

Biomaterialien

Verbesserte Implantatmaterialien durch die Beschichtung mit hochspezifischen, nichtpeptidischen Integrinliganden**

Claudia Dahmen, Jörg Auernheimer, Axel Meyer,
Anja Enderle, Simon L. Goodman und Horst Kessler*

Bei medizinischen Implantaten spielt die Grenzfläche zwischen biologischem Gewebe und anorganischem Material

[*] Dr. C. Dahmen, Dipl.-Ing. J. Auernheimer, Dipl.-Chem. A. Meyer, Prof. Dr. H. Kessler

Department Chemie

Lehrstuhl Organische Chemie II

Technische Universität München

Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)

Fax: (+49) 89-289-13210

E-mail: kessler@ch.tum.de

Dr. A. Enderle

Biomet Merck BioMaterials GmbH

Forschung

Frankfurter Straße F129/250, 64271 Darmstadt (Deutschland)

Dr. S. L. Goodman

Merck KGaA

Oncology Research

Frankfurter Straße 250, 64271 Darmstadt (Deutschland)

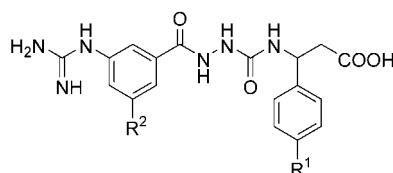
[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (SFB 563) und vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (03N4012) unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

eine entscheidende Rolle für ein erfolgreiches Einwachsen. Durch Modifikation der Implantatoberfläche wird daher versucht, eine stimulierte Zelladhäsion zu erreichen und damit die Biokompatibilität zu verbessern. In der Vergangenheit wurden zwar schon bemerkenswerte Verbesserungen in dieser Hinsicht erreicht, eine weitere Optimierung anhand folgender Kriterien ist jedoch noch immer notwendig: Effizienz der Zelladhäsion, Selektivität für bestimmte Zelltypen (z.B. Osteoblasten- gegen Blutplättchenadhäsion), Stabilität der Oberfläche unter physiologischen Bedingungen, einfache Handhabung unter sterilen Bedingungen und ein nicht zu hoher Preis für die Modifikation. Hier zeigen wir die Beschichtung von Titan, einem der am häufigsten verwendeten Implantatmaterialien, mit nichtpeptidischen und hoch α -selektiven Integrinliganden zur stimulierten Zelladhäsion.

Es ist seit längerem bekannt, dass die Osteoblastenadhäsion stimuliert werden kann durch Proteine der Extrazellulärmatrix (wie Fibronectin, Kollagen, Laminin und das Bone-Sialo-Protein),^[1] deren Fragmente oder durch RGD-Peptide,^[2] die sowohl an $\alpha\beta 3$ -Integrine der Osteoblasten als auch an das Blutplättchenintegrin $\alpha IIb\beta 3$ binden.^[3] Durch die Verwendung von optimierten, cyclischen Pentapeptiden kann eine Selektivität für $\alpha\beta 3$ erreicht werden.^[4-6] Mit der Beschichtung von Poly(methylmethacrylat) (PMMA) durch modifizierte cyclische Pentapeptide konnten wir *in vitro* die Adhäsion von Osteoblasten^[7] stimulieren und durch *In-vivo*-Experimente an Kaninchen die Knochenbildung in granuliertem PMMA nachweisen.^[8]

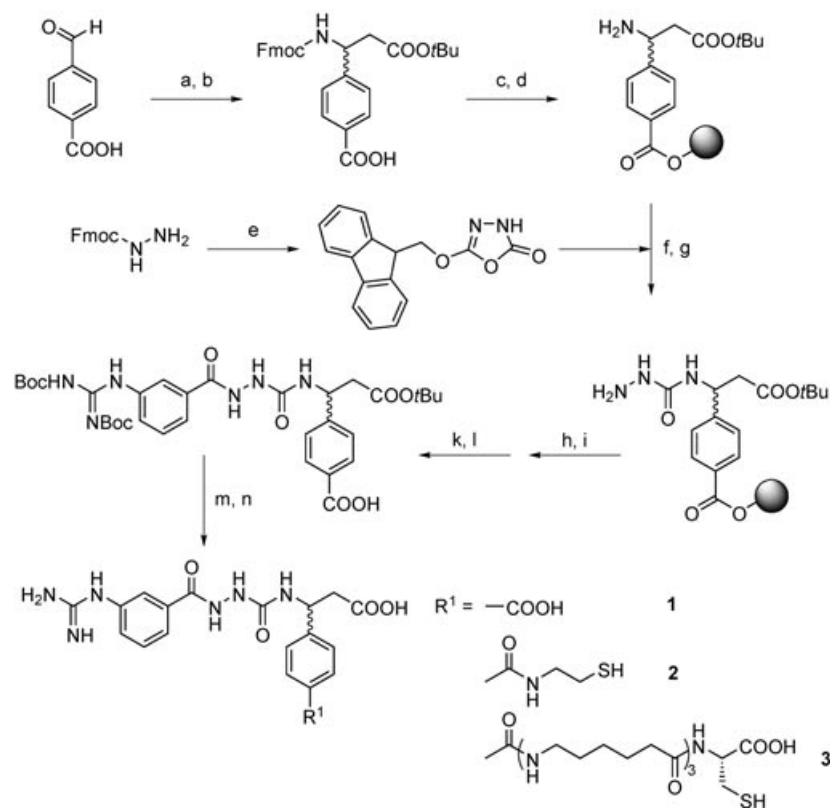
In der Vergangenheit wurden sowohl in unserer als auch in anderen Arbeitsgruppen eine Reihe α -selektiver, nicht-peptidischer RGD-Mimetika entwickelt,^[9-12] die als potenzielle Medikamente gegen Krebs, Osteoporose, akute Niereninsuffizienz, Restenose, rheumatoide Arthritis und Retinopathie eingesetzt werden können.^[13-18] Des Weiteren wurde kürzlich die Röntgenstruktur der Kopfgruppe des $\alpha\beta 3$ -Integrins mit dem cyclischen Peptid Cilengitide^[5] veröffentlicht.^[19] Basierend auf intensiven Molecular-Modeling-Studien zu möglichen Bindungsmodi der nichtpeptidischen $\alpha\beta 3$ -Liganden^[20] wurden Positionen für Ankergruppen identifiziert, die eine Anbindung der Liganden an Oberflächen ermöglichen, ohne die Integrinbindung zu stören. Da die Guanidin- und die Carboxygruppe der Liganden für die Bindung an die beiden Integrinuntereinheiten α bzw. $\beta 3$ essenziell sind,^[21] wählten wir die beiden Arene unserer hoch $\alpha\beta 3$ -selektiven Diacylhydrazin-Leitstruktur,^[10] um die Ankergruppen zu positionieren (Schema 1). Die beiden modifizierten Mimetika mit angedeuteten Ankern an R^1 bzw. R^2 wurden mit AutoDock3^[22,23] in die Röntgenstruktur des $\alpha\beta 3$ -Cilengitide-Komplexes^[19] eingepasst, nachdem daraus das



Schema 1. Substituierte, nichtpeptidische Diacylhydrazine mit den möglichen Ankerpositionen R^1 und R^2 für die Beschichtung von Oberflächen.

Peptid entfernt worden war. Es zeigte sich, dass die Bindungsmodi identisch mit denen der Mimetika ohne Anker ($R^1=R^2=H$) sind (Abbildung 1),^[20] außerdem konnten keine störenden Interaktionen der Anker mit dem Integrin festgestellt werden. Dies ermutigte uns zur Synthese beider Varianten mit verschiedenen Ankergruppen.

Die Synthesen wurden am Polystyrolträger mit Trityl-Anker (TCP-Harz) nach der Fmoc-Strategie (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) durchgeführt.^[9,10,24] An die am Harz immobilisierte β -Aminosäure wurde zunächst Fmoc-Hydrazin als Azaglycin-Precursor^[24] und anschließend 3-(N-Fmoc)-Aminobenzoësäure gekuppelt. Die Guanylgruppe wurde durch einen Überschuss an *N,N*-Bis(Boc)guanypyrazol eingeführt (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl; Schema 2). Nach dem Abspalten (Hexafluorisopropanol(HFIP)/CH₂Cl₂) wurde die Boc/OtBu-geschützte Verbindung in Lösung mit zwei Thiol-Ankern unterschiedlicher Länge – Cysteamin und 6-Aminohexanoyl-6'-aminohexanoyl-6"-aminohexanoylcystein – gekuppelt und mit Trifluoressigsäure (TFA) entschützt. Die Reinigung aller Verbindungen erfolgte mit Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP-HPLC). Die Affinität zu $\alpha\beta 3$ wurde für alle Mimetika, mit Anker (**2**, **3**) und ohne (**1**), mit einem etablierten IC₅₀-Assay^[10,25] überprüft.



Schema 2. Festphasensynthese von R¹-substituierten Diacylhydrazinen.

- a) 2 Äquiv. NH₂OAc, 1 Äquiv. Malonsäuremono-*tert*-butylester, EtOH;
- b) 1.05 Äquiv. Fmoc-Cl, NaHCO₃, Dioxan; c) TCP-Harz, CH₂Cl₂, DIPEA; d) 20% Piperidin in NMP; e) 3 Äquiv. COCl₂ (1.9 M Lösung in Toluol), ges. NaHCO₃, CH₂Cl₂,^[24] f) 4 Äquiv. 5-(9-*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-1,3,4-oxadiazol-2-(3 *H*)-on, DMF; g) 20% Piperidin in NMP; h) 2 Äquiv. 3-(N-Fmoc)-Aminobenzoësäure, 1.94 Äquiv. HATU, 22 Äquiv. Collidin, NMP; i) 20% Piperidin in NMP;
- k) 10 Äquiv. *N,N*-Bis(Boc)guanypyrazol, CHCl₃, 50°C; l) 20% HFIP in CH₂Cl₂; m) 1 Äquiv. Linkermolekül, 0.97 Äquiv. HATU, 1.1 Äquiv. HOAt, 11 Äquiv. Collidin, DMF; n) 50% TFA, 2% Triisopropylsilan,^[20] 2% Wasser in CH₂Cl₂.
DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin, DMF = Dimethylformamid.

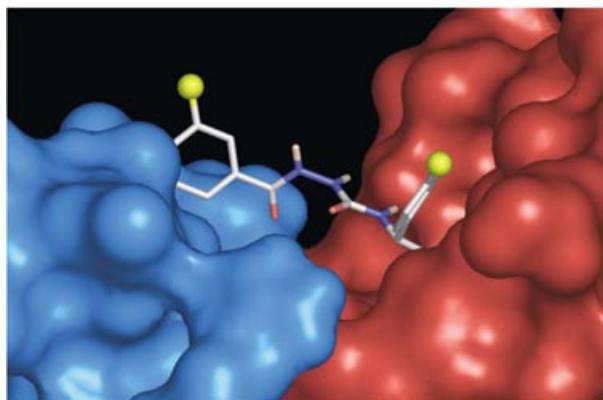
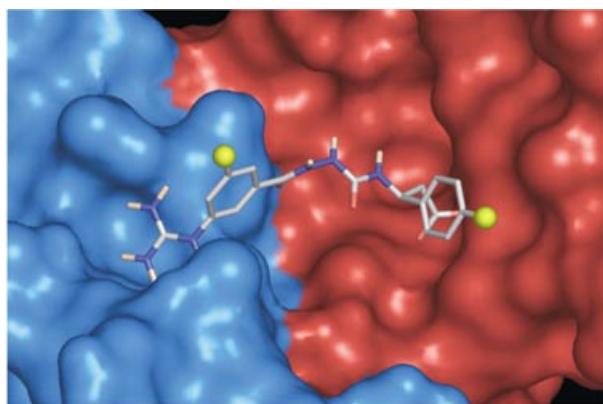


Abbildung 1. Ergebnisse der Andock-Studien: Zwei Diacylhydrazine mit Ankern an den aromatischen Resten (als gelbe Kugeln angedeutet) docken an die Kopfgruppe der $\alpha\beta 3$ -Integrinstruktur an.^[19]

Die Dicarboxyverbindung **1** erwies sich im nanomolaren Bereich als $\alpha\beta 3$ -Integrin-affin, wohingegen die Verbindungen mit Anker biselektiv für $\alpha\beta 3$ - und $\alpha\beta 6$ -Integre sind (Tabelle 1), wie es auch für andere Mimetika vom Diacylhydrazin-Typ beschrieben wurde.^[9]

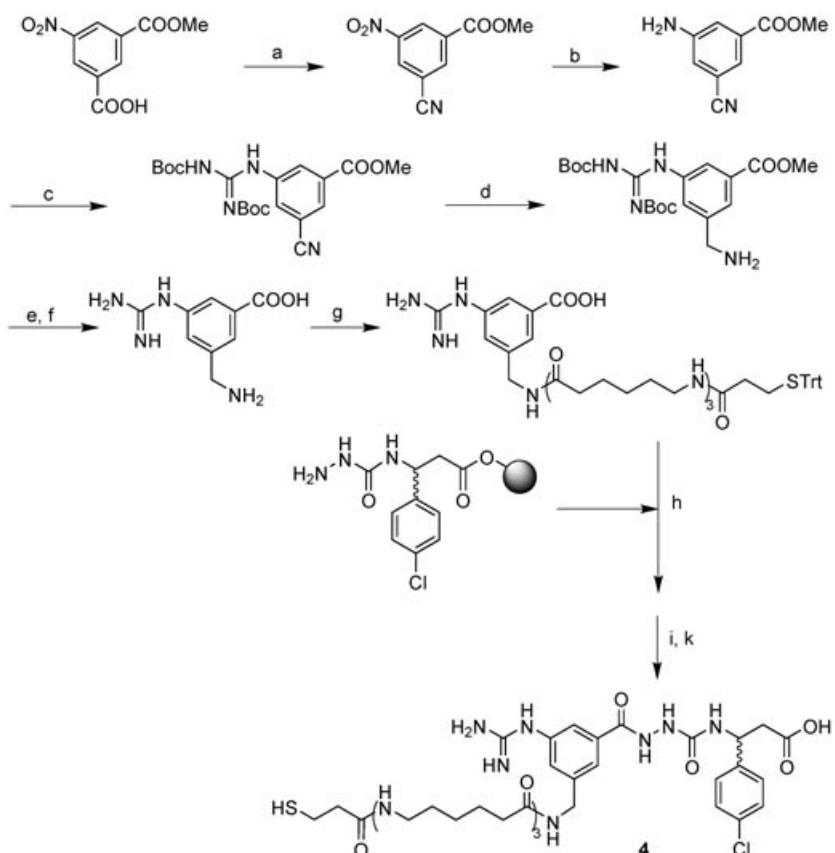
Für die hohe $\alpha\beta 3$ -Selektivität von **1** kommen sterische Effekte nicht infrage, da **2** und **3** sterisch ähnlich anspruchsvoll sind. In Übereinstimmung mit unseren theoretischen Untersuchungen an $\alpha\beta 5$ -Homologiemodellen^[26] können die Aminosäurereste Lys180 und Asp252 des SDL (selectivity determining loop) in der Nähe der MIDAS-Region des Integrins durch elektrostatische Wechselwirkungen zu einer Umorientierung des Liganden **1** in der Bindungstasche führen. Da sich in der $\beta 3$ -Untereinheit in diesem Bereich ungeladene Reste befinden, kann dies den starken Einfluss der Carboxygruppe in **1** auf die Affinität zu $\alpha\beta 3$ erklären.

4 mit dem Anker an R² wurde durch eine kombinierte Lösungs- und Festphasensynthese realisiert (Schema 3). Für den C-Terminus wurde Chlorphenyl-substituiertes β -Alanin gewählt, da dieses in sehr potenzen $\alpha\beta 3$ -Integrinliganden vorkommt.^[10] Eine reine Festphasensynthese gelang bei

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten der freien RGD-Mimetika zu verschiedenen Integrinen.

	Verbindung	IC ₅₀ [nM] ^[a] ; Inhibition bei Ligandenkonzentration [nM]				
R ¹	R ²	αvβ3	αvβ5	αvβ6	αIIbβ3	
1	COOH	H	16	10 ⁴ (65 %)	10 ³ (54 %)	10 ⁴ (22 %)
2	CONH-(CH ₂) ₂ -SH	H	5.7	200	0.24	3.20 × 10 ³
3	COAhx ₃ Cys ^[b]	H	0.72	310	2.35	3.15 × 10 ³
4	Cl	CH ₂ NHAhx ₃ - CO-(CH ₂) ₂ -SH ^[a]	0.84	245	0.089	4.15 × 10 ³
5 ^[10]	H	H	0.8	n. b. ^[c]	n. b. ^[c]	8500
6 ^[10]	Cl	H	0.1	n. b. ^[c]	n. b. ^[c]	5500
<i>cyclo</i> (-RGDfK[3-mercaptopropionyl]-) ^[28]		0.4	n. b. ^[c]	n. b. ^[c]	> 10 ⁴	

[a] Mittelwert mehrerer unabhängiger IC₅₀-Messungen; die durchschnittliche Fehlerbreite dieser Messungen liegt, wie bereits zuvor berichtet, im Bereich des Messwertes selbst.^[29] [b] Ahx: 6-Aminohexansäure. [c] n. b.: nicht bestimmt.



Schema 3. Synthese von R²-substituiertem Diacylhydrazin (4). a) 1.2 Äquiv. SO₂(NH₂)₂, 3.6 Äquiv. SOCl₂, Sulfolan, 42 h unter Rückfluss erhitzen; b) Pd/C, H₂, MeOH; c) 1 Äquiv. SC(NHBoc)₂, 4 Äquiv. NEt₃, 1.3 Äquiv. HgCl₂, MeOH; d) Pd/C, H₂ 20 bar, 2 M NH₃/EtOH, 50°C; e) 3 Äquiv. LiOH, MeOH/H₂O; f) 40% wässr. TFA (v/v); g) 1 Äquiv. Linkermolekül, 1 Äquiv. HATU, 1 Äquiv. HOAt, 10 Äquiv. Collidin, DMF; h) 1 Äquiv. HATU; i) 20% HFIP in CH₂Cl₂; k) 40% TFA, 2% Triisopropylsilan,^[30] 2% Wasser in CH₂Cl₂.

dieser Verbindung allerdings nicht: Das Kuppeln von mit *p*-Toluolsulfonsäure stabilisierter 3-Amino-5-(N-Fmoc)-(aminomethyl)benzoësäure und die anschließende Fmoc-Entschützung (nur mit 2% 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 2% Piperidin in *N*-Methylpyrrolidon (NMP) möglich) gelangen zwar, ϵ -(N-Fmoc)-Aminohexansäure konnte jedoch auch mithilfe diverser Kupplungsreagentien

nicht gekuppelt werden; dies könnte sterische Gründe haben. Deshalb wurde 3-Aminomethyl-5-guanidinobenzoësäure in Lösung mit 3-(S-Trt)-Mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx-OH (Trt = Trityl) verknüpft und das mit *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) voraktivierte Reaktionsprodukt an Harz gebundene 3-(4-Chlorphenyl)-3-[(Hydrazinocarbonyl)amino]propionsäure gekuppelt. Anschließend wurde das Produkt mit Hexafluorisopropanol(HFIP)/CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten, mit TFA/CH₂Cl₂ entschützt und mittels RP-HPLC gereinigt. Der so erhaltene Ligand **4** ist biselektiv für αvβ3/αvβ6 und zeigt eine Affinität im subnanomolaren Bereich.

Die Zelladhäsionseigenschaften auf Oberflächen wurden für **2–4** getestet. Die Thiol-Anker ermöglichen die Immobilisierung auf Titan, das oft als Implantatmaterial verwendet wird. MC3T3-E1-Mausosteoblasten, die das αvβ3-Integrin exprimieren,^[8] wurden auf die modifizierten Titanplättchen (Ti6Al4V, Ø 1 cm) aufgetragen, und nach 1 h wurde die Anzahl an adhärenen Zellen durch die Hexaminidaseaktivität bestimmt.^[27] In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Mausosteoblasten auf mit **2** oder **3** beschichteten Oberflächen adhären (Abbildung 2). Dabei konnte die Zelladhäsionsrate auf 42.9% (100 μM **3**) gegenüber 9.4% bei unmodifiziertem Titan erhöht werden und ist damit genauso gut wie bei Beschichtungen mit dem aus der Literatur bekannten Peptid *cyclo*(-RGDfK[3-mercaptopropionyl]-).^[28] Dass **2** etwas weniger aktiv ist, liegt wahrscheinlich daran, dass der Anker bedeutend kürzer und damit der Ligand für das Integrin nicht mehr so gut zugänglich ist. Auf mit **4** beschichteten Titanoberflächen konnte auch in wiederholten Tests keine Zelladhäsion stimuliert werden, obwohl die Verbindung im Bindungsassay an isoliertem αvβ3-Integrin (Tabelle 1) vergleichbare Aktivitäten zeigt. Der Grund könnte sein, dass der immobilisierte Ligand für das Integrin trotz seiner enormen Spacelänge ungünstig ausgerichtet ist. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass **4** nicht auf Titan immobilisiert wird, da wir in der Vergangenheit viele Peptid-Derivate von

cyclo(-RGDfK[3-mercaptopropionyl]-) getestet haben (nicht veröffentlichte Ergebnisse), die alle sehr gut auf Titan immobilisiert wurden (dies wurde sowohl mit ELISA- als auch mit Zelladhäsionsassays überprüft; die Ergebnisse sind hier nicht gezeigt). Im Falle der hier beschriebenen RGD-Mimetika konnte die Immobilisierung nicht über einen ELISA-Assay überprüft werden, da der verwendete Anti-

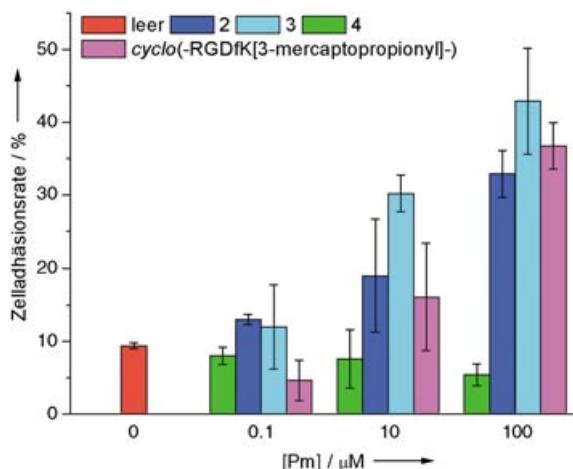


Abbildung 2. Adhäsion von MC3T3-E1-Mausosteoblasten auf unbeschichteten und beschichteten Titanoberflächen. Die Mittelwerte stammen von Dreifachmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. [Pm]: Mimetikakonzentration in der Beschichtungslösung

körper nur das cyclische RGD-Peptid erkennt und nicht das Mimetikum.

Mit **2** und **3** wurden die ersten nichtpeptidischen, α v-selektiven Integrinliganden für die Oberflächenbeschichtung gefunden. Sie stimulierten die Zelladhäsion von Osteoblasten auf Titan genauso gut wie *cyclo(-RGDfK[3-mercaptopropionyl]-)*, wobei sie verglichen mit dem Peptid stabiler gegen enzymatischen Abbau, pH-Änderungen und Hitze sowie weitaus billiger herzustellen sind.

Spektroskopische und analytische Daten von **1–4** sind in den Hintergrundinformationen erhältlich.

Eingegangen am 25. Mai 2004

Stichwörter: Materialien · Peptidmimetika · Titan · Zelladhäsion · Zellerkennung

- [1] J. M. Seeger, N. Klingman, *J. Surg. Res.* **1985**, *38*, 641–647.
- [2] A. Wierzba, U. Reichl, R. F. B. Turner, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn, *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*, 185–193.
- [3] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [4] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- [5] M. A. Dechantreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [6] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389.
- [7] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 587–590; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 560–562.
- [8] a) M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 107–114; b) U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [9] C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 169–173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 165–169.

- [10] G. A. G. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1938–1950.
- [11] G. Hölzemann, *IDrugs* **2001**, *4*, 72–81.
- [12] J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 1271–1279.
- [13] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453–464.
- [14] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931–10934.
- [15] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27–31.
- [16] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, P. K. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heering, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C.-K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 22–26.
- [17] M. W. Lark, G. B. Stroup, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, F. H. Drake, J. N. Bradbeer, A. Mathur, K. F. Erhard, K. A. Newlander, S. T. Ross, K. L. Salyers, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*, 612–617.
- [18] P. A. Burke, S. J. DeNardo, L. A. Miers, K. R. Lamborn, S. Matzku, G. L. DeNardo, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4263–4272.
- [19] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [20] L. Marinelli, A. Lavecchia, K.-E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393–4404.
- [21] K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3919–3927; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767–3774.
- [22] G. M. Morris, D. S. Goodsell, A. J. Olson, 3.0 beta ed., **1993**.
- [23] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639–1662.
- [24] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, H. Kessler, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7388–7394.
- [25] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 2717–2725.
- [26] L. Marinelli, K.-E. Gottschalk, A. Meyer, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4166–4177.
- [27] U. Landegren, *J. Immunol. Methods* **1984**, *67*, 379–388.
- [28] B. Jeschke, J. Meyer, A. Jonczyk, H. Kessler, P. Adamietz, N. M. Meenen, M. Kantlehner, C. Goepfert, B. Nies, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3455–3463.
- [29] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045–1051.
- [30] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739–2742.