

## Die gerüststarre Aminosäure $\beta$ -Acc verleiht Integrinliganden Aktivität und Selektivität\*\*

Sylwia Urman, Katharina Gaus, Yi Yang, Ulf Strijowski, Norbert Sewald,\* Silvia De Pol und Oliver Reiser\*

Wechselwirkungen zwischen der extrazellulären Matrix und Membranproteinen sind für Zelladhäsion, Gewebeformung und Signaltransduktion über die Zellmembran von Bedeutung. Wichtige Proteine für die Zelladhäsion sind die Integrine. Viele dieser Integrine, z. B.  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$ , erkennen die Tripeptidsequenz -Arg-Gly-Asp- (RGD) in ihren Liganden. Die Entdeckung der Rolle der RGD-Sequenz für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen hat zur Entwicklung einer großen Zahl von RGD-Peptiden und -Peptidmimetika für potenzielle therapeutische Anwendungen geführt. Lösliche Derivate solcher Verbindungen sind in der Lage, als kompetitive Inhibitoren die Wechselwirkung zwischen RGD enthaltenden Proteinen und den entsprechenden Integrinen zu unterbinden, während immobilisierte RGD-Peptide die Zellanbindung an künstliche Implantate unterstützen.<sup>[1]</sup>

Integrine spielen bei zahlreichen Krankheiten eine entscheidende Rolle: Integrin  $\alpha_v\beta_3$  fördert die Angiogenese, ein notwendiger Vorgang für Tumorwachstum und Metastasierung, reguliert die Adhäsion von Krebszellen und ist am Verlauf der Osteoporose beteiligt.<sup>[2]</sup> Integrin  $\alpha_5\beta_1$  ist zwar ebenfalls an der Angiogenese beteiligt, spielt aber vorwiegend bei entzündlichen Prozessen eine Rolle, etwa bei Asthma oder rheumatoider Arthritis.<sup>[3]</sup> Daher ist die Entwicklung neuer, peptidischer Liganden mit hoher Aktivität und Selektivität für die unterschiedlichen Subtypen der In-

tegrine eine bedeutende Aufgabe für Biochemie und medizinische Chemie.

Für das rationale Design biologisch aktiver Peptide ist die Voraussage ihrer dreidimensionalen Struktur notwendig. Das „räumliche Screening“ (spatial screening) von Peptiden und Peptidmimetika ist in diesem Zusammenhang ein wichtiges Konzept<sup>[4]</sup> und wird bei der Suche nach einer unbekannteren aktiven Konformation einer Erkennungssequenz eines Liganden angewendet. Räumliches Screening zur Entwicklung von Peptidliganden umfasst die Synthese einer Bibliothek von stereoisomeren Cyclopeptiden, wobei die Cyclisierung eine Einschränkung der Peptidkonformation bewirkt. Ein Erkennungsmotiv, z. B. die RGD-Sequenz, wird mit einem sekundärstrukturinduzierenden Molekülfragment, etwa einer D-Aminosäure,<sup>[4]</sup> einer N-Alkylaminosäure<sup>[5]</sup> oder einer  $\beta$ -Aminosäure<sup>[6]</sup> kombiniert.

Das cyclische Pentapeptid *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-), **1**, wurde von Kessler et al. im Rahmen des räumlichen Screenings als hoch aktiver und selektiver Ligand des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  entwickelt.<sup>[7,8]</sup> Der Austausch von Valin durch sein N-methyliertes Derivat führte zum Peptid *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-N(Me)-Val-), das noch höhere biologische Aktivität und Selektivität für Integrin  $\alpha_v\beta_3$  mit einem IC<sub>50</sub>-Wert im subnanomolaren Bereich aufweist.<sup>[9]</sup> Dieses Peptid wird gegenwärtig unter dem Namen Cilengitide als Tumortheraeutikum in klinischen Studien untersucht.<sup>[10,11]</sup>

Die Gegenwart von  $\beta$ -Aminosäuren stabilisiert ausgewählte Konformationen in Cyclopeptiden, wodurch eine entropiebedingt verbesserte Rezeptorbindung erreicht wird, solange die biologisch aktive Konformation noch zugänglich ist. Wenn in ein Cyclopentapeptid eine einzelne  $\beta$ -Aminosäure eingebaut wird, nimmt sie bevorzugt die zentrale Position einer  $\gamma$ -Schleife ein, die um eine Methyleinheit erweitert ist und daher Pseudo- $\gamma$ -Schleife ( $\Psi\gamma$ ) genannt wird.<sup>[6]</sup> Der konformative Einfluss einer  $\beta$ -Aminosäure kann sogar den einer D-Aminosäure übersteigen, weshalb  $\beta$ -Aminosäuren zunehmend als herausragende  $\gamma$ -Schleifenmimetika erkannt werden.<sup>[6]</sup>

Derivate von *cis*- $\beta$ -Aminocyclopropancarbonsäure ( $\beta$ -Acc)<sup>[12-15]</sup> haben sich als nützliche Bausteine zur Stabilisierung von Sekundärstrukturen in Peptiden erwiesen,<sup>[16]</sup> was für die Synthese von kurzen Neuropeptid-Y-Analoga mit hoher Affinität zum Rezeptorsubtyp Y<sub>1</sub> genutzt wurde.<sup>[17]</sup>  $\beta$ -Acc kann als Chimäre aufgefasst werden, die sich hinsichtlich ihrer konformativen Präferenz wie  $\beta$ -Aminosäuren und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken wie Methylaspartat verhält.

Wir stellen hier die Synthese, Untersuchung der biologischen Aktivität und Strukturbestimmung neuer Liganden des

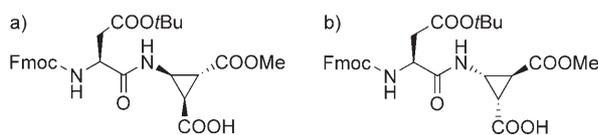
[\*] Dipl.-Chem. S. Urman, Dipl.-Chem. K. Gaus, MSc Y. Yang, Dr. U. Strijowski, Prof. Dr. N. Sewald  
Fakultät für Chemie  
Organische und Bioorganische Chemie  
Universität Bielefeld  
Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld (Deutschland)  
Fax: (+49) 521-106-8094  
E-Mail: norbert.sewald@uni-bielefeld.de  
Homepage: <http://www.uni-bielefeld.de/chemie/oc3neu>

Dr. S. De Pol, Prof. Dr. O. Reiser  
Institut für Organische Chemie  
Universität Regensburg  
Universitätsstraße 31, 93040 Regensburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 941-9434-121  
E-Mail: [oliver.reiser@chemie.uni-regensburg.de](mailto:oliver.reiser@chemie.uni-regensburg.de)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 613, RE-948-4/2), das EU-EST Netzwerk Peptide Foldamer (MEST-CT-2004-515968), die International NRW Graduate School in Bioinformatics and Genome Research an der Universität Bielefeld (Doktorandenstipendium für K.G.) und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.  $\beta$ -Acc =  $\beta$ -Aminocyclopropancarbonsäure.

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

Integrins  $\alpha_v\beta_3$  vor. Die Pentapeptide *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-(+)- $\beta$ -Acc-Val-) (**3**) und *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-(-)- $\beta$ -Acc-Val-) (**4**) enthalten die zueinander enantiomeren Bausteine (+)/(-)- $\beta$ -Acc in Nachbarschaft zum RGD-Motiv. Zelladhäsionstests zeigten eine hohe Affinität dieser neuen Peptide, deren Effizienz mithilfe einer Strukturanalyse im Rahmen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erklärt werden kann. Die linearen Peptide wurden durch Festphasensynthese nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie erhalten.<sup>[18]</sup> Die  $\beta$ -Acc-Derivate wurden dabei als Dipeptide (Abbildung 1) eingeführt.



**Abbildung 1.** Die in die cyclischen RGD-Peptide eingebauten Dipeptide Fmoc-Asp(O*t*Bu)-(+)- $\beta$ -Acc-OH (a) und Fmoc-Asp(O*t*Bu)-(-)- $\beta$ -Acc-OH (b).

Die biologische Aktivität der Peptide **1–4** wurde in Zelladhäsionsassays mit zwei Krebszelllinien untersucht. Die Adhäsion der K562- und WM115-Zellen an ihre Liganden Fibronectin und Vitronectin wird vorwiegend durch die Integrine  $\alpha_5\beta_1$  bzw.  $\alpha_v\beta_3$  vermittelt.<sup>[3]</sup> Die Fähigkeit der RGD-Peptide **3** und **4**, die Adhäsion von K562- und WM115-Zellen an ihre Liganden zu inhibieren, wurde mit der der zuvor beschriebenen Peptide *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) (**1**)<sup>[4]</sup> und *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val- $\beta$ -Ala-) (**2**)<sup>[3]</sup> verglichen (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** In Zelladhäsionstests mit WM115- und K562-Zellen bestimmte  $IC_{50}$ -Werte der Cyclopeptide.

Peptid	WM115, $\alpha_v\beta_3$ $IC_{50}$ <sup>[a]</sup> [ $\mu$ M]	K562, $\alpha_5\beta_1$ $IC_{50}$ <sup>[a]</sup> [ $\mu$ M]	K562/ WM115 <sup>[b]</sup>
<b>1</b>	0.2 (0.06)	18.5 (6.4)	92.5
<b>2</b>	1.4 (0.40)	9.1 (5.3)	6.5
<b>3</b>	0.02 (0.002)	1.5 (0.5)	75.0
<b>4</b>	0.6 (0.23)	1.8 (0.7)	3.0

[a] In Klammern ist die Standardabweichung gegeben. [b] Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte der Cyclopeptide aus den Testreihen mit K562 und WM115.

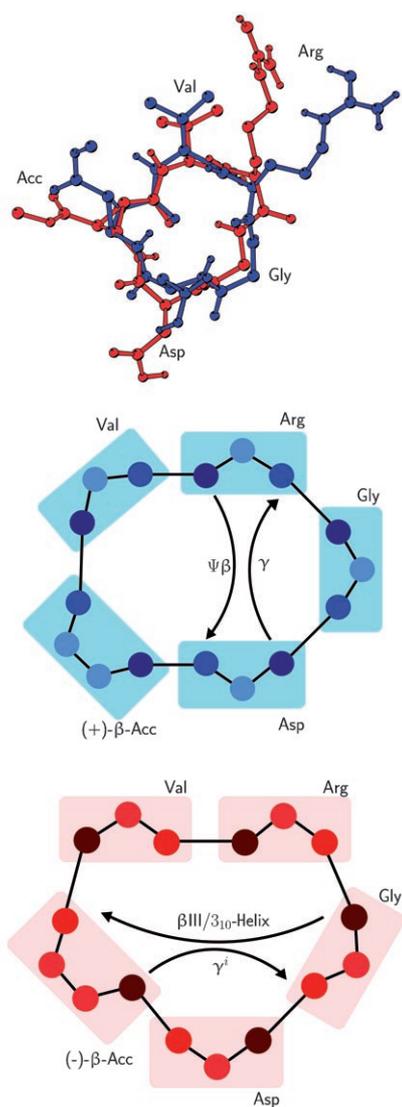
Das Referenzpeptid **1** inhibierte die Adhäsion von WM115-Zellen an Vitronectin mit  $IC_{50} = 0.2 \mu$ M, in guter Übereinstimmung mit den Daten von Aumailley et al. für die Inhibitionswirkung dieses Peptids.<sup>[7]</sup> Peptid **3**, das (+)- $\beta$ -Acc enthält, zeigte eine zehnfach erhöhte Affinität ( $IC_{50} = 20$  nM), während die Inhibitorwirkung des diastereomeren Peptids **4** ungefähr im gleichen Bereich wie die von **1** lag. Das Hexapeptid **2** dagegen hatte nur einen moderaten Einfluss auf die Adhäsion von WM115-Zellen an Vitronectin ( $IC_{50} = 1.4 \mu$ M).

Die durch Integrin  $\alpha_5\beta_1$  vermittelte Zelladhäsion von K562-Zellen an Fibronectin wurde durch die Peptide **3** und **4** mit  $IC_{50}$ -Werten von 1.5 bzw. 1.8  $\mu$ M nahezu gleich stark inhibiert. In diesem Assay waren beide Peptide **3** und **4** etwa

fünf- bis sechsmal aktiver als das Referenzpeptid **2**, das seinerseits doppelt so aktiv wie Peptid **1** war. Die Peptide **3** und **4** hatten einen stärkeren Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen Vitronectin und Integrin  $\alpha_v\beta_3$  als auf die Wechselwirkung zwischen Fibronectin und Integrin  $\alpha_5\beta_1$ . Das Verhältnis der  $IC_{50}$ -Werte aus beiden Tests (K562/WM115) sollte eine grobe Abschätzung der Selektivität der Peptide bezüglich der Integrine  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_v\beta_3$  ermöglichen. Die Peptide **1** und **3** zeigten eine höhere Selektivität zugunsten von Integrin  $\alpha_v\beta_3$ . Die signifikant erhöhte Affinität von **3** zu Integrin  $\alpha_v\beta_3$  muss eine Konsequenz der Einführung des rigiden  $\beta$ -Acc-Derivats sein, wobei **3** der bislang aktivste bekannte Ligand für das Integrin  $\alpha_v\beta_3$  ist.

Abstandsinformationen aus NOESY-Spektren wurden für Distanzgeometrierechnungen verwendet. Die dabei erhaltenen Strukturen wurden einem Clustering nach der Ähnlichkeit ihrer Rückgrattorsionswinkel unterzogen.<sup>[19]</sup> Für **3** und **4** wurde jeweils ein Cluster, der über 95% aller Strukturen umfasste, gefunden und nachfolgend als Startstruktur für Moleküldynamikrechnungen unter Berücksichtigung der experimentell ermittelten Abstandsinformationen genutzt (restrained MD). Erneutes Clustering der so erhaltenen Konformere nach ihren Rückgrattorsionswinkeln ergab für **3** einen Hauptcluster, der mehr als 87% der in der Trajektorie auftretenden Strukturen umfasste. Für **4** wurden zwei Cluster erhalten, von denen der dominierende 80% der in der Trajektorie auftretenden Strukturen enthielt. Die zentralen Strukturen der Hauptcluster für **3** und **4** (Abbildung 2) wurden als Startstrukturen in Rechnungen mit freier Moleküldynamik eingesetzt. Während das Rückgrat beider Peptide recht starr um die  $\beta$ -Acc-Reste blieb, wurde eine relativ hohe Dynamik in der RGD-Sequenz beobachtet, was auch von anderen cyclischen Pentapeptiden bekannt ist.<sup>[5]</sup> Aus diesem Grund basiert die hier vorgestellte Konformationsanalyse auf den Strukturen, die aus der Rechnung mit eingeschränkter Moleküldynamik (restrained MD) resultierten, da diese aus experimentellen Abstandswerten erhalten wurden.

Der Abstand zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Asp und Arg bestimmt, ob die RGD-Sequenz eher gestreckt oder geknickt ist. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass das RGD-Motiv in Peptidliganden von Integrin  $\alpha_v\beta_3$  eine geknickte Konformation mit einem Abstand zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Asp und Arg von ungefähr 650 pm einnimmt.<sup>[10]</sup> Da D-Aminosäuren die *i*+1-Position einer  $\beta$ II'-Schleife bevorzugen, nimmt die RGD-Sequenz von cyclischen Pentapeptiden wie *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-) eine geknickte Konformation mit Glycin in der zentralen Position einer  $\gamma$ -Schleife ein, wodurch hoch aktive Liganden des Integrins  $\alpha_v\beta_3$  mit einem Abstand von 668 pm zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Asp und Arg erhalten werden.<sup>[4,20]</sup> In dem bereits früher untersuchten Peptid *cyclo*-(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-) wurde Asparaginsäure in der zentralen Position der  $\gamma$ -Schleife gefunden. Bei diesem Peptid beträgt der Abstand zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Asp und Arg 905 pm. Daher ist in diesem Fall die RGD-Sequenz stärker gestreckt und das Peptid weniger aktiv und weniger spezifisch für  $\alpha_v\beta_3$ . Das Referenzpeptid **2** ist ebenfalls durch eine gestreckte RGD-Sequenz charakterisiert, mit 930 pm Abstand zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Asp und Arg,



**Abbildung 2.** Überlagerung (oben) und schematische Darstellungen (Mitte, unten) der Strukturen von **3** (blau) und **4** (rot), die durch Moleküldynamikrechnungen unter Berücksichtigung experimenteller Abstandsinformationen erhalten wurden;  $\Psi\beta$  = Pseudo- $\beta$ -Schleife; die Pfeile kennzeichnen Wasserstoffbrückenbindungen.

was gut mit der geringeren Affinität und Selektivität für  $\alpha_v\beta_3$  korreliert.

Durch die eingebauten  $\beta$ -Acc-Reste enthalten **3** und **4** konformativ stark eingeschränkte Aminosäuren. In der Struktur von **3** findet man Glycin in der zentralen Position einer  $\gamma$ -Schleife, wie auch aus den Torsionswinkeln abgelesen werden kann. Wegen der starren Cyclopropaneinheit muss der  $\mu$ -Winkel in (+)- $\beta$ -Acc nahezu null sein. (+)- $\beta$ -Acc besetzt die  $i + 1$ -Position einer Pseudo- $\beta$ -Schleife. In **4** ist Asp dagegen im Zentrum einer  $\gamma^i$ -Schleife positioniert. Diese Struktur hat die Torsionswinkel einer  $3_{10}$ -Helix zwischen den Aminosäuren (-)- $\beta$ -Acc und Gly, sodass eine Konformation resultiert, die früher als  $\beta$ III-Schleife bezeichnet wurde, mit Valin in der  $i + 1$ - und Arginin in der  $i + 2$ -Position.

Für **3** wird für die zentrale Struktur im Hauptcluster ein Abstand von 706 pm zwischen den  $C^\beta$ -Atomen von Asp und

Arg gefunden. Für **4** findet man einen signifikant größeren Abstand (826 pm), der auch fluktuiert im Verlauf der Trajektorie. Für die meisten Konformationen des Peptids **3** liegt dieser Abstand zwischen 600 und 800 pm, während er bei **4** zwischen 700 und 900 pm beträgt. Der Abstand der  $C^\alpha$ -Atome ist beim Peptid **3** ebenfalls kürzer als beim Peptid **4**. Während dieser Abstand für die Mehrheit der in der Trajektorie beim Peptid **3** auftretenden Strukturen zwischen 525 und 650 pm liegt, zeigen die meisten Strukturen von **4** Werte zwischen 600 und 700 pm. Dies lässt darauf schließen, dass die Konformation der RGD-Sequenz in **4** stärker gestreckt ist als in **3**. Im Peptid **3** befinden sich die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Schleife in der gleichen Position wie im hoch aktiven Peptid *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)*, obwohl sich der Typ der  $\beta$ -Schleife in den beiden Peptiden unterscheidet. Dagegen ist **4** ähnlich zu *cyclo(-Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val-)*, da es wie **2** eine stärker gestreckte RGD-Sequenz aufweist.

Zusammenfassend gelang uns die Synthese von zwei neuen Cyclopeptiden, die den rigiden Baustein  $\beta$ -Acc mit entgegengesetzter absoluter Konfiguration enthalten. Die hierdurch induzierten konformativen Einschränkungen führten zu einer erhöhten biologischen Aktivität gegenüber  $\alpha_v\beta_3$ . Das aktivere Diastereomer *cyclo(-Arg-Gly-Asp-(+)- $\beta$ -Acc-Val-)*, **3**, inhibiert die Bindung von Vitronectin an Integrin  $\alpha_v\beta_3$  mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 20 nM und ist damit zehnmal aktiver als das Referenzpeptid *cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-)*, **1**. Die Strukturanalyse zeigte, dass die RGD-Sequenz in **3** eine  $\gamma$ -Schleife mit Glycin in der zentralen Position einnimmt. Diese Befunde in Kombination mit den biologischen Tests bestätigen die bislang postulierten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, nach denen die gegenüber  $\alpha_v\beta_3$  aktivsten Peptide eine geknickte RGD-Sequenz aufweisen.

Eingegangen am 28. Dezember 2006,  
veränderte Fassung am 14. Februar 2007  
Online veröffentlicht am 30. März 2007

**Stichwörter:** Aminosäuren · Integrine · Konformationsanalyse · Peptide · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

- [1] 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.
- [2] A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2723–2747.
- [3] D. Zimmermann, E. Guthöhrlein, M. Malešević, K. Sewald, L. Wobbe, C. Heggemann, N. Sewald, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 272–276.
- [4] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389.
- [5] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172.
- [6] F. Schumann, A. Müller, M. Koksich, G. Müller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12009–12010.
- [7] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- [8] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921.
- [9] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.

- [10] E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechantsreiter, R. Haubner, H.-J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2868–2871; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2761–2764.
- [11] G. C. Tucker, *Curr. Oncol. Rep.* **2006**, *8*, 96–103.
- [12] C. Bubert, C. Cabrele, O. Reiser, *Synlett* **1997**, 827–829.
- [13] R. Beumer, C. Bubert, C. Cabrele, O. Vielhauer, M. Pietzsch, O. Reiser, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8960–8969.
- [14] R. Beumer, O. Reiser, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6497–6503.
- [15] C. Zorn, F. Gnad, S. Salmen, T. Herpin, O. Reiser, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7049–7053.
- [16] S. De Pol, C. Zorn, O. Zerbe, O. Reiser, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 517–520; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 511–514.
- [17] N. Koglin, C. Zorn, R. Beumer, C. Cabrele, C. Bubert, N. Sewald, O. Reiser, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 212–215; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 202–205.
- [18] M. M. Malešević, U. Strijowski, D. Bächle, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2004**, *112*, 73–77.
- [19] „Effiziente Konformationsanalyse von Peptiden“: E. W. Gutthöhrlein, Dissertation, Universität Bielefeld, **2006**.
- [20] G. Müller, M. Gurrath, H. Kessler, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709–730.
-