfamilien. Jedes Integrin besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (Abb. 1). Die verschiedenen Subtypen haben unterschiedliche Proteineinsequenzen. Die hervorgehobenen Linien kennzeichnen die Integrine, die über die RGD-Sequenz an den Liganden binden.

ligt. Sie kommen vor allem auf Leukozyten vor und sind auch als Very-Late-Activation(VLA)-Antigene bekannt, denn einige  $\beta_1$ -Integreine ( $\alpha_1\beta_1$  und  $\alpha_2\beta_1$ , auch als VLA-1 und VLA-2 bezeichnet) werden erst nach Antigenaktivierung der T-Zellen exprimiert. Im Zusammenhang mit dem Entzündungsgeschehen sind sie von großer Bedeutung bei der Kontrolle der Lokalisation von Leukozyten nach dem Durchdringen der Endothelschicht.<sup>[2, 6, 50]</sup>

Die  $\beta_2$ -Integrine werden auch als Leukocyte Cell Adhesion Molecules (LeuCAM) bezeichnet und kommen hauptsächlich auf Leukozyten und auf Mikroglia-Zellen des neuronalen Gewebes vor. Dieser Familie gehören drei Rezeptoren an (Schema 2), denen eine bedeutende Rolle im Immunsystem zukommt.<sup>[2, 51, 52]</sup>

Die Familie der  $\beta_3$ -Integrine besteht aus drei Rezeptoren, dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin („Blutplättchenrezeptor“), dem Vitronectin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$  und dem  $\alpha_x\beta_3$ -Integrin,<sup>[50]</sup> wobei letzteres noch nicht vollständig charakterisiert ist. Das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin,<sup>[53]</sup> auch als GPIIb/IIIa bezeichnet, ist wahrscheinlich der bestuntersuchte Rezeptor der  $\beta_3$ -Subfamilie. Es wird vor allem auf von Megakaryozyten abstammenden Zellen wie den Blutplättchen exprimiert, konnte aber auch auf Melanomazellen<sup>[54, 55]</sup> nachgewiesen werden. Das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin bindet mit unterschiedlicher Stärke an eine große Zahl extrazellulärer Matrixproteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, dem von-Willebrand-Faktor und Thrombospondin.<sup>[1, 2, 6, 56]</sup>

Dieser Rezeptor spielt eine wesentliche Rolle bei der primären und sekundären Hämostase. Er ermöglicht zum einen die Anlagerung von Blutplättchen an die Stellen vasku-

kulärer Defekte; dazu heften sich aktivierte Blutplättchen an kollagene Bindegewebsfasern der Wundränder an. Zum anderen kommt es durch Aggregation der Blutplättchen über das Fibrinogen zur Pfropfbildung und damit zum Verschluß des verletzten Gewebes. Störungen der Hämostase können zu Embolien, Schlaganfall oder Herzinfarkt führen.<sup>[57-59]</sup>

Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin wird auf einer wesentlich größeren Zahl von Zelltypen exprimiert als das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin.<sup>[60]</sup> Seine Funktionen werden im folgenden diskutiert.

### 3. Die Rolle des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins im Krankheitsgeschehen

Das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin befindet sich auf fast allen Zellen mesenchymalen Ursprungs.<sup>[2]</sup> Die vollständige Aminosäuresequenz seiner  $\alpha_v$ -Untereinheit konnte durch cDNA-Untersuchungen ermittelt werden<sup>[61]</sup> und weist die in Abschnitt 2 beschriebenen integrinotypischen Domänen auf. Es bindet eine große Zahl verschiedener Liganden, zu denen neben den oben erwähnten an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bindenden Matrixproteinen unter anderem Tenascin, denaturiertes Kollagen Typ I und Osteopontin gehören.<sup>[50]</sup> Der Vitronectin-Rezeptor ist an vielen Zelladhäsionsphänomenen beteiligt und spielt unter anderem bei der Angiogenese,<sup>[25, 62]</sup> bei der Tumormetastasierung,<sup>[29]</sup> bei der Phagozytose von Zellen, die in die Apoptose übergehen,<sup>[63]</sup> bei der Knochenresorption<sup>[21, 23]</sup> und beim akuten Nierenversagen<sup>[101]</sup> eine Rolle. Darüber hinaus besteht eine Verbindung zwischen dem Vitronectin- und dem Urokinase-Rezeptor (uPAR = urokinase-type plasminogen activator receptor), d. h. dem Plasminogen-Aktivatorsystem der Proteolyse. So konnte eine Kopplung zwischen der  $\alpha_v\beta_3$ - und der uPAR-Expression in metastasierenden Melanomzellen festgestellt werden.<sup>[64]</sup> Außerdem wird eine mögliche Regulierung der Integrinfunktion durch den Urokinase-Rezeptor diskutiert.<sup>[65]</sup>

Bei der Bildung von Tumormetastasen treten unterschiedliche Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen auf (Abb. 2). Beim Verlassen des Primärtumorverbands, bei der Wanderung

miert werden.<sup>[71–75]</sup> Hingegen werden Integrine, die hauptsächlich an der Migration durch das Gewebe beteiligt zu sein scheinen, verstärkt gebildet. Vor allem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine bewirkt, wird auf vielen Tumorzellarten,<sup>[76]</sup> wie Osteosarkomen, Neuroblastomen, Lungen-, Brust-, Prostata- und Blasenkarzinomen sowie Glioblastomen<sup>[77]</sup> und invasiven Melanomen,<sup>[78–80]</sup> exprimiert.

Die Bildung von neuen kapillaren Blutgefäßen, die aus Endothelzellen aufgebaut sind, spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Organen, bei der Wundheilung und bei Entzündungen. Die dabei ablaufenden Adhäsionsprozesse sind stark reguliert, d. h. sie begrenzen sich auf die beteiligten Zellen und sind nur für kurze Zeiträume (einige Tage) aktiviert, um dann wieder völlig unterbunden zu werden. Die Aktivierung der Endothelzellen und die Regulierung beim Aufbau neuer Kapillaren wird von Cytokinen und Wachstumsfaktoren wie bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) und Angiogenin übernommen.<sup>[81]</sup> Die stimulierten Endothelzellen exprimieren Proteasen, welche die Basalmembran abbauen, so daß die Endothelzellen in Richtung des Stimulus in das Gewebe oder Tumorstroma eindringen können.<sup>[29]</sup> Das chemotaktische wie haptotaktische Verhalten wird dabei von Zelladhäsionsrezeptoren kontrolliert.<sup>[82, 83]</sup> Das Ausbleiben von speziellen Zell-Matrix-Wechselwirkungen veranlaßt dagegen die an der Angiogenese beteiligten Endothelzellen offenbar,<sup>[84]</sup> in die Apoptose überzugehen, was die Neovaskularisation unterbindet.

Auch bei vielen Krankheiten werden neue Blutgefäße gebildet, die Angiogenese läuft dann allerdings ungeregelt ab. So werden bei der rheumatischen Arthritis die Knorpel der Gelenke durch eindringende neue Blutgefäße zerstört. Bei Diabetes können Blutgefäße in der Retina wuchern, in den Glaskörper eintreten (Retinopathie) und dort zu Blutungen und somit zur Erblindung führen.<sup>[26, 84]</sup> Die Beteiligung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins an der Neovaskularisation in der Retina konnte im Modell der hypoxischen Maus nachgewiesen werden.<sup>[85]</sup> Außerdem läßt sich die Expression von  $\alpha_v\beta_3$ - und/oder  $\alpha_v\beta_5$ -Integrinen durch Wachstumsfaktoren induzieren.<sup>[86]</sup> In beiden Fällen führen die von uns entwickelten  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten (siehe unten und Lit.<sup>[87, 88]</sup>) zu einer deutlichen Verringerung der Kapillargefäßproliferation im retinalen Gewebe.

Brooks et al.<sup>[82, 84]</sup> haben gezeigt, daß das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf Zellen der Blutgefäße des Granulationsgewebes vorhanden ist, nicht aber auf Zellen der Blutgefäße des normalen Gewebes. Die Expression von  $\alpha_v\beta_3$  wird dabei durch Angiogenesefaktoren wie bFGF und TNF- $\alpha$  stimuliert.<sup>[89]</sup> Spezifische  $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper wie LM 609, aber auch unser Cyclopeptid *cyclo*-(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)<sup>[87]</sup> blockieren die bFGF-induzierte Angiogenese, haben aber keinen Effekt auf schon existierende Blutgefäße. Krebszellen sind ebenfalls auf die Angiogenese angewiesen. Sie gewährleistet eine ausreichende Versorgung des Tumors mit Nährstoffen, die für sein aggressives Wachstum erforderlich sind.<sup>[26, 29, 90]</sup> Darüber hinaus werden die neu gebildeten Blutbahnen von den Krebszellen häufig genutzt, um in den Blutkreislauf zu gelangen.

Auch die tumorinduzierte Angiogenese kann durch die genannten  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten inhibiert werden (Abb. 3). Für diese Experimente wurde eine Melanom-Zelllinie (human M21-L) ausgewählt, die selbst keine  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine aufweist, so daß man

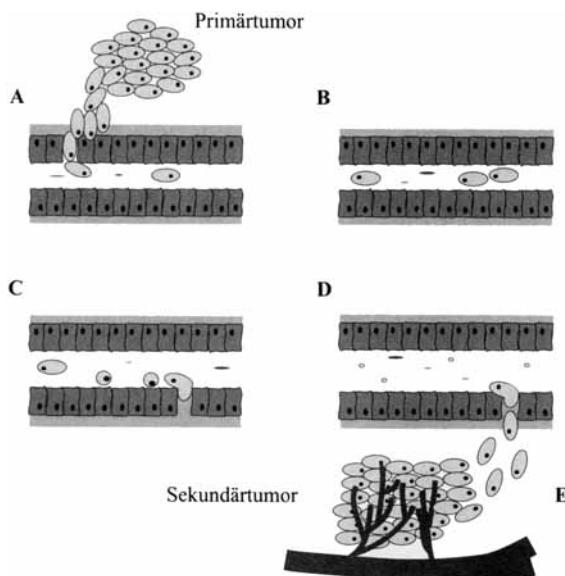


Abb. 2. Phasen der Tumormetastasierung. A) Ablösen der Krebszellen vom Primärtumor und Invasion; B) Wanderung im Blut- oder Lymphsystem; C) Adhäsion im Kapillarsystem; D) Extravasation; E) Festsetzen im Gewebe und tumorinduzierte Angiogenese.

der Tumorzellen im lymphatischen System und in den Blutgefäßen, beim Festsetzen im Kapillarsystem des Zielorgans sowie bei der Extravasation spielen diese Wechselwirkungen eine wichtige Rolle.<sup>[3, 66–70]</sup> Viele Studien über die Expression von Integrinen auf Tumorzellen zeigen, daß Integrine, die vor allem bei der Bildung fester Kontakte und bei der Gewebeorganisation zum Einsatz kommen, häufig in geringerem Maße exprimiert werden.<sup>[71–75]</sup> Hingegen werden Integrine, die hauptsächlich an der Migration durch das Gewebe beteiligt zu sein scheinen, verstärkt gebildet. Vor allem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das die Bindung an extrazelluläre Matrixproteine bewirkt, wird auf vielen Tumorzellarten,<sup>[76]</sup> wie Osteosarkomen, Neuroblastomen, Lungen-, Brust-, Prostata- und Blasenkarzinomen sowie Glioblastomen<sup>[77]</sup> und invasiven Melanomen,<sup>[78–80]</sup> exprimiert.

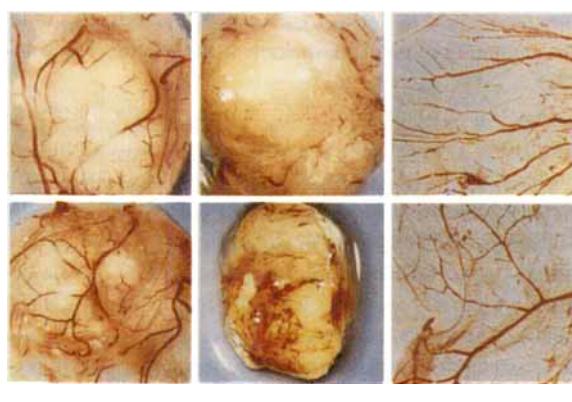


Abb. 3. Inhibition of tumor-induced angiogenesis by *cyclo*(-RGDFV-). (Mitte). Im linken Bild erkennt man, daß das inaktive *cyclo*(-R $\beta$ ADFV-) mit sehr ähnlicher Sequenz die Angiogenesis von Tumormplikaten auf Hühnerembryonen nicht verhindert. Die benachbarte gesunde CAM (chick chorioallantoic membrane), in der Blutgefäße ausgebildet sind, wird durch die Peptide nicht geschädigt (rechts).

davon ausgehen kann, daß die Blockierung der Angiogenese direkt durch Antagonisierung von Zellen der Blutgefäße erreicht wird.<sup>[89]</sup> Untersuchungen an menschlichem  $\alpha_v\beta_3$ -negativen Brustkrebsgewebe in einem chimären Mensch/Maus-Modell ergaben eine Verringerung der gebildeten menschlichen Blutgefäße zum Tumor und eine deutliche Einschränkung der Tumorzellproliferation durch  $\alpha_v\beta_3$ -Antikörper.<sup>[91]</sup> Die Blockierung der tumorinduzierten Angiogenese durch Inhibierung des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins ist somit auch beim Kampf gegen die Metastasenbildung ein vielversprechender Ansatz.<sup>[92]</sup>

Auch im Knochenstoffwechsel spielen integrinvermittelte Zelladhäsionsvorgänge eine Rolle. So wird die Osteoclastenoberfläche an extrazelluläre Knochenmatrixproteine wie Osteopontin oder Knochen-Sialoprotein über das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin angebunden.<sup>[93]</sup> Die Matrixkomponenten liegen dabei als zellgebundene oder freie Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  vor.<sup>[21]</sup> Es wurde gezeigt, daß  $\alpha_v\beta_3$  sowohl auf der Zelloberfläche von menschlichen Osteoclasten als auch auf der von Ratte oder Huhn in ausreichender Zahl exprimiert wird.<sup>[94]</sup> Darüber hinaus wurde in In-vitro-Versuchen festgestellt, daß synthetische Peptide, welche die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp enthalten, die Knochenresorption durch isolierte Osteoclasten inhibieren.<sup>[21, 95]</sup> Auch mit dem Disintegrin Echistatin ( $\beta_3$ -selektiv) konnte in ersten In-vivo-Studien an Ratten eine Knochenresorption inhibiert werden.<sup>[96]</sup> Wegen dieser Wechselwirkungen ist der Einsatz von  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten wohl auch ein sinnvoller therapeutischer Ansatz, um einen vermehrten Knochenabbau zu unterbinden.<sup>[24, 97]</sup>

Beim akuten Nierenversagen spielen ebenfalls pathophysiologische Adhäsionsphänomene eine Rolle. So wurde nachgewiesen, daß abgelöste nekrotische Endothelzellen eine Ischämie im tubulären Lumen verursachen.<sup>[98, 99]</sup> In neueren Untersuchungen wurden im Urin von Patienten auch lebensfähige Epithelzellen nachgewiesen. Dies legt nahe, daß die Exfoliation von Epithelzellen bei der Bildung von Gefäßverengungen eine Rolle spielt.<sup>[100]</sup> Analoge Untersuchungen an Versuchstieren ergaben, daß Integrine an der Ablösung der Zellen vom Epithelgewebe beteiligt sind.<sup>[101, 102]</sup> Durch direkte Gabe von peptidischen

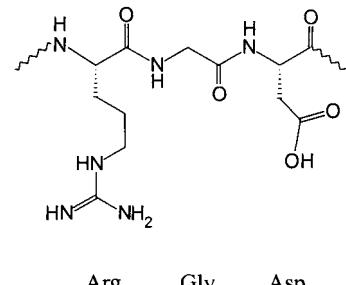
$\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten wie *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) in die Nierenarterie konnte die Regenerationsphase nach Eintreten des Nierenversagens wesentlich verkürzt werden.<sup>[103, 104]</sup> Auch im Fall der Restenose, einem Verstopfen von kapillären Blutgefäßen durch abgelöste Endothelzellen, die z. B. nach Herzinfarkten oder operativen Eingriffen im Bereich der Herzkranzgefäße beobachtet wird, kann eine Koagulation von Endothelzellen durch  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten verhindert werden.

#### 4. Die RGD-Sequenz

An den Zell-Matrix-Wechselwirkungen der Integrine sind mehrere extrazelluläre Matrixproteine beteiligt. So besteht die Basalmembran, eine Grenzschicht zwischen Epithel und dem darunterliegenden Bindegewebe, zum Teil aus solchen Proteinen.<sup>[105]</sup> Man findet dort unter anderem das für die Struktur maßgebliche Kollagen sowie die Glycoproteine Laminin<sup>[106, 107]</sup> und Fibronectin.<sup>[108–112]</sup> Extrazelluläre Matrixproteine, die im Plasma vorkommen und an der Hämostase beteiligt sind, sind Fibrinogen,<sup>[113, 114]</sup> Thrombospondin<sup>[115, 116]</sup> und der von-Willebrand-Faktor.<sup>[117, 118]</sup> Vitronectin<sup>[119–121]</sup> ist ein Glycoprotein, das sowohl im Bindegewebe als auch im Plasma auftritt. Außerdem fungieren auch Osteopontin und Knochen-Sialoprotein, die im Zusammenhang mit der Osteoporose eine Rolle spielen,<sup>[123, 122]</sup> sowie Tenascin<sup>[123, 124]</sup> als Liganden speziell für  $\alpha_v\beta_3$ . Diese extrazellulären Matrixproteine weisen mehrere Motive auf, die als potentielle Zellbindungsregionen in Frage kommen.<sup>[150]</sup> Ein zentrales Zellerkennungsmotiv, das in einem Großteil der Matrixproteine vorkommt, besteht aus der schon erwähnten Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD; Schema 3) und wird als universelle Zellerkennungssequenz bezeichnet<sup>[1, 6, 44, 119, 125]</sup> (Tabelle 1).

Weiterhin bindet Fibrinogen auch über die GGAKQAGDV-Sequenz der  $\gamma$ -Kette an das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin.<sup>[126]</sup> Die RGD-Sequenz dient als Grundlage für die Entwicklung verschiedenster Antagonisten, vor allem zur Inhibition der Blutplättchenaggregation, in letzter Zeit aber auch, um Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zu entwickeln.

Die Ursache der teilweise trotz gemeinsamer Erkennungssequenz hohen Selektivität einzelner Integrine für bestimmte Adhäsionsproteine ist noch ungeklärt. Es werden zusätzliche Bindungsregionen, aber auch unterschiedliche Konformationen der RGD-Sequenz diskutiert.<sup>[1]</sup> Wir werden im weiteren zeigen, daß man mit konformativ eingeschränkten RGD-Peptiden eine hohe Rezeptorselektivität und gleichzeitig eine stark erhöhte Aktivität erreichen kann. Die Konformationsuntersuchungen an natürlichen Matrixproteinen konzentrieren sich bisher auf das Fibronectin<sup>[127]</sup> und hier vor allem auf die Typ-III-Module. Das zehnte Typ-III-Modul, das eine RGD-Sequenz enthält, wurde sowohl NMR-spektroskopisch<sup>[128, 129]</sup> als auch durch



Schema 3. Die RGD-Sequenz.

Tabelle 1. Die bisher bekannten Bindungsstellen der Integrine[50].

Integrin	Ligand	Bindungssequenz
$\alpha_2\beta_1$	Kollagen Laminin	DGEA/RGD ?
$\alpha_3\beta_1$	Laminin Kollagen I; Epiligrin Fibronectin	KQNCLSSRASFRGCVRNLRLSR ? RGD
$\alpha_4\beta_1$	Fibronectin VCAM-1	IDAPS/LDV/REDV/X-D-Y ?
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectin	RGD
$\alpha_6\beta_1$	Fibronectin, Vitronectin	RGD
$\alpha_L\beta_1$	ICAM-1 ICAM-2, ICAM-3	KELLLPGNNRKV ?
$\alpha_M\beta_2$	Fibrinogen Komplement 3bi	GGAKQAGDV ?
$\alpha_R\beta_2$	Fibrinogen	GPRP
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinogen Fibronectin, Vitronectin, vWF, Thrombospondin	GGAKQAGDV/RGD RGD
$\alpha_R\beta_3$	Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Kollagen, Thrombospondin, Thrombin, Osteopontin, Knochen- Sialoprotein, Tenascin	RGD
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Entactin	RGD
$\alpha_R\beta_5$	Vitronectin	RGD
$\alpha_R\beta_6$	Fibronectin	RGD

Röntgenstrukturuntersuchungen<sup>[130]</sup> aufgeklärt. Von einer analogen Domäne im Tenascin,<sup>[124]</sup> der dritten Fibronectin-Typ-III-Domäne ist ebenfalls eine Kristallstruktur bekannt. Bei beiden Strukturen befindet sich das RGD-Motiv in einer weit vom Protein-Core wegreichenden  $\beta$ II'-Schleife zwischen zwei  $\beta$ -Faltblättern. Man nimmt an, daß diese Schleife in Lösung flexibel ist, so daß keine Aussagen über ihre Konformation am Rezeptor gemacht werden können. Auch neueste Röntgenstruktur-<sup>[131]</sup> und NMR-spektroskopische<sup>[132]</sup> Untersuchungen an einem größeren Segment des Fibronectins, den Domänen sieben bis zehn, lieferten keine weiteren Informationen über die Konformation der RGD-Sequenz.

Die RGD-Sequenz ist auch in Schlangengiften vorhanden. Bei den meisten dieser „Disintegrine“ handelt es sich um Toxine, die in die Blutgerinnungskaskade eingreifen und Blutungen hervorrufen, die Herz- und Kreislaufversagen zur Folge haben.<sup>[133]</sup> Die Untersuchung einiger Disintegrine ergab, daß sie wirksame Inhibitoren der Blutplättchenaggregation sind.<sup>[50]</sup> Die Strukturaufklärung gelang bis jetzt für Kistrin,<sup>[134, 135]</sup> Echistatin<sup>[136–141]</sup> und Flavordin.<sup>[142]</sup> Außerdem sind die Elemente der Sekundärstruktur des Albolabrin<sup>[143]</sup> bekannt. Bei allen diesen Strukturen befindet sich die RGD-Sequenz im Turn-Bereich einer flexiblen Schleife, der keine eindeutige Vorzugskonformation zuzuordnen ist. Dendroaspin,<sup>[144]</sup> auch als Mambin<sup>[145]</sup> bezeichnet, das im Schlangengift der Gattung *Elapidae* vorkommt, enthält ebenfalls die RGD-Sequenz. Dies ist ungewöhnlich, da die Gattung keine Hämotoxine, sondern Neurotoxine verwendet. So weist Dendroaspin auch das für Neurotoxine übliche Faltungsmuster auf, ohne jedoch neurotoxisch zu wirken. Die für die Neurotoxine untypische RGD-Sequenz befindet sich, analog zu den Hämotoxinen, an der Spitze einer

flexiblen Schleife, und in der Tat inhibiert das Dendroaspin die Blutplättchenaggregation in ähnlichem Maß wie die Hämotoxine.

Auch Blutegel verfügen über Polypeptide, die die Blutgerinnung beeinflussen. So inhibiert Hirudin die Funktion des Thrombins. Ornatin und Decorsin blockieren die Bindung von Fibrinogen an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  und unterbinden damit die Blutplättchenaggregation. Auch die Struktur des RGD-haltigen Decorsins zeigt eine Schleife, in der sich die RGD-Sequenz befindet. Im Unterschied zu den oben genannten Strukturen ist diese Schleife gut charakterisiert. Die RGD-Sequenz liegt in einer sehr gestreckten Konformation vor, bei der die pharmakophoren Gruppen in entgegengesetzte Richtungen orientiert sind. Da allerdings Decorsin sowohl  $\alpha_{IIb}\beta_3$  als auch  $\alpha_5\beta_1$  mit hoher Affinität inhibiert, muß angenommen werden, daß die RGD-Sequenz auch in dieser gut bestimmten Schleife noch Möglichkeiten hat, sich an den jeweiligen Rezeptor anzupassen.<sup>[146]</sup>

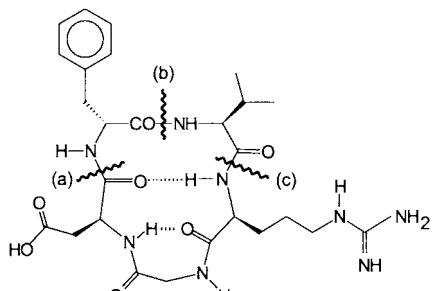
Diese Strukturuntersuchungen deuten darauf hin, daß die hohe Aktivität der Disintegrine vor allem auf der guten Anpassungsfähigkeit der zur Blockierung der Integrine benötigten RGD-Sequenz beruht. Somit geben die Strukturen dieser im RGD-Teilbereich flexiblen Verbindungen kaum Aufschluß über die rezeptorgebundene Konformation, die für das Design neuer selektiver Wirkstoffe wichtig ist.

## 5. Design selektiver $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Antagonisten

Die Entwicklung neuer Antagonisten peptidischer Liganden beginnt im allgemeinen mit der Suche nach der Erkennungssequenz. Im hier beschriebenen Fall führte ein Sequenzvergleich der integrinbindenden Proteine auf die RGD-Sequenz.<sup>[147–149]</sup> Seit kurzem werden auch biologische oder chemisch synthetisierte Peptidbibliotheken hierfür verwendet. Durch eine „Phagenbibliothek“ gelang es tatsächlich, die RGD-Sequenz wiederzufinden<sup>[150]</sup> und gleichzeitig die aus dem Sequenzvergleich als günstig erkannten flankierenden Aminosäuren zu identifizieren.<sup>[151]</sup> Neue Entwicklungen wenden sich verstärkt Nichtpeptid-Bibliotheken zu, die als Leitstrukturen für Pharmaka dienen können.<sup>[152]</sup>

Zu Beginn unserer Arbeiten war die RGD-Sequenz bereits bekannt,<sup>[153]</sup> und man wußte, daß schon geringfügige Modifikationen (z. B. der Ersatz von Asp durch Glu und von Gly durch D-Ala oder L-Ala) zum Verlust der Bindungseigenschaften führen.<sup>[154, 155]</sup> Unser Ziel war es daher, zunächst durch Fixieren der räumlichen Struktur<sup>[156]</sup> eine hohe Aktivität und Rezeptorselektivität zu erreichen. Da aber die Konformation im rezeptorgebundenen Zustand, die „bioaktive Konformation“, nicht bekannt war, synthetisierten wir eine Bibliothek stereoisomerer cyclischer Peptide, mit denen die optimale Struktur für die einzelnen Rezeptorsubtypen eingegrenzt werden kann („spatial screening“). Wir haben bereits früher gezeigt, daß die Cyclisierung dazu geeignet ist, hohe Aktivität und Selektivität zu erzielen, wenn die optimale Konformation im Cyclus angenähert ist (matched-Fall).<sup>[156]</sup> Dieser Ansatz hat sich auch im Fall der RGD-Peptide als erfolgreich erwiesen.<sup>[157]</sup> Der Aktivitätsvergleich des im weiteren noch detailliert diskutierten

cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) mit den linearen Sequenzen -D-Phe-Val-Arg-Gly-Asp-, -Val-Arg-Gly-Asp-D-Phe- und -Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- zeigt deutlich geringere Aktivitäten und Selektivitäten bei den linearen Peptiden (Schema 4).



$IC_{50}$   $\alpha_{IIb}\beta_3/\alpha_v\beta_3$

	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol}$ ]	$\alpha_{IIb}\beta_3/\alpha_v\beta_3$
cyclo(-RGDFV-)	0.002	415
(a) Ac-fVRGD-NH <sub>2</sub>	0.03	3.0
(b) Ac-VRGDF-NH <sub>2</sub>	0.04	38.0
(c) Ac-RGDFV-NH <sub>2</sub>	0.19	8.0

Schema 4. Vergleich der Aktivitäten ( $IC_{50}$  [ $\mu\text{mol}$ ]) und Selektivitäten (Verhältnis aus Aktivitäten am Blutplättchen- und Vitronectin-Rezeptor) des  $\alpha,\beta_3$ -selektiven Cyclopeptid *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)* und seiner offenkettigen Analoga. (Die Daten für die linearen Peptide wurden von G. Hölzemann, Merck KGaA, zur Verfügung gestellt.)

Die Verwendung cyclischer Peptide ist heute ein Standardverfahren für die Bestimmung der bioaktiven Konformation und die Entwicklung von Pharmaka. Wir möchten jedoch bemerken, daß die Cyclisierung das Molekül oft in einer räumlichen Struktur fixiert, in der es nicht die bioaktive Konformation einnehmen kann. Die Aktivität ist dann drastisch vermindert (mis-matched-Fall). Die Suche nach der besten Cyclisierung ist nach wie vor schwierig und auch oft nicht erfolgreich.

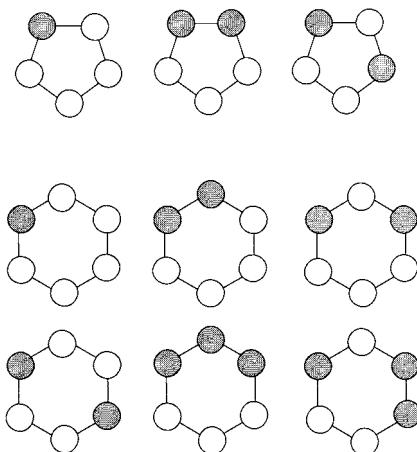
## 5.1. Stereoisomere Peptidbibliotheken

### 5.1.1. Auswahl der Grundstrukturen

In stereoisomeren Peptidbibliotheken soll die gewünschte „bioaktive Sequenz“ unter Erhaltung der Konstitution, d. h. aller biologisch relevanten Gruppen, in verschiedenen räumlichen Strukturen fixiert vorliegen. Dazu wird zunächst eine Verbindung mit möglichst rigider Basiskonformation gesucht. Dies kann z. B. ein Cyclopeptid sein. Um ihre Beweglichkeit einzuschränken, sollten die cyclischen Peptide möglichst klein sein; sie müssen allerdings groß genug sein, damit alle nötigen pharmakophoren Gruppen berücksichtigt werden können. Wir haben uns daher auf cyclische Penta- und Hexapeptide beschränkt, da bei größeren Cyclopeptiden bereits eine höhere Dynamik zu erwarten ist.<sup>[158]</sup>

Von homodeten Cyclopeptiden weiß man, daß ihre Konformation besonders stark von der Konfiguration der sie aufbauenden Aminosäuren bestimmt wird. Die Wechselwirkung von funktionellen Gruppen der Seitenketten mit dem Peptidrück-

grat,<sup>[159]</sup> wie sie von Ser oder Thr in der *i*-Position von  $\beta$ -Schleifen oder von Asn<sup>[160]</sup> beschrieben ist, sowie Verzweigungen am  $\beta$ -C-Atom sind dagegen zweitrangig. Wir haben daher zunächst alle möglichen Cyclopenta- und Cyclohexapeptide aus L-Ala und D-Ala hergestellt und ihre Konformation in Lösung NMR-spektroskopisch und durch Moleküldynamik(MD)-Rechnungen bestimmt (Schema 5).<sup>[161]</sup> Zusätzlich wurde als weitere

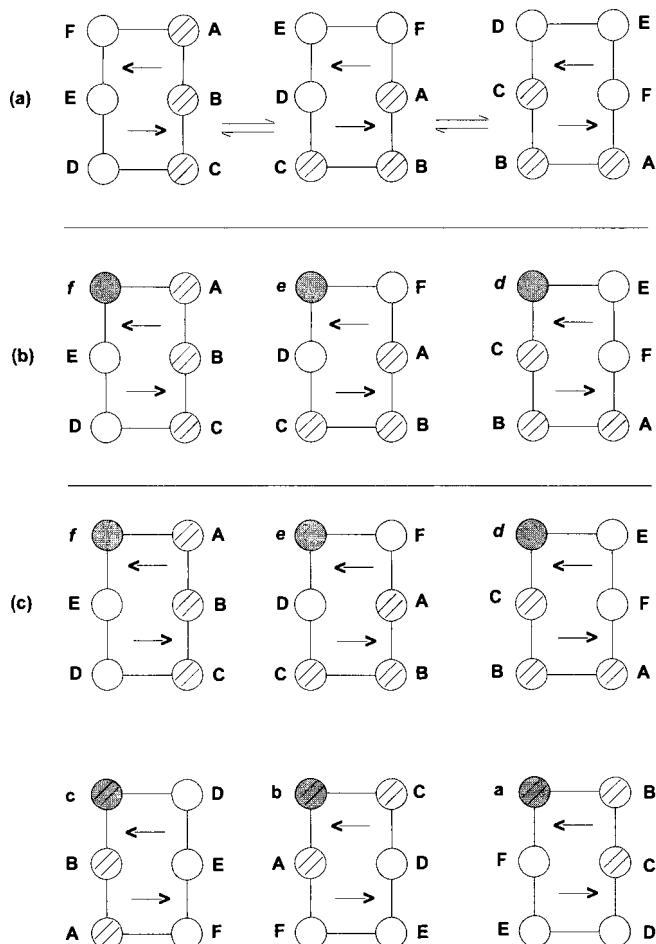


Schema 5. Cyclische Penta- und Hexapeptide aus D- (grauer Kreis) und L-Alanin. Die Cyclopeptide mit höherem Anteil an D-Ala als an L-Ala wie *cyclo(-L-Ala-D-Ala<sub>4</sub>-)* sind Enantiomere der gezeigten Verbindungen.

Variable Glycin, die einzige  $\alpha$ -Aminosäure ohne Seitenkette, sowie D- und L-Prolin eingebracht. Prolin bewirkt sterische Hindernisse bezüglich des  $\psi$ -Winkels und erzwingt eine Einschränkung des  $\phi$ -Winkels im Ring zwischen  $+60^\circ$  und  $-60^\circ$ .

Unter den Verbindungen befanden sich einige, die eine einzige Konformation stark bevorzugen; bei anderen gibt es deutliche Hinweise, daß mehrere Konformationen im schnellen Gleichgewicht miteinander stehen.<sup>[156]</sup> Ist eine Konformation extrem bevorzugt, was häufig nicht ganz korrekt mit einer „starren Konformation“ gleichgesetzt wird, läßt sie sich als Templat für ein räumliches Screening verwenden. Ein Beispiel möge dies verdeutlichen:

Cyclische Hexapeptide bevorzugen oftmals eine Struktur mit zwei  $\beta$ -Schleifen.<sup>[162]</sup> In einem cyclischen Hexapeptid aus L-Aminosäuren mit der biologisch aktiven Sequenz ABC stehen demnach drei Konformationen im Gleichgewicht, in denen die Sequenz ABC jeweils eine andere Position im Ring einnimmt (Schema 6a). Es ist bekannt, daß eine D-Aminosäure, speziell D-Prolin, die *i*+1-Position einer  $\beta$ II'-Schleife stark bevorzugt. Damit läßt sich die Sequenz ABC gleichsam in den drei Positionen fixieren, je nachdem, welche Aminosäure der Sequenz in der D-Konfiguration vorliegt (Schema 6b). Wir haben dieses Prinzip bereits beim Design der bioaktiven Konformation der bindenden Schleife von Tendamistat, einem  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor, genutzt.<sup>[163, 164]</sup> Ist die bioaktive Konformation unbekannt, so läßt sich durch Synthese der sechs Cyclopeptide mit der Aminosäuresequenz ABCDEF, in denen jeweils eine der Aminosäuren in der D-Konfiguration vorliegt, die gewünschte Sequenz ABC in verschiedenen räumlichen Positionen fixieren (Schema 6c). Dabei bleibt die Konstitution und damit auch die Abfolge der funktionellen Gruppen in der Sequenz erhalten. Eine Korrelation mit den biologischen Aktivitäten führt somit zur Identifikation der räumlich optimalen Anordnung.



Schema 6. Anordnung einer angenommenen bioaktiven Aminosäuresequenz ABC (schraffierte Kreise) in cyclischen Hexapeptiden. Die Pfeile weisen auf die Orientierung der Wasserstoffbrückenbindung in den  $\beta$ -Schleifen hin. a) Die bevorzugte  $\beta,\beta$ -Konformation eines Hexapeptides ermöglicht die annähernd gleiche Population dreier Konformationen, wenn das Cyclohexapeptid nur L-Aminosäuren enthält. b) Fixierung der bioaktiven Sequenz ABC in drei Positionen durch eine struktur-induzierende Aminosäure (D-Xaa oder Prolin). c) Bevorzugte Konformation der Sequenz ABCDEF mit jeweils einer D-Aminosäure in sechs möglichen Hexapeptiden. Durch die Strukturinduktion der D-Aminosäure (grauer Kreis) in der  $i+1$ -Position einer  $\beta$ II-Schleife wird die aktive Sequenz auf dem Stammtplatt verschoben.

### 5.1.2. Stereoisomere RGD-Peptid-Bibliothek

Bei der Suche nach selektiven und aktiven Verbindungen, die an Integrine binden, haben wir die RGD-Triade, die am C-Terminus mit der lipophilen Aminosäure Phenylalanin flankiert war, in verschiedene cyclische Penta- und Hexapeptide eingebaut und die Chiralität der Aminosäuren systematisch variiert. Die Wahl von Phenylalanin resultierte aus dem Sequenzvergleich von RGD-haltigen Proteinen. Hierbei gehen wir zunächst davon aus, daß die Konformationen der Peptide in erster Näherung denen der analogen „Alaninpeptide“ entsprechen. Abbildung 4 zeigt, daß in der Tat die Konformationen von *cyclo*(-D-Ala-Ala<sub>4</sub>-) und *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) weitgehend übereinstimmen. Die Aminosäuren D-Ala bzw. D-Phe bestimmen die Konformationen der Cyclopeptide.

Die zentrale Aminosäure Glycin in der RGD-Sequenz macht das Vorgehen allerdings etwas unübersichtlicher, da Glycin sowohl als D- als auch als L-Aminosäure fungieren kann und zusätzlich eine durch die geringere sterische Hinderung bedingte

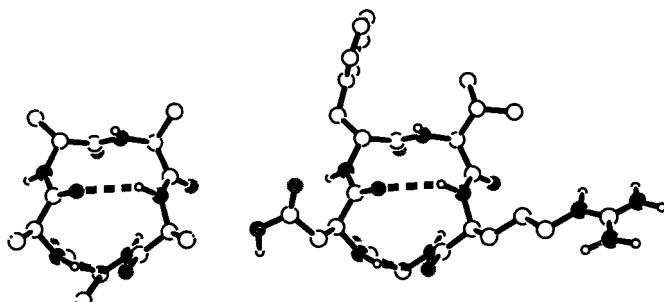
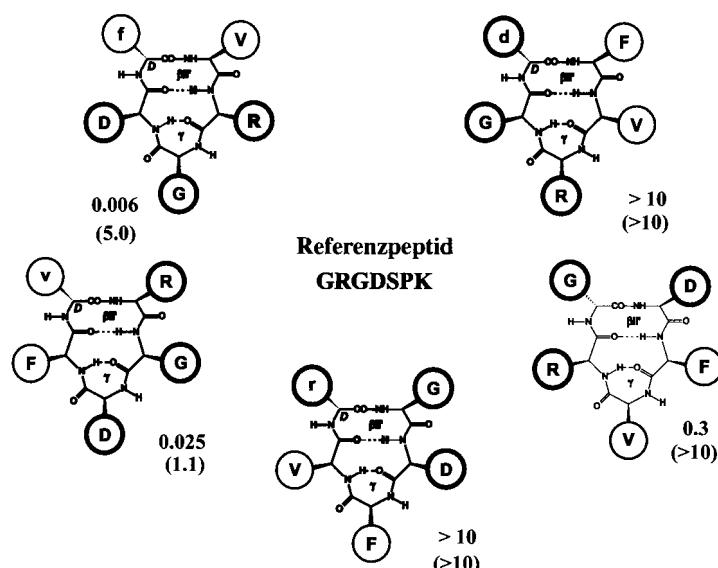


Abb. 4. Konformationen von *cyclo*(-D-Ala-Ala<sub>4</sub>-) und *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) in DMSO; gezeigt ist die zeitlich gemittelte Trajektorie einer auf NMR-Daten beruhenden rMD-Simulation (rMD = restrained molecular dynamics).

größere Flexibilität einbringt. Die Konformationen der Cyclen sind daher nicht vollständig vorhersehbar und wurden in unserem Fall auch jeweils durch NMR-Spektroskopie in Kombination mit Distanz-Geometrie(DG)- und/oder Moleküldynamik(MD)-Rechnungen bestimmt. Mit diesem Verfahren entdeckten wir tatsächlich Hexapeptide, die gegenüber dem linearen Referenzpeptid -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser- deutlich höhere Aktivität am Blutplättchenrezeptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aufweisen.<sup>[157, 165]</sup> Für das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin gibt es allerdings schon hochpotente peptidische<sup>[166, 167]</sup> und auch nichtpeptidische<sup>[168–173]</sup> Inhibitoren, die sich gegenwärtig z. T. in der klinischen Entwicklung, also kurz vor der Markteinführung als Antithrombolytika, befinden.

Bei unseren aktivsten Hexapeptiden<sup>[87]</sup> (z. B. *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Leu-Gly),  $IC_{50}(\alpha_{IIb}\beta_3/Fb) = 3 \mu M$ ) befindet sich die RGD-Sequenz in einer  $\beta$ II-Schleife mit C<sup>2</sup>(Arg)-C<sup>2</sup>(Asp)-Abständen von ca. 560 pm und entsprechenden C<sup>2</sup>(Arg)-C<sup>2</sup>(Asp)-Abständen zwischen 700 und 780 pm. Peishoff et al.<sup>[174–176]</sup> stellten in homodeten prolinhaltigen Hexapeptiden mit ähnlichen Aktivitäten ebenfalls eine geknickte RGD-Konformation in einer  $\beta$ -Schleife fest. Die wesentlich aktiveren Peptidanaloga mit  $IC_{50}$ -Werten im nanomolaren Bereich weisen demgegenüber eher eine gestreckte Anordnung der RGD-Sequenz auf.<sup>[177–183]</sup> Neuartig und von besonderem Interesse war jedoch, daß geeignete cyclische Pentapeptide gegenüber den auf Krebszellen überexprimierten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen aktiver und selektiver sind (Schema 7).<sup>[87]</sup> Die Untersuchungen der stereoisomeren Peptid-Bibliothek lieferten mit *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) und *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-) zwei hochaktive Inhibitoren der Bindung von Vitronectin an  $\alpha_v\beta_3$ .<sup>[165, 184]</sup> Diese Pentapeptide blockieren die Zelladhäsion verschiedener humarer Zelllinien (Fibrosarkom HT1080, Melanom A375 und Brustepithel HBL100)<sup>[87, 88, 184]</sup> und geben im Test am isolierten, immobilisierten  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich.<sup>[165]</sup> Somit war die Möglichkeit eröffnet, die Tumormetastasierung über diesen Rezeptor selektiv zu beeinflussen. Von besonderem Interesse war die Inhibierung der tumorinduzierten Angiogenese (siehe oben). Dabei zeigte sich, daß die beteiligten Endothelzellen durch Wechselwirkung mit den Cyclopeptiden ein Apoptosesignal erhalten, das wahrscheinlich durch die Blockierung der  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine und der damit verbundenen Auflösung von fokalen Adhäsionspunkten ausgelöst wird. Diese Befunde machten die Cyclopeptide zu Kandidaten für einen neuen Tumorwirkstoff.<sup>[185–189]</sup>

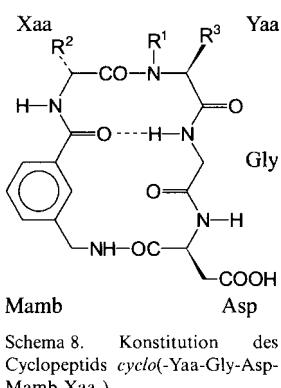


Schema 7. Relative Inhibition of the cell adhesion  $Q = IC_{50}/IC_{50ref}$ , through RGD-Cyclopentapeptides. The values refer to the  $\alpha_v\beta_3$ -receptor. In parentheses are the corresponding values for the platelet receptor ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). The smaller the value, the greater the biological activity (the lower the concentration required to inhibit 50% of the effect).

### 5.1.3. Dreidimensionale Struktur, Dynamik und retro-inverse Peptide

The structure-activity studies of cyclopeptides showed that when glycine is in the  $i+1$ -position of a  $\gamma$ -turn, a high  $\alpha_v\beta_3$ -selectivity is observed.<sup>[157]</sup> The tripeptide sequence RGD is strongly knotted in  $\alpha_v\beta_3$ -selective structures, while it is more extended in  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selective peptides. Generally, the relative orientation of the vectors, which are taken up by the pharmacophore in the receptor, is decisive for the activity (on this method see e.g. the CAVEAT program<sup>[190]</sup>). In the cyclic pentapeptides, these vectors for the two amino acids Asp and Arg are almost parallel to the same side of the ring. A similar arrangement is also found in  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -active structures. The distance between the  $C^{\alpha}$ -atoms (547 pm) and the  $C^{\beta}$ -atoms (668 pm) of Arg and Asp in the  $\alpha_v\beta_3$ -selective pentapeptides is determined by the very compact  $\gamma$ -turn conformation of the loop.

Bach et al.<sup>[191, 192]</sup> studied recently peptidomimetics of the sequence *cyclo*(Xaa-Yaa-Gly-Asp-Mamb-), where Xaa is D- and L-amino acids and Yaa is NMe-Arg or Arg (Mamb = *meta*-aminomethylbenzoic acid; Xaa = D-, L-Ala, Aib, Pro, D-Abu; Scheme 8). They showed that when the dipeptide unit D-Xaa-NMeArg is included in the active  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -antagonists, and when the unit L-Xaa-Arg is included in the active  $\alpha_v\beta_3$ -antagonists. The structures differ mainly in the loop type, which is formed by these dipeptide units.



Schema 8. Constitution of the cyclopeptide *cyclo*(-Yaa-Gly-Asp-Mamb-Xaa-).

It is shown that when the D-amino acid is in the  $i+1$ -position, a  $\beta$ -turn is formed, while when the L-amino acid is in the  $i+1$ -position, a  $\beta$ -turn is formed, which is similar to the conformation of *cyclo*(-Arg-Gly-D-Phe-Val) a  $\gamma$ -turn around the glycine residue. This is the case for the  $\alpha_v\beta_3$ -antagonists, the  $C^{\alpha}$ - $C^{\beta}$  distances are 630 to 660 pm, which are significantly shorter than for the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -antagonists. Burgess et al.<sup>[193]</sup> found in the  $\alpha_v\beta_3$ -selective peptide *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-Arg-Gly-Asp-) a structure, in which the glycine is in the  $i+1$ -position of a  $\gamma$ -turn.

To illuminate the stereochemical requirements, we have almost all stereoisomers of the pentapeptide *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) and the retro-sequence *cyclo*(-Val-Phe-Asp-Gly-Arg) prepared.<sup>[194]</sup> The use of the retro-sequence is based on the assumption of Prelog, Gerlach and Owtschinnikow,<sup>[195, 196]</sup> which showed that an inversion of the amino acid sequence combined with an inversion of all amino acids must be performed, if the side chains are to have the same orientation. This concept is often used to achieve partial incorporation of retro-sequences with D-amino acids enzymatically stable linkages to be obtained. Often one finds active structures in retro-inverted peptides.<sup>[194]</sup> However, the analogy of the stampeptide and its retro-inversion is only valid, if the backbone conformation is neglected.<sup>[194, 197]</sup> Actually, the retro-inversion of the highly active *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) is only four to five times less active (Fig. 5). The retro-stereoisomer *cyclo*(-D-Val-D-Phe-D-Asp-Gly-Arg) shows an unexpectedly high  $\alpha_v\beta_3$ -activity, although Asp is in the D-configuration, which is normally associated with a complete loss of activity. This peptide is very flexible, so detailed structural assignments are not possible. It remains to be seen, if the structure is retained, when the backbone conformation is taken into account.

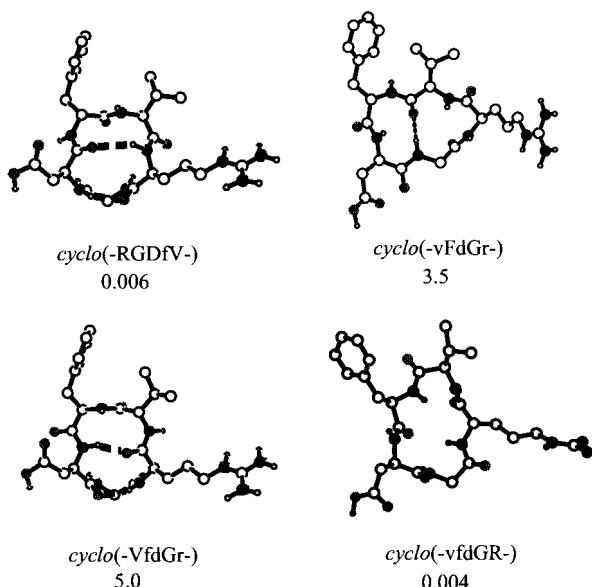
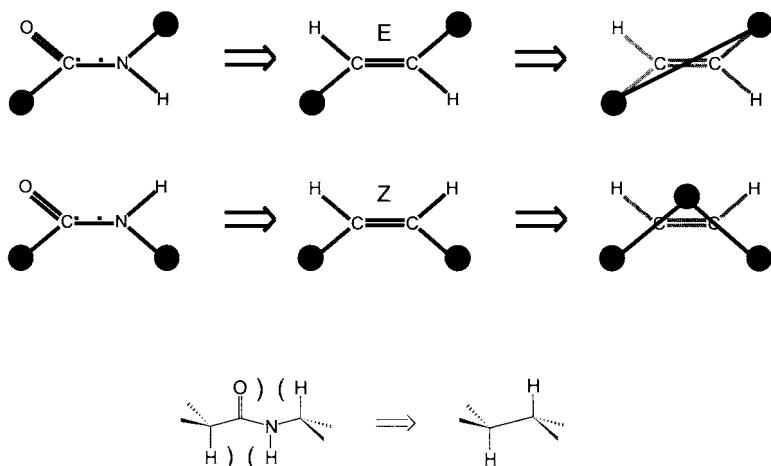


Abb. 5. Stereoisomeres und Retro-Stereoisomeres des Pentapeptids *cyclo*(-RGDfV-). Angenommen ist die relative Inhibition der Zelladhäsion  $Q = IC_{50}/IC_{50ref}$ . ( $IC_{50ref}$ : bezogen auf das lineare Referenzpeptid GRGDSPK) am  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor. Links oben: Stammpeptid. Rechts daneben das retro-inverse Peptid. Unten links ist ein Retro-Peptid gezeigt, das die gleiche Anordnung der Seitenketten, aber eine umgekehrte Peptidbindungsrichtung aufweist. Rechts unten befindet sich ein hochaktives Retro-Peptid (siehe Abschnitt 5.3.1).

daß in der  $\gamma$ -Schleife von *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) noch erhebliche Flexibilität vorhanden ist.<sup>[198]</sup> Insbesondere die Peptidbindungen zwischen Arg und Gly sowie zwischen Gly und Asp weisen gemäß Ensemblerechnungen unterschiedliche Orientierungen auf, in denen zwar die äußere Geometrie der  $\gamma$ -Schleife einigermaßen ungestört ist, die interne Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asp-NH und Arg-CO aber gebrochen ist.<sup>[199]</sup>

Die Dynamik der Cyclopeptid-Konformationen läßt sich mit einem Modell verstehen, das die Cyclopeptidkonformationen auf die Konformationen des Cyclopentans zurückführt.<sup>[200]</sup> Dazu wird jede *trans*-Peptidbindung in eine (*E*)-Ethen-Einheit und jede *cis*-Peptidbindung in eine (*Z*)-Ethen-Einheit umgewandelt. Diese werden nun nach Dunitz und Waser<sup>[201]</sup> entweder durch eine „lange“ Bindung für die *trans*-Doppelbindung oder durch eine CH<sub>2</sub>-Gruppe für die *cis*-Doppelbindung ersetzt. Bei einem Cyclopeptid mit all-*trans*-Peptidbindungen führt dies zum entsprechenden Cycloalkan, als wären nur die  $\alpha$ -Kohlenstoffatome relevant. Somit sollte ein Cyclopentapeptid eine Envelope-Konformation (vier C $^{\alpha}$ -Atome in einer Ebene) bevorzugen, die aber einer schnellen Pseudorotation unterliegt. Die Röntgenstrukturanalyse eines cyclischen Pentapeptids zeigt eine solche Konformation.<sup>[202]</sup>

In gleicher Weise lassen sich die Konformationen anderer Cyclopeptide auf die von Cycloalkanen zurückführen.<sup>[200, 231]</sup> Wie in Cycloalkanen werden 1,3-diaxiale oder ekliptische Anordnungen der C $^{\beta}$ -Atome vermieden. Dies ist wegen des großen Abstandes der C $^{\alpha}$ -Atome über die Peptidbindung hinweg zunächst verwunderlich. Wir erklären dieses Verhalten mit Allylspannungen, die in der in Schema 9 gezeigten Anordnung mini-



Schema 9. Schematische Darstellung des Dunitz-Waser-Konzepts und dessen Anwendung auf Amidbindungen in Peptiden. Das Prinzip der Minimierung der Allylspannung führt dazu, daß sterische Effekte über die Amidbindung hinweg vermittelt werden.

mieren sind. Damit werden die sterischen Effekte an den  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen über die Amidbindung „weitergeleitet“ (man vergleiche hierzu die Konformationsstudien in Lit.<sup>[203]</sup>). Zusätzlich zu diesem grundsätzlichen sterischen Konformationsverhalten können bei Peptiden Wasserstoffbrückenbindungen eine (allerdings untergeordnete<sup>[204]</sup>) Rolle spielen. Aus der hier diskutierten Analogie zu Cyclohexankonformationen folgt, daß bei Cyclopentapeptiden oft mehrere Konformationen zu berücksichtigen sind, während cyclische Hexapeptide mit all-*trans*-Peptidbindungen cyclohexananaloge Konformationen einnehmen.

## 5.2. Konformativ kontrollierte SAR

Die Peptide *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) und *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-) der ersten Generation dienten als Ausgangspunkt, um den Einfluß der Aminosäuren, welche die RGD-Sequenz flankieren, zu untersuchen.<sup>[205, 206]</sup> Diese Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen wurden unter „konformativer Kontrolle“<sup>[207]</sup> durchgeführt, d. h. es wurde der Einfluß der Seitenketten dieser Aminosäuren auf die biologische Aktivität untersucht und gleichzeitig durch NMR-spektroskopische Konformationsbestimmung sichergestellt, daß trotz der veränderten Konstitution die Konformation erhalten blieb. Die beobachteten Aktivitätsunterschiede müssen dann auf die Variation der Seitenkettenfunktionen zurückgeführt werden. Wie wichtig diese Kontrolle ist, machten die Modifikationen von Peptidbindungen (Thioamid, reduzierte Amidbindungen) deutlich, durch welche die Konformation völlig geändert wurde.<sup>[208]</sup> Damit einher ging eine drastische Verringerung der biologischen Aktivität. Allerdings läßt sich dann nicht sagen, ob dies auf die geänderte Konstitution oder die geänderte Konformation zurückzuführen ist (siehe unten).

Es stellt sich heraus, daß eine hydrophobe Aminosäure neben der Asparaginsäure die Aktivität für das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin erhöht, während die Aminosäure in der nächsten Position nahezu beliebig ersetzt werden kann, ohne die Aktivität zu beeinflussen. Von Mullen et al.<sup>[209]</sup> haben verschiedenste disulfidverbrückte cyclische RGD-Peptide untersucht. So weist das  $\alpha_v\beta_3$ -selektive, disulfidverbrückte Peptid Gly-Pen-Arg<sup>-2</sup>-Ala<sup>-1</sup>-Arg<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Asp<sup>3</sup>-Asp<sup>4</sup>-Val<sup>5</sup>-Cys-Ala eine Konformation auf, in der sich die RGD-Sequenz in einer nicht näher definierten  $\beta$ -Schleife befindet, an die sich die Asp-Asp-Val-Sequenz in einem  $\beta$ -Faltblatt anschließt. Auch hier scheint die RGD-Sequenz in einer geknickten Konformation vorzuliegen. Außerdem ergaben diese Untersuchungen, daß auch in dieser Substanzklasse eine der RGD-Sequenz folgende lipophile,  $\beta$ -verzweigte Aminosäure die Aktivität erhöht. Allerdings befindet sich diese Aminosäure dort nicht in genau der gleichen Position wie in den Cyclopentapeptiden.

Untersuchungen an Phagenbibliotheken der Sequenz Cys-Xaa<sub>6</sub>-Cys und Cys-Xaa<sub>7</sub>-Cys bestätigten, daß das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin eine Bindungstasche für eine hydrophobe Aminosäure hat.<sup>[150]</sup> Viele der  $\alpha_v\beta_3$ -bindenden Sequenzen enthalten benachbart zur Asparaginsäure Ser oder Thr und in der nächsten Position eine hydrophobe Aminosäure wie Phe, Leu oder Ile. Auch Healy et al.<sup>[151]</sup> untersuchten Peptidliganden für das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin mit Phagenbibliotheken. Aus den qualitativen Bindungsdaten konnten sie allerdings keine deutliche Korrelation zwischen Aktivität und flankierenden Aminosäuren feststellen. Peptide mit zwei Cysteinen N- und C-terminal zur RGD-Sequenz in den Bindungssassays waren die aktivsten Verbindungen. Diese Ergebnisse bestätigen, daß konformativ eingeschränkte Peptide eine hohe Affinität zum  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aufweisen, wenn sie eine geknickte Konformation einnehmen können, wie sie einer  $\gamma$ -Schleife entspricht.

### 5.3. Peptidmimetika

Zu einem besseren Verständnis der Anforderungen an die Struktur eines biologisch aktiven Substrats kann die Modifikation von Peptidbindungen beitragen (Thiopeptide, Ketomethylenanaloga, reduzierte Peptide usw.). So kann die Bedeutung einzelner Strukturelemente (z. B. einer Amidbindung innerhalb der aktiven Sequenz) für die Substrat-Rezeptor-Wechselwirkung untersucht werden. Dabei ist zu beachten, daß die Gesamtkonformation des Peptides durch den Einbau eines Peptidbindungsisosters oder Peptidmimetikums nicht verändert werden darf. Nur so können die Effekte der Konfiguration auf die biologische Aktivität von denen der Konformation getrennt bewertet werden.<sup>[207]</sup>

#### 5.3.1. Einfluß der Amidbindungen

Um den Einfluß der Amidbindungen auf die Aktivität einer Verbindung zu untersuchen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Beispielsweise kann die Amidbindung durch Peptidbindungsisostere ersetzt,<sup>[210]</sup> das Amidproton durch Alkylierung eliminiert<sup>[211]</sup> oder durch Einsatz von retro-inversen Peptiden die Orientierung der Amidbindung umgekehrt werden.<sup>[212]</sup> Der Ersatz der Amidbindung zwischen Asp und Gly durch eine Thioamidbindung<sup>[213, 214]</sup> ( $\text{C}(\text{S})\text{NH}$ ) sowie der Peptidbindung zwischen Phe und Val durch eine reduzierte Amidbindung<sup>[208]</sup> ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ) in der Leitstruktur *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) lieferten in beiden Fällen eine Verbindung mit drastisch verminderter Aktivität. In welchem Umfang die konstitutiven Änderungen dieser Amidbindungen zum Aktivitätsverlust beitragen, kann nicht abgeschätzt werden, da die Modifikationen auch eine Konformationsänderung induzierten und somit ein Vergleich mit der Leitstruktur nicht mehr möglich ist.<sup>[214]</sup>

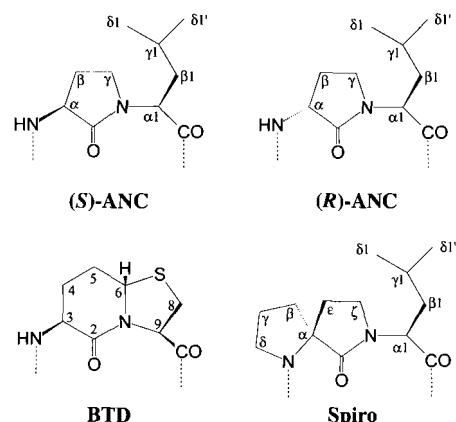
Die Methylierung der einzelnen Amidbindungen in *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) lieferte fünf Substanzen, von denen *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-N-Me-Val-) sowohl eine hohe Aktivität als auch Selektivität aufweist.<sup>[189, 215]</sup> Die anderen vier Cyclopeptide sind deutlich weniger aktiv. Aber auch die N-Methylierung der Peptidbindungen induzierte in allen fünf Cyclopentapeptiden eine Änderung der Struktur. So zeigt das N-Me-Val-Peptid eine deutlich aufgeweitete  $\beta$ II'-Schleife im Bereich der N-methylierten Amidbindung, die aber kaum einen Einfluß auf die Konformation der RGD-Sequenz hat. Für die anderen vier Peptide ist die vollständige Konformationsanalyse noch nicht abgeschlossen, so daß die Klärung der Ursache des Aktivitätsverlustes noch aussteht.

Ein Beweis für die Beteiligung mindestens einer Amidbindung des Cyclopeptids an der Bindung am Rezeptor kam unerwartet aus der Untersuchung der retro-inversen Peptide (siehe oben sowie Lit.<sup>[194, 214]</sup>). Unter den stereoisomeren Retro-Peptiden fand sich mit *cyclo*(-Val-D-Phe-D-Asp-Gly-D-Arg-) eine Verbindung, in der sich sämtliche Seitenketten nahezu ideal auf diejenigen im hochaktiven Stammpeptid projizieren lassen (Abb. 5). Die Aktivität des Retro-Peptids ist aber um ca. vier Zehnerpotenzen niedriger.<sup>[194]</sup> Da im Retro-Peptid die Anordnung sämtlicher Amidbindungen invertiert ist, muß der Aktivitätsunterschied auf die nunmehr ungünstige Lage einer oder mehrerer Peptidbindungen zurückgeführt werden.

#### 5.3.2. Weitere Einschränkungen der Flexibilität

Das rationale Drug-Design basiert darauf, möglichst detaillierte Informationen über die Struktur des Substrates und des Rezeptors sowie über die zur Bindung beitragenden Wechselwirkungen zu erhalten. Sind dreidimensionale Strukturen des Rezeptors oder des Rezeptor-Substrat-Komplexes nicht bekannt, so ist man auf indirekte Schlüsse aus der Struktur der Substrate angewiesen. Deshalb werden zum Studium der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sehr starre Verbindungen benötigt.<sup>[156]</sup> Obwohl der Konformationsraum in den hier besprochenen cyclischen Pentapeptiden bereits stark eingeschränkt ist,<sup>[157]</sup> haben diese immer noch Möglichkeiten zu konformativer Beweglichkeit.<sup>[206, 216]</sup> Vor allem im Bereich der  $\gamma$ -Schleife ist die Struktur nur schlecht definiert.<sup>[198, 206]</sup> Ensemblerechnungen ergaben, daß noch Flip-Bewegungen der beiden Peptidbindungen der  $\gamma$ -Schleife um die  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel möglich sind.<sup>[199, 217]</sup>

Um die Flexibilität der Pentapeptide weiter einzuschränken, wurden nichtpeptidische Bausteine (Turn-Mimetika)<sup>[218, 219]</sup> in die Leitstruktur *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) integriert.<sup>[220]</sup> Da Modifikationen der RGD-Sequenz die Aktivität der Peptide stark beeinflussen,<sup>[154, 155, 157]</sup> wurde das D-Phe-Val-Dipeptid durch verschiedene Mimetika ersetzt (Schema 10). Diese Turn-Mimetika sollen die  $\beta$ II'-Schleife fixieren, was indirekt auch die Flexibilität im  $\gamma$ -Schleifen-Bereich verringern sollte.



Schema 10.  $\beta$ -Turn-Mimetika. Die abgebildeten Bausteine wurden anstelle des Dipeptids -D-Phe-Val- in die  $\beta$ -Schleife des Stammpeptids *cyclo*(-RGDFV-) eingebaut.

Es zeigt sich aber, daß nur die (S,S)-Spiro-Pro-Leu-Einheit die gewünschte Struktur mit dem Turn-Mimetikum in der  $i+1$ - und  $i+2$ -Position der  $\beta$ II'-Schleife einnimmt. Die Peptidanaloga *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-(S)-ANC-), *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-(R)-ANC-) und *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-BTD-) lieferten Strukturen, in denen Glycin als D-Aminosäure-Mimetikum die  $i+1$ -Position der  $\beta$ II'-Schleife bevorzugt und die „ $\beta$ -Turn-Mimetika“ sich im Bereich der jeweiligen  $\gamma$ -Schleife befinden. Die Untersuchungen liefern mit *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-(R)-ANC-) ( $\text{IC}_{50}(\alpha_v\beta_3/\text{Vn}) = 0.8 \text{ nM}$ ) immerhin einen der aktivsten Inhibitoren des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins.

Neben der Einschränkung der Beweglichkeit cyclischer Pentapeptide können solche Mimetika auch zusätzliche Konformationsräume zugänglich machen. Dazu wurde die von Feigel et al.<sup>[221]</sup> als Turn-Mimetikum eingesetzte 5-Aminomethyl-2-thiophenessigsäure (Ate), die beim Ersatz des D-Phe-Val-Dipep-

tides sieben statt sechs Ringatome für den Aufbau des cyclischen Peptides liefert, in *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) eingebaut.<sup>[188, 222]</sup> Diese Verbindung zeigt eine sehr hohe Aktivität ( $IC_{50}(\alpha_v\beta_3/Vn) = 2 \text{ nM}$ ) sowie Selektivität ( $IC_{50}(\alpha_{IIb}\beta_3/Fb) = 3300 \text{ nM}$ ) für  $\alpha_v\beta_3$ .

Vielfach findet man, daß eine zu große Starrheit des Moleküls eine Verminderung oder sogar den vollständigen Verlust an biologischer Aktivität mit sich bringt. Dies wird oft dahingehend interpretiert, daß molekulare Beweglichkeit für den Bindungsprozeß notwendig ist. Wir sind aber der Auffassung, daß in den meisten Fällen die optimale Anpassung nur noch nicht erreicht ist. Es sollte dann prinzipiell möglich sein, die Aktivität weiter zu steigern, wenn es gelingt, die optimale (matched) Struktur noch besser anzunähern. Meist (aber nicht immer, siehe z. B. die Bindung des Cyclosporins an Cyclophilin<sup>[223]</sup>), wird die biologische Aktivität bei molekularen Wechselwirkungen durch die *thermodynamische Stabilität* des Rezeptor-Substrat-Komplexes und nicht durch die *Kinetik der Komplexbildung* bestimmt. Dann lohnt es sich in jedem Fall, starre Moleküle, welche die pharmakophoren Gruppen in einer anderen räumlichen Struktur anbieten, zu synthetisieren, um damit eine höhere Aktivität zu erzielen.

## 6. Nichtpeptidische $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten

Ein wichtiges Ziel der pharmazeutischen Forschung ist es, ausgehend von peptidischen Leitstrukturen nichtpeptidische, möglichst oral verfügbare Arzneimittel herzustellen, da Peptide unter physiologischen Bedingungen oft ungünstige biologische Eigenschaften aufweisen. So werden Peptide im Organismus durch Proteasen leicht gespalten. In unserem Fall wurde durch die Fixierung in der Cyclopentapeptidstruktur allerdings erreicht, daß die Peptide durch Exo- und Endopeptidasen nicht abgebaut werden. Ganz sicher ist dies für die retro-inversen Strukturen vorhersehbar, die hohe Anteile der enzymatisch nicht spaltbaren Peptidbindungen neben D-Aminosäuren enthalten. Außer der Cyclisierung kann auch der Einsatz von Peptidmimetika zu erhöhter Proteasesstabilität führen. Ein weiterer Punkt ist die schnelle Ausscheidung peptidischer Verbindungen mit einer molaren Masse von 500–1000 je nach ihrer Lipophilie durch den Leber-Gallen-Kanal oder über die Niere. Daher sind in der Regel nichtpeptidische Arzneimitteln gesucht. Das Dogma, das oraler Verfügbarkeit höchste Priorität einräumt, wird allerdings durch die individuell unterschiedliche Resorption im gastrointestinalen Trakt wieder fragwürdig. Im Fall schwerwiegender Erkrankungen ist eine intravenöse, intraperitoneale oder subcutane Applikation sicher zuzumuten und bei den auf extrazelluläre Rezeptoren gerichteten Wirkstoffen, die keine Zellmembran durchdringen müssen, auch angezeigt.

Ein Übergang vom Peptid zum Nichtpeptid wird möglich, wenn z. B. aus Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen an einer Bibliothek stereoisomerer cyclischer Peptide hervorgeht, daß für die antagonistische Wirkung Seitenkettenfunktionalitäten und vor allem deren durch das Peptidrückgrat vorgegebene räumliche Orientierung ausschlaggebend sind. Natürlich können auch andere pharmakophore Strukturelemente, z. B. eine aktivitätsbestimmende Amidbindung, in eine nichtpeptidische Struktur integriert werden.

Wie die Untersuchungen am  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin ergaben,<sup>[224]</sup> spielt im Fall der RGD-Sequenz der Abstand zwischen den pharmakophoren Gruppen (Carboxy- und Guanidinofunktion von Asp bzw. Arg) eine große Rolle für die Aktivität und Selektivität potentieller Antagonisten. Dies bietet prinzipiell die Möglichkeit, jedes beliebige Templatmolekül, das den pharmakophoren Gruppen eine gewünschte räumliche Orientierung vorgibt, als Grundgerüst zu verwenden.

Da sich ein direktes De-novo-Design selbst dann noch als schwierig erweist, wenn die räumliche Struktur des Rezeptors bekannt ist, sind vorhandene Strukturdaten eines Leitpeptids von großem Vorteil. Hier kann durch Vergleich mit der dreidimensionalen Struktur dieses Peptids versucht werden, ein geeignetes nichtpeptidisches Templatmolekül zu konstruieren.<sup>[190]</sup> Dieses sollte für eine selektive Wirkung eine möglichst starre Grundstruktur aufweisen („Cyclopeptideffekt“, Imitation eines starren Peptidrückgrats) und den pharmakophoren Gruppen eine definierte räumliche Orientierung vorgeben.

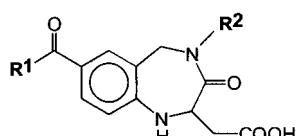
Beim  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin ist dieser Übergang weitgehend vollzogen und viele nichtpeptidische, teils oral verfügbare Antagonisten ausreichender Aktivität und Selektivität sind beschrieben.<sup>[168, 173, 225]</sup> Die meisten dieser Verbindungen enthalten als basische N-terminale Gruppierung eine Guanidino- oder Benzamidino-Funktion und eine C-terminale Carbonsäure in definiertem Abstand.

Konformationsstudien haben ergeben, daß eine halbschalenförmige Konformation eines potentiellen Templatmoleküls zur Präsentation der RGD-Sequenz für die Aktivität von Bedeutung ist.<sup>[173, 177]</sup> Hiermit kann eine Konformation, die der natürlichen RGD-Sequenz in einem Peptid (z. B. innerhalb einer Schleife) entspricht, besonders gut nachgeahmt werden. Dies ist unter anderem in Benzodiazepinen verwirklicht worden, welche die gewünschte gewölbte Konformation und die eingeschränkte Flexibilität des Siebenring-Systems aufweisen. Dadurch wird den pharmakophoren Gruppen der RGD-Sequenz die grundsätzliche räumliche Orientierung bereits vorgegeben.

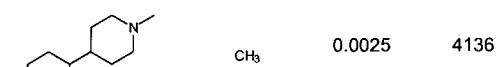
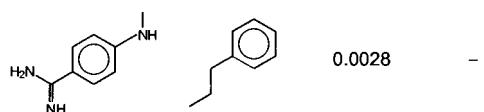
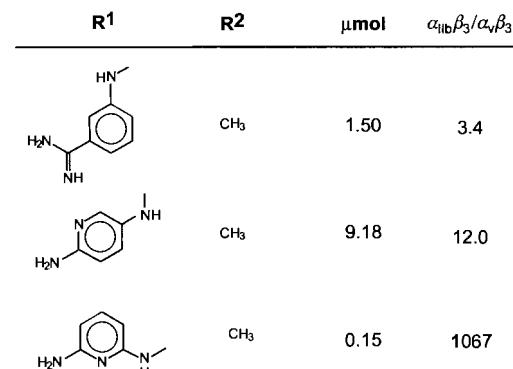
Die Entwicklung selektiver Antagonisten des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins ist hingegen noch nicht so weit fortgeschritten. Einige nichtpeptidische  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten resultierten aus den Untersuchungen der schon bekannten  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -selektiven Verbindungen auf Basis der Benzodiazepine, die auch schwache Aktivität am  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin aufwiesen. Durch Variation der Seitenketten wurden zuerst im mikromolaren Bereich aktive  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten hergestellt, die als mögliche Medikamente gegen Osteoporose beschrieben sind.<sup>[226, 227]</sup> Wie in Schema 11 verdeutlicht, führen vor allem Veränderungen im Bereich der Guanidinofunktion zu einer Verbesserung der  $\alpha_v\beta_3$ -Selektivität. Durch Übergang von einer Benzamidin- zu einer Aminopyridineinheit kann die Aktivität am  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin z. B. um den Faktor 10, die  $\alpha_v$ -Selektivität sogar um den Faktor 300 gesteigert werden.

Ein deutlicher Fortschritt gelang kürzlich durch den Einsatz eines Benzimidazolrestes als Arginin-Mimetikum.<sup>[228]</sup> Das resultierende Benzodiazepin (Schema 12) weist eine Aktivität für das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im nanomolaren Bereich auf und ist somit für diesen Rezeptor um den Faktor 15 000 selektiver als für  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

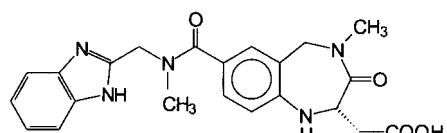
Eine Überlagerung der dreidimensionalen Strukturen des Cyclopeptids *cyclo*(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) und des 3-Oxo-1,4-benzodiazepin-Templats (siehe ganzseitige Darstellung auf S. 1440) zeigt deutlich, daß sich das Arginin-

α<sub>11b</sub>β<sub>3</sub>-Selektivität

R1	R2	μmol	α <sub>v</sub> β <sub>3</sub> /α <sub>11b</sub> β <sub>3</sub>
----	----	------	----------------------------------------------------------------

α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>-Selektivität

Schema 11. Nichtpeptidische  $\alpha, \beta_3$ - ( $\alpha_{11b}\beta_3$ -) Integrin-Antagonisten mit Benzodiazepin-Grundstruktur. Für eine Auswahl von Verbindungen sind die Aktivität (je kleiner der Wert, desto höher ist die Aktivität) und die Selektivität (Quotient der Aktivitäten) bei der Bindung an den isolierten  $\alpha, \beta_3$ - und  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Rezeptor angegeben.



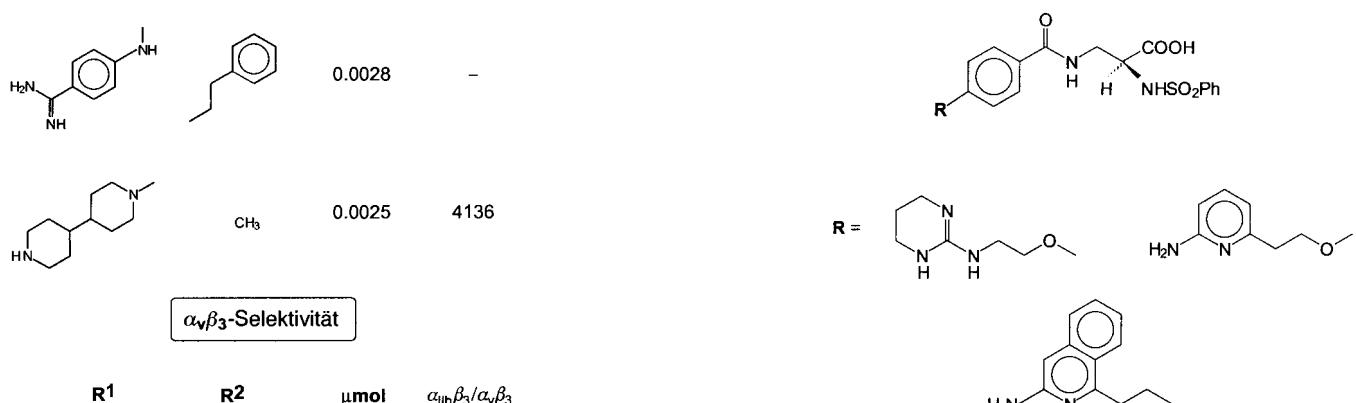
Schema 12. Ein nichtpeptidischer  $\alpha, \beta_3$ -Antagonist. Die Einführung einer Benzimidazol-Seitenkette führt zu nanomolarer Aktivität:  $IC_{50} = 0.002 \mu\text{mol}$  ( $\alpha_{11b}\beta_3 = 15\,000$ ).

Mimetikum in Position sieben des Benzodiazepins für eine Wechselwirkung mit dem  $\alpha, \beta_3$ -Integrin optimal eignet.<sup>[229]</sup>

Vergleicht man die Struktur darüber hinaus mit  $\alpha_{11b}\beta_3$ -selektiven Analoga, so scheint vor allem der verkürzte Abstand zwischen der basischen Funktion und der Carboxygruppe für die  $\alpha, \beta_3$ -Selektivität wichtig zu sein. Diese Ergebnisse bestätigen somit frühere Untersuchungen, die für  $\alpha, \beta_3$ -Antagonisten einen verkürzten Abstand zwischen diesen funktionellen Gruppen, wie man ihn in einer  $\gamma$ -Schleife findet, diskutieren.<sup>[88]</sup> Ein Vergleich der basischen Funktionen hochaktiver  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Antagonisten mit denen  $\alpha, \beta_3$ -selektiver Antagonisten legt nahe, daß eine Side-on-

Wechselwirkung mit dem Rezeptor über zwei Stickstoffatome für eine starke Bindung an das  $\alpha, \beta_3$ -Integrin günstig ist.

Eine weitere Klasse von  $\alpha, \beta_3$ -Antagonisten ist auf ein analoges Wirkspektrum ausgerichtet (Restenose, Osteoporose, Tumormetastasierung). Es handelt sich hierbei um Verbindungen mit einer *para*-Hydroxybenzoesäureamid-Grundstruktur,<sup>[230]</sup> deren mannigfaltige Variation aller Liganden eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen zuläßt. Exemplarisch sind in Schema 13 einige Strukturvarianten dargestellt.



Schema 13. Nichtpeptidische  $\alpha, \beta_3$ -Integrin-Antagonisten mit *para*-Hydroxybenzoesäureamid-Grundstruktur. Angaben zur biologischen Aktivität liegen nicht vor.

Der Schritt vom nichtpeptidischen, oral verfügbaren, selektiven und hochaktiven  $\alpha, \beta_3$ -Antagonisten zum Therapeutikum ist sicherlich nicht groß. Viele dieser Verbindungen werden sich zur Zeit im Stadium toxisologischer oder klinischer Untersuchungen befinden. Dies erklärt, daß sie vor allem in der Patentliteratur beschrieben sind, es erschwert aber auch den Vergleich von biologischen Aktivitäten sowie von Angaben über Bioverfügbarkeit und metabolische Stabilität im Rahmen dieses Beitrags.

## 7. Zusammenfassung

Durch selektives Eingreifen in Adhäsionsprozesse der Zelle lassen sich viele physiologische und pathologische Prozesse beeinflussen. Gerade die Biochemie der Zelladhäsion und die damit verknüpfte Signaltransduktionskette wird zur Zeit intensiv untersucht. Die hier beschriebene Strategie ist ein Ansatz, um bioaktive Verbindungen auf einem semirationalen Weg zu finden, auch wenn die dreidimensionale Struktur des Rezeptors oder des Rezeptor-Substrat-Komplexes nicht bekannt sind. Auf rationalem Weg werden Informationen über die Konstitution der Substrate – aus Sequenzvergleich oder Peptidbibliotheken – genutzt, um durch Design von räumlichen Strukturen Verbindungsbibliotheken zu erstellen. Dadurch läßt sich die gewünschte Wirkung im Hinblick auf Aktivität und Selektivität optimieren.

Verbindungen mit hoher Aktivität und Selektivität für das  $\alpha, \beta_3$ -Integrin zeichnen sich durch einen gegenüber den  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Antagonisten verkürzten Abstand zwischen der Guanidino- und der Carboxylatfunktion – der in den Peptiden durch eine

geknickte Konformation am Glycin ( $\gamma$ -Schleife) erreicht wird – sowie durch eine hydrophobe Gruppe in der auf die RGD-Sequenz folgenden Aminosäure aus. Sterische Anforderungen im Bereich des Glycins werden für eine starke Bindung an das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nicht toleriert.

Dieses Verfahren sollte sich auch auf andere Integrinrezeptoren anwenden lassen und so zu einem umfassenderen Verständnis der Bedeutung von Integrinrezeptoren im zellulären Geschehen führen. Voraussetzung hierfür ist jedoch, daß die Rezeptor-subtypen zur Untersuchung ihrer Inhibierung isoliert werden können. Die hier vorgestellten cyclischen Pentapeptide und die inzwischen entwickelten Benzodiazepinderivate sind somit aktive und selektive  $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten zur Behandlung verschiedener Krankheitsbilder wie Restinose, Osteoporose, akutes Nierenversagen oder Retinopathie und ermöglichen darüber hinaus eine neue Form der Krebstherapie durch Inhibierung der tumorinduzierten Angiogenese.

Zahlreiche Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe haben auf dem RGD-Gebiet mitgewirkt. Besonders hervorzuheben ist die initierende Bearbeitung durch Dr. M. Gurrath und Dr. G. Müller. In der Folge waren beteiligt: M. Dechantsreiter, Dr. A. Geyer, Dr. M. Koppitz, Dr. M. Kranz, Dr. E. Graf von Roedern, J. Schmitt und Dr. J. Wermuth. Für die biologischen Tests während der Anfangsphase danken wir Prof. R. Timpl (Max-Planck-Institut, Martinsried) und Prof. J. Engel (Biozentrum Basel). Die nephrologischen Studien wurden von Prof. M. S. Goligorsky (Stony Brook) durchgeführt. Seit 1992 werden alle Arbeiten in enger Zusammenarbeit mit Merck KGaA (Darmstadt) fortgeführt. Hier gilt unser Dank insbesondere: Dr. A. Jonczyk, Dr. S. L. Goodman und Dr. G. Hölzemann. An den Konformationsuntersuchungen waren Prof. D. Mierke, Dr. W. Schmitt und R. Gratias beteiligt. Hilfreiche Diskussionen verdanken wir darüber hinaus Dr. R. Geiger, Dr. J. Knolle und Dr. W. König (Hoechst AG). Für die finanzielle Unterstützung danken wir Merck KGaA (Darmstadt), der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie.

Eingegangen am 20. Dezember 1996 [A198]

- [1] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491–497.
- [2] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2868–2880.
- [3] R. O. Hynes, A. D. Lander, *Cell* **1992**, *68*, 303–322.
- [4] J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 906–908.
- [5] G. Wagner, D. F. Wyss, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 841–851.
- [6] T. A. Springer, *Nature* **1990**, *346*, 425–434.
- [7] T. L. Collins, P. D. Kassner, B. E. Bierer, S. J. Burakoff, *Curr. Opin. Immun.* **1994**, *6*, 385–393.
- [8] A. J. Bridges, *Chemtracts: Org. Chem.* **1995**, *8*, 73–107.
- [9] S. J. Singer, *Science* **1992**, *255*, 1671–1677.
- [10] C. H. Damsky, M. Bernfield, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2*, 813–814.
- [11] A. P. Gilmore, K. Burridge, *Structure* **1996**, *4*, 647–651.
- [12] A. M. P. Montgomery, R. A. Reisfeld, D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8856–8860.
- [13] E. Ruoslahti, J. C. Reed, *Cell* **1994**, *77*, 477–478.
- [14] C. B. Thompson, *Science* **1995**, *267*, 1456–1462.
- [15] D. C. Levin, J. T. Fallon, *Circulation* **1982**, *66*, 316–320.
- [16] M. J. Davies, A. C. Thomas, *Br. Heart J.* **1985**, *53*, 363–373.
- [17] E. Falk, *Circulation* **1985**, *71*, 699–708.
- [18] F. E. Ali, J. M. Samanen, R. J. Shebuski (Smith Kline, Beechham), EP-A 341 915-A2, 1989 [*Chem. Abstr.* **1990**, *112*, 158983p].
- [19] S. M. Albelda, *Lab. Invest.* **1993**, *68*, 4–17.
- [20] F. G. Giancotti, F. Mainiero, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, *1198*, 47–64.
- [21] M. A. Horton, M. L. Taylor, T. R. Arnett, M. H. Helfrich, *Exp. Cell Res.* **1991**, *195*, 368–375.
- [22] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475–1482.
- [23] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Zambonin Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209–218.
- [24] M. Chorev, R. Dresnerpollak, Y. Eshel, M. Rosenblatt, *Biopolymers* **1995**, *37*, 367–375.
- [25] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453–464.
- [26] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931–10934.
- [27] J. Folkman, *Nature Medicine* **1995**, *1*, 27–31.
- [28] G. C. Brown, R. H. Brown, M. M. Brown, *Int. Ophthalmol.* **1987**, *11*, 41–50.
- [29] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **1991**, *64*, 327–336.
- [30] D. Weinstat-Saslow, P. S. Steeg, *FASEB J.* **1994**, *8*, 401–407.
- [31] A. P. Mould, A. Komoriya, K. M. Yamada, M. J. Humphries, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 3579–3585.
- [32] D. S. Tuckwell, A. Brass, M. J. Humphries, *Biochem. J.* **1992**, *285*, 325–331.
- [33] M. H. Ginsberg, X. P. Du, T. E. O'Toole, J. C. Loftus, E. F. Plow, *Thromb. Haemostasis* **1993**, *70*, 87–93.
- [34] J. W. Smith, D. A. Cheresh, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2169–2172.
- [35] J.-O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631–638.
- [36] J.-O. Lee, P. Rieu, L. A. Bankston, M. A. Arnaout, R. Liddington, *Structure* **1995**, *3*, 1333–1340.
- [37] D. C. Altieri, *J. Immunol.* **1991**, *147*, 1891–1898.
- [38] T. Yanai, T. Shimooka, I. Ii, *Cell Struct. Funct.* **1991**, *16*, 149–156.
- [39] M. Busk, R. Pytel, D. Sheppard, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5790–5796.
- [40] I. Dransfield, C. Cabanas, A. Craig, N. Hogg, *J. Cell Biol.* **1992**, *116*, 219–226.
- [41] S. Suzuki, Y. Naitho, *EMBO J.* **1990**, *9*, 757–763.
- [42] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549–554.
- [43] C. A. Buck, A. F. Horwitz, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, *3*, 179–205.
- [44] S. E. D'Souza, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 246–250.
- [45] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [46] D. J. Rees, S. E. Ades, S. J. Singer, R. O. Hynes, *Nature* **1990**, *347*, 685–689.
- [47] A. P. Gilmore, K. Burridge, *Nature* **1995**, *373*, 197.
- [48] R. P. Johnson, S. W. Craig, *Nature* **1995**, *373*, 261–264.
- [49] C. A. Otey, M. Pavalko, K. Burridge, *J. Cell Biol.* **1990**, *111*, 721–729.
- [50] D. Cox, T. Akoi, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195–228.
- [51] M. A. Arnaout, *Blood* **1990**, *75*, 1037–1050.
- [52] T. K. Kishimoto, R. S. Larson, A. L. Corbi, M. L. Dustin, D. E. Staunton, T. A. Springer, *Adv. Immunol.* **1989**, *46*, 149–182.
- [53] D. R. Phillips, I. F. Charo, R. M. Scarborough, *Cell* **1991**, *65*, 359–362.
- [54] Y. Q. Chen, X. Gao, J. Timar, D. Tang, I. M. Grossi, M. Chelladurai, T. J. Kunicki, S. E. G. Fligiel, J. D. Taylor, K. V. Honn, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17314–17320.
- [55] K. V. Honn, Y. Q. Chen, J. Timar, J. M. Onoda, J. S. Hatfield, S. E. G. Fligiel, B. W. Steinert, C. A. Diglio, I. M. Grossi, K. K. Nelson, J. D. Taylor, *Exp. Cell Res.* **1992**, *201*, 23–32.
- [56] T. Weller, L. Alig, M. Hürzeler-Müller, W. C. Kouns, B. Steiner, *Drugs Future* **1994**, *19*, 461–476.
- [57] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Bd. I, 5. Aufl., Wissenschaftsverlag, Mannheim, **1987**, S. 311–331.
- [58] R. J. Gould, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1994**, *1*, 537–548.
- [59] N. S. Cook, G. Kottirsch, H.-G. Zerwes, *Drugs Future* **1994**, *19*, 135–159.
- [60] B. Felding-Habermann, *Biospektrum* **1996**, *2*, 25–29.
- [61] S. Suzuki, W. S. Argaves, H. Arai, L. R. Languino, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 4080–4085.
- [62] S. Strömlund, D. A. Cheresh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 881–885.
- [63] J. Savill, I. Dransfield, N. Hogg, C. Haslett, *Nature* **1990**, *343*, 170–173.
- [64] J. Nip, S. A. Rabbani, H. R. Shibata, P. Brodt, *J. Clin. Invest.* **1995**, *95*, 2096–2103.
- [65] Y. Wei, M. Lukashev, D. I. Simon, S. C. Bodary, S. Rosenberg, M. V. Doyle, H. A. Chapman, *Science* **1996**, *273*, 1551–1555.
- [66] G. Poste, I. J. Fidler, *Nature* **1980**, *283*, 139–146.
- [67] G. L. Nicholson, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *695*, 113–176.
- [68] L. A. Liotta, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 1–7.
- [69] L. A. Liotta, C. N. Rao, U. M. Wewer, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 1037–1057.
- [70] V. P. Terranova, E. S. Hujanen, G. R. Martin, *J. Natl. Cancer Inst.* **1986**, *77*, 311–316.
- [71] M. M. Zutter, G. Mazoujian, S. A. Santoro, *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 863–870.
- [72] K. Koretz, P. Schlag, L. Boumsell, P. Moller, *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 741–750.
- [73] P. G. Natali, M. R. Nicotra, C. Botti, M. Mottolese, A. Bigotti, O. Segatto, *Br. J. Cancer* **1992**, *66*, 318–322.
- [74] L. Damjanovich, S. M. Albelda, S. A. Mette, C. A. Buck, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **1992**, *6*, 197–206.
- [75] J. E. Bridges, P. Englefield, I. E. Boyd, W. R. Roche, E. J. Thomas, *Int. J. Gynecol. Cancer* **1995**, *5*, 187–192.
- [76] R. M. Lafrenie, S. Gallo, T. J. Podor, M. R. Buchanan, F. W. Orr, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **1994**, *30A*, 2121–2128.
- [77] C. L. Gladson, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1991**, *88*, 1924–1932.
- [78] S. M. Albelda, S. B. Mette, B. E. Elder, R. M. Stewart, L. Damjanovich, M. Herlyn, C. A. Buck, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6752–6764.

- [79] J. F. Marshall, S. A. Nesbitt, M. H. Helfrich, M. A. Horton, K. Palakova, I. R. Hart, *Int. J. Cancer* **1991**, *49*, 924–931.
- [80] B. Felding-Habermann, B. M. Mueller, C. A. Romerdahl, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1992**, *89*, 2018–2022.
- [81] J. Folkman, M. Klagsbrun, *Science* **1987**, *235*, 442–447.
- [82] P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, *264*, 569–571.
- [83] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3247–3254.
- [84] P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.
- [85] H.-P. Hammes, M. Brownlee, A. Jonczyk, A. Sutter, K. T. Preissner, *Nature Medicine* **1996**, *2*, 529–533.
- [86] M. Friedlander, C. L. Theesfeld, M. Sugita, M. Fruttiger, M. A. Thomas, S. Chang, D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9764–9769.
- [87] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- [88] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921.
- [89] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cheresh, *Science* **1995**, *270*, 1500–1502.
- [90] J. Folkman, K. Watson, D. Ingeber, D. Hanahan, *Nature* **1989**, *339*, 58–61.
- [91] P. C. Brooks, S. Strömlad, R. Klemke, D. Visscher, F. H. Sarkar, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1995**, *96*, 1815–1822.
- [92] A. Giannis, F. Rübsam, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 606–609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 588–590.
- [93] A. Miyachi, J. Alvarez, E. M. Greenfield, A. Teti, M. Grano, S. Colucci, A. Zambonin-Zallone, F. P. Ross, S. L. Teitelbaum, D. A. Cheresh, K. A. Hruska, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 369–374.
- [94] A. Zambonin-Zallone, A. Teti, M. Grano, A. Rubinacci, M. Abbadini, M. Gaboli, P. C. Marchisio, *Exp. Cell Res.* **1989**, *182*, 645–652.
- [95] G. Shankar, T. R. Gadek, D. J. Burdick, I. Davison, W. T. Mason, M. A. Horton, *Exp. Cell Res.* **1995**, *219*, 364–371.
- [96] J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan, M. Rosenblatt, *Endocrinology* **1993**, *132*, 1411–1413.
- [97] R. Dresnerpollak, M. Rosenblatt, *J. Cell. Biochem.* **1994**, *56*, 323–330.
- [98] G. A. Tanner, M. Steinhausen, *Am. J. Physiol.* **1976**, *230*, 1173–1181.
- [99] W. J. Arendshorst, W. F. Finn, C. W. Gottschalk, H. K. Lucas, *Kidney Int.* **1976**, *10*, 100–105.
- [100] M. Gruber, B. Lane, R. Lamia, E. Pastoriza-Munoz, *J. Am. Soc. Nephrol.* **1991**, *1*, 999–1004.
- [101] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050–1058.
- [102] J. Gailit, D. Colflesh, I. Rabiner, J. Simone, M. S. Goligorsky, *Am. J. Physiol.* **1993**, *264*, 149–157.
- [103] M. S. Goligorsky, G. F. Dibona, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5700–5704.
- [104] E. Noiri, V. Romanov, T. Forest, J. Gailit, G. F. Dibona, F. Miller, P. Som, Z. H. Oster, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1995**, *48*, 1375–1385.
- [105] M. Paulsson, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *27*, 93–127.
- [106] G. R. Martin, R. Timpl, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1987**, *3*, 57–85.
- [107] J. Engel, *Biochemistry* **1992**, *31*, 10643–10651.
- [108] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, J. Sundelin, P. Lind, P. A. Peterson, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 9593–9595.
- [109] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 375–413.
- [110] S. Dufour, J.-L. Duband, A. R. Kornblith, J. P. Thiery, *Trends Genet.* **1988**, *4*, 198–203.
- [111] R. O. Hynes, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1985**, *1*, 67–90.
- [112] R. O. Hynes, *Fibronectins*, Springer, New York, **1990**.
- [113] J. M. Gardner, R. O. Hynes, *Cell* **1985**, *42*, 439–448.
- [114] R. F. Doolittle, *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 195–229.
- [115] J. Lawler, R. Weinstein, R. O. Hynes, *J. Cell. Biol.* **1988**, *107*, 2351–2361.
- [116] D. F. Mosher, *Annu. Rev. Med.* **1990**, *41*, 85–97.
- [117] J. E. Stadler, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 22777–22780.
- [118] G. Piétu, A.-S. Ribba, G. Chérel, D. Meyer, *Biochem. J.* **1992**, *284*, 711–715.
- [119] B. R. Tomasini, D. F. Mosher, *Prog. Hemostasis Thromb.* **1990**, *10*, 269–305.
- [120] K. T. Preissner, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1991**, *7*, 275–310.
- [121] N. Nakashima, K. Miyazaki, M. Ishikawa, T. Yatohgo, H. Ogawa, H. Uchibori, I. Matsumoto, N. Seno, M. Hayashi, *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1120*, 1–10.
- [122] M. H. Helfrich, S. A. Nesbitt, E. L. Dorey, M. A. Horton, *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 335–343.
- [123] H. P. Erickson, M. A. Bourdon, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1989**, *5*, 71–92.
- [124] D. J. Leahy, W. A. Hendrickson, I. Aukjil, H. P. Erickson, *Science* **1992**, *258*, 987–991.
- [125] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Cell* **1986**, *44*, 517–518.
- [126] H. Mohri, T. Ohkubo, *Peptides* **1993**, *14*, 353–357.
- [127] J. R. Potts, I. D. Campbell, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 648–655.
- [128] A. L. Main, T. S. Harvey, M. Baron, J. Boyd, I. D. Campbell, *Cell* **1992**, *71*, 671–678.
- [129] M. Baron, A. L. Main, P. C. Driscoll, H. J. Mardon, J. Boyd, I. D. Campbell, *Biochemistry* **1992**, *31*, 2068–2073.
- [130] C. D. Dickinson, B. Veerapandian, X. P. Dai, R. C. Hamlin, N. H. Xuong, E. Ruoslahti, K. R. Ely, *J. Mol. Biol.* **1994**, *236*, 1079–1092.
- [131] D. J. Leahy, I. Aukhil, H. P. Erickson, *Cell* **1996**, *84*, 155–164.
- [132] I. D. Campbell, vorgestellt auf der XVII. International Conference of Magnetic Resonance in Biological Systems, Keystone, CO (USA), **1996**.
- [133] A. Stockmann, S. Hess, P. Declerk, R. Timpl, K. T. Preissner, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22874–22882.
- [134] M. Adler, R. A. Lazarus, M. S. Dennis, G. Wagner, *Science* **1991**, *253*, 445–448.
- [135] M. Adler, P. Carter, R. A. Lazarus, G. Wagner, *Biochemistry* **1993**, *32*, 282–289.
- [136] C. Dalvit, H. Widmer, G. Bovermann, R. Breckenridge, R. Metternich, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 315–321.
- [137] R. M. Cooke, B. G. Carter, D. M. A. Martin, P. Murray-Rust, M. P. Weir, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 323–328.
- [138] V. Saudek, R. A. Atkinson, P. Lepage, J. T. Pelton, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 329–338.
- [139] V. Saudek, R. A. Atkinson, J. T. Pelton, *Biochemistry* **1991**, *30*, 7369–7372.
- [140] Y. Chen, S. M. Pitzenberger, V. M. Garsky, P. K. Lumma, G. Sanyal, J. Baum, *Biochemistry* **1991**, *30*, 1625–1636.
- [141] R. A. Atkinson, V. Saudek, J. T. Pelton, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 563–572.
- [142] H. Senn, W. Klaus, *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 907–925.
- [143] M. Jesaja, K. J. Smith, X. Lu, J. A. Williams, H. Trayer, I. P. Trayer, E. I. Hyde, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 853–860.
- [144] M. J. Sutcliffe, M. Jesaja, E. I. Hyde, X. Lu, J. A. Williams, *Struct. Biol.* **1994**, *1*, 802–807.
- [145] R. S. McDowell, M. S. Dennis, A. Louie, M. Shuster, M. G. Mulkerrin, R. A. Lazarus, *Biochemistry* **1992**, *31*, 4766–4772.
- [146] A. M. Krelz, G. Wagner, J. Seymour-Ulmer, R. A. Lazarus, *Science* **1994**, *264*, 1944–1947.
- [147] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [148] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5985–5988.
- [149] K. N. Yamada, D. W. Kennedy, *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 29–36.
- [150] E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslahti, *Bio/Technology* **1995**, *13*, 265–270.
- [151] J. M. Healy, O. Murayama, T. Maeda, K. Yoshino, K. Sekiguchi, M. Kikuchi, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3948–3955.
- [152] F. Balkenhol, C. von dem Busche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436–2487; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288–2337.
- [153] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7294–7298.
- [154] R. F. Nutt, S. F. Brady, J. T. Sisko, T. M. Ciccarone, C. D. Colton, M. R. Levy, R. J. Gould, G. Zhang, P. A. Friedman, D. F. Veber, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 21th 1990* **1991**, 784–786.
- [155] F. E. Ali, R. Calvo, T. Romoff, J. Samanen, A. Nichols, B. Store in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Hrsg.: J. E. Rivier, G. R. Marshall), ECOM Science, Leiden (Niederlande), **1990**, S. 94–96.
- [156] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523.
- [157] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709–730.
- [158] Ein inzwischen klassisches Beispiel dafür ist das Cyclosporin, ein cyclisches Undecapeptid, das in verschiedenen Lösungsmitteln, im Kristall und bei der Bindung an den natürlichen Rezeptor Cyclophilin unterschiedliche Konformationen einnimmt.
- [159] H. Matter, G. Gemmecker, H. Kessler, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *45*, 430–440.
- [160] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167–339.
- [161] M. Kurz, Dissertation, Technische Universität München, **1991**.
- [162] R. Schwyzer, P. Sieber, B. Gorup, *Chimia* **1958**, *12*, 90–91.
- [163] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, A. Kling, M. Kottenhahn, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7550–7563.
- [164] H. Kessler, H. Matter, G. Gemmecker, M. Kottenhahn, J. W. Bats, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4805–4818.
- [165] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233–20238.
- [166] S. Cheng, W. S. Craig, D. Mullen, J. F. Tschopp, D. Dixon, M. D. Pierschbacher, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1–8.
- [167] K. D. Kopple, P. W. Baures, J. W. Bean, C. A. D'Ambrosio, J. L. Hughes, C. E. Peishoff, D. S. Eggleston, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9615–9623.
- [168] L.-H. Zhang, L. Anzalone, P. Ma, G. S. Kaufmann, L. Storace, R. Ward, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4455–4458.
- [169] W. H. Miller, T. W. Ku, F. E. Ali, W. E. Bondinell, R. R. Calvo, L. D. Davis, K. F. Erhard, L. B. Hall, W. F. Huffman, R. M. Keenan, C. Kwon, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, D. T. Takata, C.-K. Yuan, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9433–9436.
- [170] M. E. Duggan, A. M. Naylor-Olsen, J. J. Perkins, P. S. Anderson, C. T.-C. Chang, J. J. Cook, R. J. Gould, N. C. Ihle, G. D. Hartman, J. J. Lynch, R. J. Lynch, P. D. Manno, L. W. Schaffer, R. L. Smith, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3332–3341.

- [171] P. R. Bovy, F. S. Tjoeng, J. G. Rico, T. E. Rogers, R. J. Lindmark, J. A. Zablotski, R. B. Garland, D. E. McMackins, H. Dayringer, M. V. Tóth, M. E. Zupec, S. Rao, S. G. Panzer-Knolle, N. S. Nicholson, A. Salyers, B. B. Taite, M. Herin, M. Miyano, L. P. Feigen, S. P. Adams, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 881–895.
- [172] R. S. McDowell, B. K. Blackburn, T. R. Gadek, L. R. McGee, T. Rawson, M. E. Reynolds, K. D. Robarge, T. C. Somers, E. D. Thorsett, M. Tischler, R. R. Webb II, M. C. Venuti, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5077–5083.
- [173] R. S. McDowell, T. R. Gadek, P. L. Barker, D. J. Burdick, K. S. Chan, C. L. Quan, N. Skelton, M. Struble, E. D. Thorsett, M. Tischler, J. Y. K. Tom, T. R. Webb, J. P. Burnier, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5069–5076.
- [174] C. E. Peishoff, F. E. Ali, J. W. Bean, R. Calvo, C. A. D'Ambrosio, D. S. Eggleston, S. M. Hwang, T. P. Kline, P. F. Koster, A. Nichols, D. Powers, T. Romoff, J. Samanen, J. Stadel, J. A. Vasko, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3962–3969.
- [175] J. W. Bean, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5328–5334.
- [176] W. J. Hoekstra, P. J. Sanfilippo, *Chemtracts: Org. Chem.* **1993**, *6*, 104–107.
- [177] R. S. McDowell, T. R. Gadek, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9245–9253.
- [178] J. W. Bean, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 22th 1990* **1993**, 547–548.
- [179] P. N. Sanderson, R. C. Glen, A. W. R. Payne, B. D. Hudson, C. Heide, G. E. Tranter, P. M. Doyle, C. J. Harris, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1994**, *43*, 588–596.
- [180] S. Jackson, W. F. DeGrado, A. Dwivedi, A. Parthasarathy, A. Higley, J. Krywko, A. Rockwell, J. Markwalder, G. Wells, R. Wexler, S. Mousa, R. Harlow, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3220–3230.
- [181] L.-H. Zhang, P. Ma, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5765–5768.
- [182] C.-B. Xue, W. F. DeGrado, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 946–952.
- [183] 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.
- [184] R. Haubner, M. Gurrath, G. Müller, M. Aumailley, H. Kessler in *Prospects in Diagnosis and Treatment of Breast Cancer, Excerpta Medica International Congress Series* (Hrsg.: M. Schmitt, H. Greaff, G. Kindermann), Elsevier, Amsterdam, **1994**, S. 133–144.
- [185] A. Jonczyk, G. Hölzemann, B. Felding-Habermann, G. Melzer, B. Diefenbach, D. A. Cheresh, H. Kessler, M. Gurrath, G. Müller (Merck), EP-A 578 083-A2, **1993** [*Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 144169f].
- [186] A. Jonczyk, G. Hölzemann, B. Felding-Habermann, F. Rippmann, G. Melzer, B. Diefenbach, H. Kessler, R. Haubner, J. Wermuth (Merck), EP-A 596 350-A1, **1992** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 161376e].
- [187] A. Jonczyk, G. Hölzemann, B. Felding-Habermann, F. Rippmann, B. Diefenbach, H. Kessler, R. Haubner, J. Wermuth (Merck), DE-A 4 310 643-A1, **1994** [*Chem. Abstr.* **1995**, *122*, 188171f].
- [188] A. Jonczyk, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, R. Haubner, J. Wermuth (Merck), DE-A 4 415 310-A1, **1994** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 118006f].
- [189] A. Jonczyk, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Sutter, H. Kessler, M. A. Dechantsreiter (Merck), DE-A 19 534 177-A1, **1997**.
- [190] P. A. Bartlett, G. T. Shea, S. J. Telfer, S. Waterman in *Molecular Recognition: Chemical and Biochemical Problems* (Hrsg.: S. M. Roberts), Royal Society, Cambridge, **1989**, S. 182–196.
- [191] A. C. Bach II, J. R. Espina, S. A. Jachson, P. F. W. Stouten, J. L. Duke, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293–294.
- [192] G. Müller, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2767–2769.
- [193] K. Burgess, D. Lim, S. A. Mousa, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4520–4526.
- [194] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328–1335.
- [195] V. Prelog, H. Gerlach, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 2288–2294.
- [196] H. Gerlach, J. A. Owtschinnikow, V. Prelog, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 2294–2302.
- [197] R. M. Freidinger, D. F. Veber, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6129–6131.
- [198] D. F. Mierke, M. Kurz, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1042–1049.
- [199] M. Koppitz, M. Huenges, R. Gratias, H. Kessler, S. L. Goodman, A. Jonczyk, *Helv. Chim. Acta* **1997**, im Druck.
- [200] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, M. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [201] J. D. Dunitz, J. Waser, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 5645–5650.
- [202] I. L. Karle, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *28*, 420–427.
- [203] G. Quinkert, E. Egert, C. Griesinger, *Aspekte der Organischen Chemie*, VCH, Weinheim, **1995**, S. 203–226.
- [204] J. P. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2393–2400.
- [205] R. Haubner, R. Gratias, S. L. Goodman, H. Kessler in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Hrsg.: T. P. Kaumaya, R. S. Hodges), Mayflower, Kingswinford, **1996**, S. 205–206.
- [206] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [207] H. Kessler, G. Gemmecker, A. Haupt, M. Klein, K. Wagner, M. Will, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 745–759.
- [208] A. Geyer, G. Müller, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7735–7743.
- [209] D. G. Mullen, S. Cheng, S. Ahmed, J. M. Blevitt, D. Bonnin, W. S. Craig, R. T. Ingram, C. Mazur, R. Minasyan, J. O. Tolley, J. F. Tschopp, M. D. Pierschbacher in *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Hrsg.: T. P. Kaumaya, R. S. Hodges), Mayflower, Kingswinford, **1996**, S. 207–208.
- [210] M. K. Anwer, D. B. Sherman, A. F. Spatola, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 392–399.
- [211] M. Marraud, V. Dupont, V. Grand, S. Zerkout, A. Lecoq, G. Boussard, J. Vidal, A. Collet, A. Aubry, *Biopolymers* **1993**, *33*, 1135–1148.
- [212] S. J. Richman, M. Goodman, T. M.-D. Nguyen, P. W. Schiller, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1985**, *25*, 648–662.
- [213] A. Geyer, D. F. Mierke, C. Unverzagt, H. Kessler in *Peptides 1992* (Hrsg.: C. H. Schneider, A. N. Eberle), ESCOM Science, Leiden (Niederlande), **1993**, S. 599–600.
- [214] H. Kessler, B. Diefenbach, D. Finsinger, A. Geyer, M. Gurrath, S. L. Goodman, G. Hölzemann, R. Haubner, A. Jonczyk, G. Müller, E. Graf von Roedern, J. Wermuth, *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155–160.
- [215] M. A. Dechantsreiter, B. Mathä, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, vorgestellt auf dem 24th European Peptide Symposium, Edinburgh (Großbritannien), **1996**.
- [216] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, R. Timpl, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 341–343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 326–328.
- [217] Die Ausdrücke „starr“ und „flexibel“ werden bei Konformationsbeschreibungen häufig sehr unscharf benutzt. Die Rotationen um die Peptidbindungen, charakterisiert durch die  $\phi$ - und  $\psi$ -Winkel, haben im allgemeinen eine geringe Barriere, d. h. sie sind nicht gehindert. Wird in dem für Peptide typischen Ensemble von Konformationen eine Konformation energetisch bevorzugt und dominiert diese damit im Gleichgewicht, so spricht man von „der“ Konformation. Eine starke Dominanz dieser Konformation wird dann meist mit einer „starren Konformation“ gleichgesetzt.
- [218] G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, *1*, 3–12.
- [219] G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, *2*, 55–63.
- [220] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881–7891.
- [221] M. Feigel, G. Lugert, M. Bremer, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 367–373.
- [222] R. Haubner, Dissertation, Technische Universität München, **1995**.
- [223] J. L. Kofron, P. Kunic, V. Kishore, G. Gemmecker, S. W. Fesik, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2670–2675.
- [224] N. Greenspoon, R. Hershkovitz, R. Alon, D. Varon, B. Shenkman, G. Marx, S. Federman, G. Kapustina, O. Lider, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1001–1008.
- [225] J. Samanen, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 91–100.
- [226] R. D. Cousins, R. M. Keenan, W. H. Miller (SmithKline Beecham), WO-A 96/00574-A1, **1995** [*Chem. Abstr.* **1995**, *124*, 289585f].
- [227] F. Ali, W. Bondinell, W. F. Huffman, M. A. Lago, R. M. Keenan, C. Kwon, W. H. Miller, T. Nguyen, D. T. Takata (SmithKline Beecham), WO-A 96/00730-A1, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 289584f].
- [228] R. Keenan, W. Miller, F. Ali, L. Barton, B. Bondinell, J. Burgess, J. Callahan, R. Calvo, R. Cousins, M. Gowen, W. Huffman, S. Hwang, D. Jakas, T. Ku, C. Kwon, A. Lago, V. Momouyran, T. Hguyen, S. Ross, J. Samanen, D. Takata, I. Uzinskas, J. Venslavsky, A. Wong, T. Yellin, C. Yuan, *Abstr. Pap. 211th ACS National Meeting (New Orleans)*, **1996**, MEDI 236.
- [229] J. Samanen, persönliche Mitteilung (1996).
- [230] G. D. Hartman, M. E. Duggan, N. C. Ihle (Merck & Co, Inc.), WO-A 95/32710-A1, **1995** [*Chem. Abstr.* **1996**, *124*, 232066h].
- [231] O. Mehnich, G. Hessler, H. Kessler, M. Bernd, B. Kutscher, *Helv. Chim. Acta* **1997**, im Druck.