

# Die Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Peptiden durch multiple N-Methylierung: Somatostatin-Analoga\*\*

Eric Biron, Jayanta Chatterjee, Oded Ovadia, Daniel Langenegger, Joseph Brueggen, Daniel Hoyer, Herbert A. Schmid, Raz Jelinek, Chaim Gilon, Amnon Hoffman und Horst Kessler\*

Ralph Hirschmann gewidmet

Die geringe orale Bioverfügbarkeit von Peptiden beruht zum großen Teil auf der Inaktivierung im gastrointestinalem Trakt infolge verstärkten enzymatischen Abbaus durch eine ganze Reihe von Peptidasen in der (enterozytischen) Bürstensaummembran der Darmwand<sup>[1]</sup> und in der schlechten intestinalen Permeation.<sup>[2]</sup> Zusätzlich sorgt die Instabilität der Peptide gegen Peptidasen in der systemischen Blutzirkulation für eine schnelle Eliminierung (d.h. eine kurze Halbwertszeit). Daher sind Peptide in ihrer Anwendung als Arzneimittel meist auf die Klinik beschränkt. Verschiedene Strategien wurden verfolgt, um den enzymatischen Abbau zu reduzieren und die Aufnahme in den Blutkreislauf zu erreichen. Beispiele hierfür sind der Prodrug-Ansatz, Peptidomimetika und Strukturvariationen, wie die kovalente Verknüpfung mit Polyethylenglycol (PEG),<sup>[3]</sup> oder Lipiden,<sup>[4]</sup> aber auch chemische Modifikationen wie die Cyclisierung,<sup>[5]</sup> die Substitution mit D-Aminosäuren und die N-Methylierung.<sup>[6]</sup> Cyclische Peptide zeigen eine verbesserte chemische Stabilität und damit auch eine längere biologische Halbwertzeit als ihre linearen Analoga.<sup>[7]</sup> Allerdings sind weitere Modifikationen notwendig, um Peptide mit erhöhter enzymatischer Stabilität und verbesserter oraler Bioverfügbarkeit zu erhalten. Eine der vorgeschlagenen Techniken zur Steigerung enzymatischer Stabilität von Peptiden ist die N-Methylierung.<sup>[8,9]</sup> Wir entwickelten kürzlich eine vereinfachte Methode, die eine

schnelle und effiziente N-Methylierung von Peptiden in der Festphasensynthese ermöglicht.<sup>[10]</sup> Diese Synthesemöglichkeit erlaubte uns, den Einfluss einer multiplen N-Methylierung des Peptidrückgrates auf die Konformation des Peptidrückgrates und auf die biologische Aktivität zu untersuchen.<sup>[11,12]</sup>

Angesichts der Bioverfügbarkeit des hochgradig N-methylierten peptidischen Arzneimittels Cyclosporin A, das als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin verwendet wird, versuchten wir herauszufinden, ob der hohe Grad von N-Methylierung in Verbindung mit der Cyclisierung dafür verantwortlich ist, dass Cyclosporin oral verfügbar ist, obwohl es alle Lipinski-Regeln,<sup>[13]</sup> mit denen man gemeinhin orale Bioverfügbarkeit vorherzusagen bemüht ist, verletzt. Somit wären die oben erwähnten Nachteile der Peptide als Arzneimittel beseitigt, vorausgesetzt man kann die biologische Aktivität und die Rezeptorselektivität bewahren. Daher entschieden wir uns, die komplette Bibliothek aller möglichen N-methylierten Analoga des Veber-Hirschmann-Peptids zu durchmustern. Das Veber-Hirschmann-Peptid ist das cyclische Hexapeptid *cyclo*(-PFwKTF-) (**1**; Abbildung 1), das selektiv für die Somatostatinrezeptor-Subtypen sst2 und sst5 ist.<sup>[14]</sup> Octreotid (Sandostatin),<sup>[15]</sup> ein anderes synthetisches Somatostatin-Analogon mit ähnlichem Wirkspektrum, wird derzeit als Arzneimittel zur Therapie der Agromegalie und für die symptomatische Behandlung intestinaler endokriner Tumoren eingesetzt. Allerdings wird es wegen der geringen oralen Bioverfügbarkeit parenteral verabreicht. Die N-Methylierung von **1** führt zu 31 N-methy-

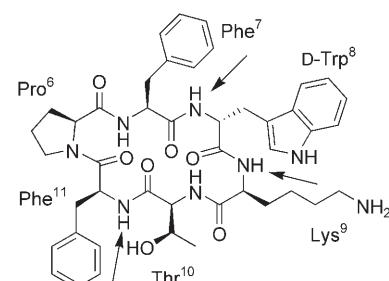
[\*] Dr. E. Biron, [+] J. Chatterjee, [+] Prof. H. Kessler  
CIPS am Department Chemie, Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747-Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 892-891-3210  
E-Mail: horst.kessler@ch.tum.de

O. Ovadia,<sup>[+]</sup> Prof. C. Gilon, Prof. A. Hoffman  
Department of Pharmaceutics and Organic Chemistry  
Hebrew University, Jerusalem (Israel)  
D. Langenegger, J. Brueggen, Prof. D. Hoyer, Prof. H. A. Schmid  
Novartis Institutes of Biomedical Research, Basel (Schweiz)  
R. Jelinek  
Department of Chemistry, Ben-Gurion University, Beersheba (Israel)

[+] Beide Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Wir danken der Humboldt-Stiftung und der Deutsch-Israelischen Stiftung für die Unterstützung; E.B. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Stipendium.

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



**Abbildung 1.** Das Veber-Hirschmann-Peptid, *cyclo*(-PFwKTF-) (**1**). Alle Peptidbindungen wurden N-methyliert. Die aktiven Analoga (siehe Tabelle 1) resultierten aus der N-Methylierung der Positionen, die durch Pfeile gekennzeichnet sind. Die Nummerierung entspricht der Nummerierung im nativen Somatostatin.

lierten Analoga (2<sup>5</sup>–1). Wir erhofften, dass die multiple N-Methylierung das cyclische Hexapeptid *cyclo*(-PFwKTF-) in ein biologisch aktives Analogon überführen könnte, das oral bioverfügbar ist.

Die Bibliothek der 30 (das fünffach N-methylierte Analoga konnte nicht erhalten werden) linearen N-methylierten Peptide wurde an fester Phase synthetisiert und anschließend in Lösung cyclisiert. Während die Synthese der linearen Peptide problemlos verlief, war die Cyclisierung der entscheidende Schritt. Alle Kopf-Schwanz-Cyclisierungen wurden am freien N-Terminus mit der Methode der „festen Base“ (Diphenylphosphorylazid (DPPA) und NaHCO<sub>3</sub>) erreicht.<sup>[16]</sup> Entscheidend für die Cyclisierungsausbeute ist auch die Wahl der Sequenz der linearen Vorstufe. Da die bekannte Struktur des Stammpeptids *cyclo*(-PFwKTF-) eine βII'-Schleife über D-Trp<sup>8</sup> und Lys<sup>9</sup> sowie eine βVI-Schleife über Phe<sup>11</sup> und Pro<sup>6</sup> enthält,<sup>[17]</sup> wurde Lys<sup>9</sup> als C-terminale Aminosäure in allen Fällen, in denen Thr<sup>10</sup> nicht N-methyliert war, an das Tritylchloridpolystyrol(TCP)-Harz geknüpft. Die Cyclisierung wird durch die Schleifenstruktur unterstützt, weil die C- und N-terminalen Enden sich trotz der dynamischen Struktur der linearen Vorstufe während der Cyclisierung annähern. Bei der Herstellung des Analogons **8** in größerer Menge ergab die Cyclisierung mit HATU/HOBt und Collidin exzellente Ausbeuten.<sup>[18]</sup>

In-vitro-Screening der N-methylierten cyclischen Hexapeptid-Bibliothek durch Bindung an alle fünf humanen SRIF-Rezeptor-Subtypen (hsst1–5) ergab, dass nur sieben Analoga mit ähnlicher Aktivität wie das ursprüngliche Peptid, d.h. im nanomolaren Bereich, selektiv an die Rezeptor-Subtypen hsst2 und hsst5 binden (Tabelle 1). Diese sieben erhaltenen

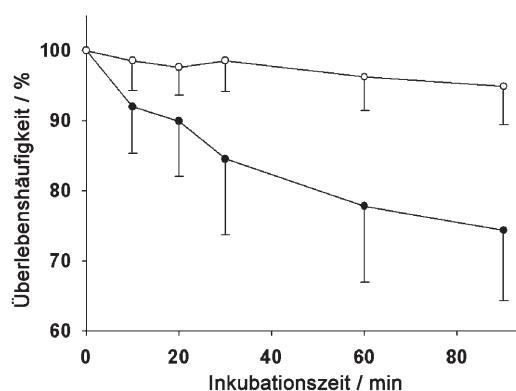
**Tabelle 1:** pK<sub>d</sub>-Werte für die N-methylierte Unterbibliothek (Peptide 1–8) und zum Vergleich für Octreotid gegen die Rezeptoren hsst2 und hsst5, die in CCL-39-Zellen exprimiert wurden. Gemessen wurde die Verdrängung des Radioliganden [<sup>125</sup>I]LTT-SRIF28.<sup>[19]</sup>

| Peptid    | N-methylierte Aminosäure                                  | hsst 2 (pK <sub>d</sub> ) | hsst 5 (pK <sub>d</sub> ) |
|-----------|---|---------------------------|---------------------------|
| Octreotid | –   | 9.18                      | 7.71                      |
| <b>1</b>  | –   | 8.01                      | 7.82                      |
| <b>2</b>  | Lys <sup>9</sup>  | 8.60                      | 8.19                      |
| <b>3</b>  | Phe <sup>11</sup>   | 7.93                      | 8.28                      |
| <b>4</b>  | D-Trp <sup>8</sup>  | 7.61                      | 7.87                      |
| <b>5</b>  | Lys <sup>9</sup> , Phe <sup>11</sup>                      | 7.96                      | 7.39                      |
| <b>6</b>  | D-Trp <sup>8</sup> , Lys <sup>9</sup>                     | 7.60                      | 7.19                      |
| <b>7</b>  | D-Trp <sup>8</sup> , Phe <sup>11</sup>                    | 7.16                      | 7.47                      |
| <b>8</b>  | D-Trp <sup>8</sup> , Lys <sup>9</sup> , Phe <sup>11</sup> | 7.21                      | 7.22                      |

Verbindungen wurden an Ratten verfüttert, um die Aufnahme in das Blut zu prüfen. Interessanterweise zeigten lediglich **1** und **8** eine signifikante Aufnahme ins Blut mit einer Plasmakonzentration von 242 ng mL<sup>-1</sup> nach 30 min und 151 ng mL<sup>-1</sup> nach 1 h für **8** im Vergleich zu 158 ng mL<sup>-1</sup> und 38 ng mL<sup>-1</sup> nach derselben Zeit für das Stammpeptid **1**. Daher entschieden wir uns, die pharmakologischen Eigenschaften und den Transport von **1** und **8** detaillierter zu untersuchen.

Die enzymatische Stabilität der Peptid-Unterbibliothek wurde im Rattenserum untersucht. Bei keinem der Peptide wurde nach 7 Stunden ein signifikanter Abbau beobachtet

(siehe Hintergrundinformationen). Zusätzlich zur Serumstabilität wurden die Analoga **1** und **8** auch auf ihre Stabilität im gastrointestinalen (GI) Trakt gegen Enzyme, die aus der Bürstensaummembran (Bürstensaummembranvesikel, BBMV) isoliert wurden, untersucht. Diese Enzyme enthalten eine Reihe von Peptidasen, die für die Verdauung von Peptiden und Proteinen in der Darmwand verantwortlich sind.<sup>[20]</sup> Sie können daher als In-vitro-Hilfsmittel dienen, um die Stabilität der Peptide im GI-Trakt zu untersuchen. Wie man in Abbildung 2 erkennen kann, wurde das nichtmethylierte Stammpeptid **1** durch die intestinalen Enzyme abgebaut. Nach 30 bzw. 90 Minuten Inkubation waren 15 bzw. 25 % des Peptids zerstört. Im Vergleich dazu war das Analogon **8** unter den Versuchsbedingungen über 90 Minuten stabil gegen enzymatischen Abbau.



**Abbildung 2:** Stabilität der Peptide **1** (●) und **8** (○) in Bürstensaummembranvesikeln (BBMVs). Die zu testenden Moleküle wurden mit gereinigten BBMVs gemischt und bei 37°C 90 Minuten inkubiert, *n*=4. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM ausgedrückt (SEM = Standardfehler des Mittelwerts). Die statistische Analyse ergab einen „student's t test“-Wert von *P*<0.05.

Die intestinale Permeabilität der Peptide wurde mit dem In-vitro-Modell Caco-2 bestimmt und mit Mannitol als Marker für parazelluläre Permeabilität verglichen. Die berechneten Permeabilitätskoeffizienten (*P* effektiv, *P*<sub>app</sub>) der getesteten Verbindungen sind in Abbildung 3 dargestellt. Die Permeabilitäten der Analoga **1–4**, **6** und **7** waren niedriger als 1 × 10<sup>6</sup> cm s<sup>-1</sup>. Das Analogon **5** erwies sich als besser (1.8 × 10<sup>6</sup> cm s<sup>-1</sup>), aber interessanterweise hatte **8** den höchsten *P*<sub>app</sub>-Wert (4 × 10<sup>6</sup> cm s<sup>-1</sup>), der sogar den von Mannitol übersteigt.

Um einen möglichen aktiven Transportmechanismus der Permeation zu überprüfen, wurde **8** auf die Permeabilität von der apikalen zur basolateralen Seite (A zu B) und in der umgekehrten Richtung (basolateral nach apikal, B zu A) untersucht (siehe Hintergrundinformationen). Es zeigte sich, dass die Permeabilitätsrate in beide Richtungen gleich war, weshalb ein aktiver Transport von **8** unwahrscheinlich ist.

Ein neuer kolorimetrischer Assay<sup>[21]</sup> wurde benutzt, um zu testen, ob die Peptide mit Doppelschichtliposomen als Modell für Zellmembranen interagieren. Vergleicht man die Analoga mit gleicher Zahl von N-Methylgruppen miteinander (Abbildung 4), so zeigt sich, dass die beiden Analoga **6** und **7** verstärkt (>85%), das Analogon **5** (<20%) jedoch

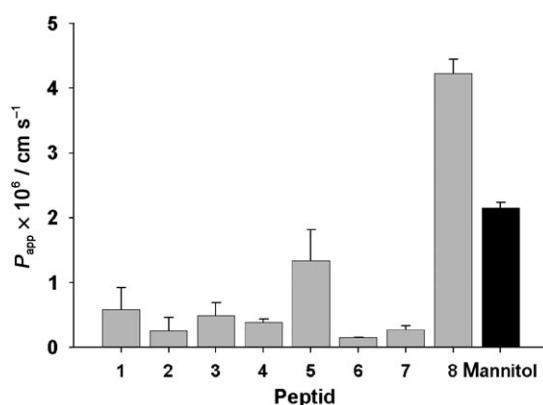


Abbildung 3. Permeabilitätskoeffizienten  $P_{app}$  der acht biologisch aktiven Analoga im Vergleich zu Mannitol (parazellulärer Marker) für Caco-2-Monoschichten.

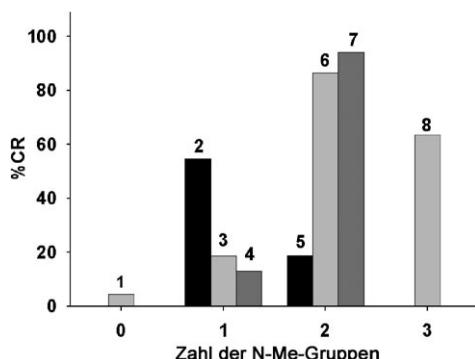


Abbildung 4. Der Einfluss der Position der N-Me-Gruppen auf die Interaktion der Peptide mit dem Modell der Zellmembran (% Zellantwort, CR). Die Analoga mit gleicher Zahl von N-Methylgruppen (eine Methylgruppe: Peptide 2–4, zwei Methylgruppen: Peptide 5–7) wurden zusammen mit 1 und 8 auf die Interaktion mit dem Modell der Liposomendoppelschicht getestet.

schwach mit der Vesikelmembran in Wechselwirkung treten. Analogon **1** zeigt vernachlässigbare Interaktion mit der Membran, ist also nicht in der Lage, durch die Modellmembrandoppelschicht zu dringen. **8** hingegen interagiert signifikant mit der Membran. Diese Ergebnisse belegen, dass es keine lineare Korrelation für die Interaktion mit der Membran (gemessen durch die Farbreaktion) mit steigender Zahl von N-Methylgruppen gibt, obwohl die lipophile Natur der Analoga, d.h. der *clogP*-Wert mit der Zahl der N-Me-Gruppen zunimmt. Anders gesagt belegen die Daten, dass bei gleicher Zahl von N-Methylgruppen deren Position wichtig ist (Abbildung 4).

Die pharmakokinetischen Parameter der Analoga **1** und **8** unterscheiden sich signifikant: Sie zeigen einen fünfzehnmaligen Unterschied in der Eliminierungshalbwertszeit ( $15.5 \pm 2$  bzw.  $74 \pm 6$  min) und einen zehnfachen Unterschied im Verteilungsvolumen im Gleichgewicht ( $V_{ss}$ ,  $0.3 \pm 0.1$  bzw.  $3.7 \pm 1.3 \text{ L kg}^{-1}$ ). Zusätzliche markante Unterschiede werden auch bei der oralen Gabe von **1** und **8** gefunden. Bei einer um eine Größenordnung höheren oralen Gabe der Peptide als bei intravenöser (i.v.) Verabreichung (d.h.  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  anstelle von  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), konnte Peptid **1** nur in einer von vier Ratten

überhaupt nachgewiesen werden, weswegen ein pharmakokinetisches Profil für die orale Gabe von **1** nicht erstellt werden konnte. Andererseits war es mit der selben Dosierung bei **8** möglich, ein volles Profil der zeitabhängigen Konzentration im Blut zu erstellen (Abbildung 5). Die berechnete absolute orale Verfügbarkeit des Analogs **8** war 9.9 %.

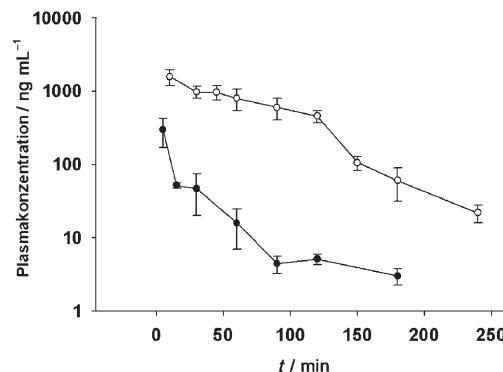


Abbildung 5. Plasmakonzentrations-Zeit-Profil (Mittel  $\pm$  SEM) nach oraler (○,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) und intravenöser (●,  $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) Verabreichung von **8**,  $n=4$ .

Die Bedeutung der N-Methylierung wurde in zwei biologischen Medien, Blut und Darmwand (BBMs), untersucht, die unterschiedliche Arten von peptidspaltenden Enzymen enthalten. Das pharmakokinetische Verhalten der bioaktiven Peptide im Körper wird durch diese Enzyme entscheidend bestimmt. Die Peptide erwiesen sich als im Blutserum der Ratte stabil. Das war zu erwarten, da ja alle acht Peptide klein und cyclisch sind<sup>[22,23]</sup> und die Enzyme im Serum nur begrenzte Diversität haben. Andererseits zeigt sich bei der Wirkung der gereinigten Enzyme der Bürstensaummembran auf die beiden Extremfälle – das nichtmethylierte Peptid **1** und das trimethylierte Peptid **8** –, dass die N-Methylierung einen großen Beitrag zur Stabilität von **8** liefert. Diese Beobachtung könnte auch die hohe Stabilität von Cyclosporin A im humanen Serum erklären,<sup>[24]</sup> die sich durch die relativ lange biologische Halbwertszeit von 6.2 Stunden im Menschen zu erkennen gibt.<sup>[25]</sup> Cyclosporin A ist ähnlich wie **8** cyclisch, vielfach N-methyliert und zeigt ebenfalls metabolische Stabilität gegen die aggressiven Enzyme der Darmwand. Die enzymatische Stabilität wird wahrscheinlich durch den synergistischen Effekt von Cyclisierung und mehrfacher N-Methylierung bewirkt.

Ein weiterer Faktor, der die orale Verfügbarkeit von Peptiden begrenzt, ist die Permeation durch die Darmwand. In Fällen, in denen die Substanzen nicht aktiv transportiert werden, können sie durch passiven Diffusionsmechanismus entweder durch die Zellmembran (transzellulär) oder zwischen den Enterozyten (parazellulärer Weg) eindringen. Hydrophile Moleküle bevorzugen den parazellulären Weg, um die intestinale Barriere zu überschreiten, während lipophile Moleküle transzellulär aufgenommen werden.<sup>[26]</sup> Dieser Weg ermöglicht wegen der im Vergleich zum parazellulären Weg deutlich größeren Oberfläche einen intensiven Fluss.<sup>[27]</sup> Es wurde vermutet, dass bei zunehmender Lipophilie der

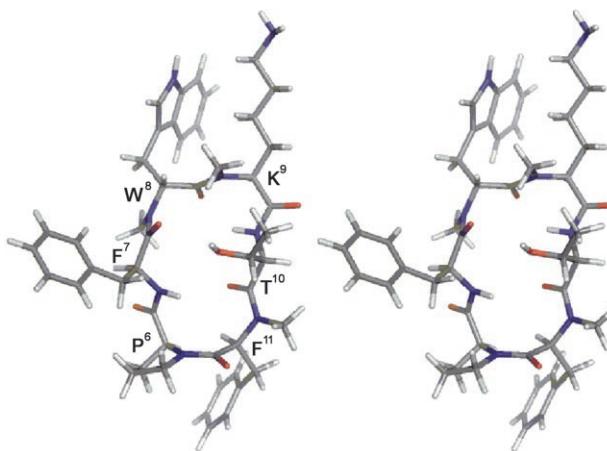
Peptide die Permeabilität aufgrund der transzellulären Absorption verbessert werden könnte.<sup>[28]</sup> Ein möglicher Ansatz, um gesteigerte Lipophilie zu erhalten, besteht in multipler N-Methylierung. Auf diese Weise könnten die strukturellen Änderungen eine mögliche Verschiebung von parazellulärem hin zu einem transzellulären Absorptionsmechanismus erzeugen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen des Caco-2-Permeabilitätsmodells, zeigten alle Peptide außer Peptid **8**  $P_{app}$ -Werte, die niedriger oder ähnlich groß wie der  $P_{app}$ -Wert von Mannitol, einem Marker für parazellulären Transport, waren. Trotzdem war der Permeabilitätskoeffizient von **8** signifikant höher als der des nicht N-methylierten Analogons **1** (68% Steigerung), was vermuten lässt, dass multiple N-Methylierung die intestinale Permeabilität selbst in der wässrigen Umgebung der Poren in den „tight junctions“, in denen der parazelluläre Transport erfolgt, erhöht. Die Möglichkeit auf erhöhte Permeation aufgrund von aktiven Transportmechanismen von **8** konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass kein Unterschied zwischen der Permeationsrate des Peptids gefunden werden konnte, wenn es von der apicalen zur basolateralen Seite oder umgekehrt gemessen wurde (siehe Hintergrundinformationen).

Um modellabhängige Ergebnisse ausschließen zu können, wurden zusätzliche In-vitro-Methoden wie MDCK-Zellen<sup>[29]</sup> und „side by side“-Diffusionskammern<sup>[30]</sup> verwendet, um die Transportcharakteristika von **8** zu bestätigen. Der Permeabilitätskoeffizient, der in diesen Modellen gefunden werden konnte, war in derselben Größenordnung wie beim parazellulären Transport (Daten nicht gezeigt).

Die Analoga **1** und **8** wurden bezüglich ihrer oralen Bioverfügbarkeit *in vivo* bei i.v.- und p.o.-Gabe an Ratten untersucht (Abbildung 5). Während das Veber-Hirschmann-Peptid nicht oral verfügbar war, betrug die absolute orale Bioverfügbarkeit des N-methylierten Peptids **8** ungefähr 10% der verabreichten Dosis. Zusätzlich wurden auch Veränderungen in anderen pharmakokinetischen Parametern gefunden. Das höhere Verteilungsvolumen von **8** gegenüber **1** (3.7 bzw. 0.3 L kg<sup>-1</sup>) lässt vermuten, dass **8** mit den biologischen Membranen interagieren kann, während die Verteilung von **1** auf das Blut und die interstitielle Flüssigkeit beschränkt ist. Ein Unterschied wurde auch in der Halbwertszeit von **1** und **8** im Plasma gefunden, der auf eine Verminderung des proteolytischen Abbaus oder der hepatischen und/oder renalen Ausscheidung zurückgeführt werden kann. Der transzelluläre Transport umfasst eine Wechselwirkung des Moleküls mit der hydrophoben Membran und die anschließende Durchquerung der apikalen und basolateralen Membranen, um schließlich in den Blutkreislauf zu gelangen. Tatsächlich konnte eine gesteigerte Wechselwirkung der N-methylierten Peptide mit einem Modell der Zellmembran beobachtet werden (Abbildung 4). Bis jetzt ist dieses liposomale Modell jedoch darauf beschränkt, die Wechselwirkung mit der Membran zu untersuchen, was eine obligatorische aber nicht ausschließliche Bedingung ist, die Membran zu durchqueren. Die im Membran-Vesikel-Modell beobachtete verstärkte Wechselwirkung von **8** könnte erklären, warum **8** im Vergleich zu **1** im In-vitro-Permeabilitätsmodell nur eine begrenzte Zunahme der Absorption und ein gestiegenes Verteilungsvolumen zeigt. Die Tatsache, dass Peptide mit glei-

cher Zahl von N-Methylgruppen unterschiedlich mit der liposomalen Membran interagieren, zeigt, dass zusätzliche Faktoren einschließlich der Konformation die Interaktion beeinflussen.

Es ist interessant festzustellen, dass in allen sieben bioaktiven Analoga der Unterbibliothek die  $\beta$ II'- und die  $\beta$ VI-Schleifen erhalten sind. Dies gilt sogar für die Tris-N-Methylverbindung (siehe das Analogon **8**, Abbildung 6), was mit früheren Resultaten übereinstimmt, in denen diese zwei Schleifen das Peptid in der bioaktiven Konformation halten.<sup>[17]</sup>



**Abbildung 6.** Stereodarstellung von cyclo(-PFMewMeKTMef-) (**8**), bestimmt durch NMR-Spektroskopie und Moleküldynamikrechnungen (siehe Hintergrundinformationen).

Generell beobachteten wir eine steigende Bindungsaffinität, wenn das Molekül MeLys<sup>9</sup> enthält, während durch Me-D-Trp<sup>8</sup> oder MePhe<sup>11</sup> die Aktivität sinkt. Die geringen Änderungen der Aktivität können durch eine Konformationsanalyse dieser Analoga erklärt werden. Goodman et al. schlugen eine gebogene Konformation des Peptids als bioaktive Konformation vor, die durch zwei zusätzliche  $\gamma$ -Schleifen um Phe<sup>7</sup> und Thr<sup>10</sup> stabilisiert wird.<sup>[31]</sup> Die gebogene Konformation kann sich mit den Resten Lys<sup>9</sup>, D-Trp<sup>8</sup> und Phe<sup>11</sup> tief in den Rezeptor einschieben. Die N-Methylierung von Lys<sup>9</sup> verstärkt die Stabilität der gebogenen Konformation mit reduzierter Flexibilität um die  $\beta$ II'-Schleife und resultiert in einem potenteren Analogon. N-Methylierung an D-Trp<sup>8</sup> oder Phe<sup>11</sup> vermindert die Aktivität durch den Verlust der Stabilisierung der  $\gamma$ -Schleifen. In diesem Zusammenhang ist es interessant zu sehen, dass das Me-D-Trp<sup>8</sup>-Analogon weniger aktiv ist als das MePhe<sup>11</sup>-Analogon. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die räumliche Orientierung von Phe<sup>11</sup> von Bedeutung ist. Obwohl bei der N-Methylierung von Phe<sup>11</sup> die gebogenen Konformation, bei der der Phenylring tief in den Rezeptor eingebettet wird, weniger günstig ist, behält die Verbindung ihre biologische Aktivität in der Größenordnung der Stammverbindung bei. Das zeigt, dass die multiple N-Methylierung auch zur Aufklärung feiner Details der bioaktiven Konformation herangezogen werden kann.<sup>[12]</sup>

Um die Bedeutung des Restes Phe<sup>11</sup> für die biologische Aktivität zu untersuchen, haben wir das zu **8** epimere Ana-

logen *cyclo*(-PFMewMeKTMef-) synthetisiert, in dem MePhe<sup>11</sup> durch das enantiomere D-MePhe<sup>11</sup> ersetzt wurde. Im Unterschied zu **8** weist dieses Peptid eine *trans*-Peptidbindung auf, die zur Bildung einer  $\beta$ II-Schleife anstelle der  $\beta$ VI-Schleife um Phe<sup>11</sup> und Pro<sup>6</sup> führt, wodurch das tiefe Ein dringen des Phenylringes in den Rezeptor und damit die Aktivität verloren gehen. Auch die Membranpermeabilität dieser Verbindung geht im Vergleich zu **8** verloren. Daraus schließen wir, dass Phe<sup>11</sup> und seine Umgebung nicht nur für die biologische Aktivität, sondern auch für die Bioverfügbarkeit von Bedeutung sind.

Insgesamt haben wir nachgewiesen, dass die multiple N-Methylierung die intestinale Permeabilität und die enzymatische Stabilität beeinflusst. Eine Verbesserung dieser Eigenschaften ist der Schlüssel zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Peptiden. Wie unsere Ergebnisse zeigen, kann die multiple N-Methylierung die biologische Verfügbarkeit ohne Veränderung der biologischen Aktivität und Selektivität verbessern. Dies könnte von großer Bedeutung für die Pharmaentwicklung sein, weil so ein einfacher Zugang zur Entwicklung oral verfügbarer peptidischer Arzneimittel zur Verfügung st nde.

Eingegangen am 18. Dezember 2007  
Online veröffentlicht am 22. Februar 2008

**Stichwörter:** Bioverfügbarkeit · Cyclische Peptide · N-Methylierung · Peptidische Wirkstoffe · Somatostatin

- [1] J. F. Woodley, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1994**, *11*, 61–95.
- [2] N. Salamat-Miller, T. P. Johnston, *Int. J. Pharm.* **2005**, *294*, 201–216.
- [3] M. J. Roberts, M. D. Bentley, J. M. Harris, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 459–476.
- [4] N. Flinn, I. Hussain, A. Shaw, P. Artursson, W. A. Gibbons, I. Toth, *Int. J. Pharm.* **1996**, *138*, 167–174.
- [5] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 703–703; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523.
- [6] C. Gilon, M. A. Dechantsreiter, F. Burkhardt, A. Friedler, H. Kessler in *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry* (Hrsg.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Thieme, Stuttgart, **2002**, S. 215–291.
- [7] J. Samanen, F. Ali, T. Romoff, R. Calvo, E. Sorenson, J. Vasko, B. Storer, D. Berry, D. Bennett, M. Strohsacker, D. Powers, J. Stadel, A. Nichols, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3114–3125.
- [8] J. Yu, E. R. Butelman, J. H. Woods, B. T. Chait, M. J. Kreek, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *280*, 1147–1151.
- [9] W. L. Cody, J. X. He, M. D. Reily, S. J. Haleen, D. M. Walker, E. L. Reyner, B. H. Stewart, A. M. Doherty, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2228–2240.
- [10] E. Biron, J. Chatterjee, H. Kessler, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 213–219.
- [11] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172.
- [12] J. Chatterjee, O. Ovadia, G. Zahn, L. Marinelli, A. Hoffman, C. Gilon, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5878–5881.
- [13] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [14] D. F. Veber, R. M. Freidinger, D. S. Perlow, W. J. Paleveda, F. W. Holly, R. G. Strachan, R. F. Nutt, B. H. Arison, C. Homnick, W. C. Randall, M. S. Glitzer, R. Saperstein, R. Hirschmann, *Nature* **1981**, *292*, 55–58.
- [15] G. Weckbecker, I. Lewis, R. Albert, H. A. Schmid, D. Hoyer, C. Bruns, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 999–1017.
- [16] S. F. Brady, S. L. Varga, R. M. Freidinger, D. A. Schwenk, M. Mendlowski, F. W. Holly, D. F. Veber, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3101–3105.
- [17] H. Kessler, M. Bernd, H. Kogler, J. Zarbock, O. W. Sorensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6944–6952.
- [18] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. W. Zhang, Y. S. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mugge, H. Wenschuh, K. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457–461; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441–445.
- [19] J. P. Hannon, C. Pertucci, D. Fehlmann, C. Viollet, J. Epelbaum, D. Hoyer, *Neuropharmacology* **2002**, *42*, 396–413.
- [20] R. Holmes, R. W. Lobley, *Gut* **1989**, *30*, 1667–1678.
- [21] S. Kolusheva, L. Boyer, R. Jelinek, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 225–227.
- [22] R. Tugyi, G. Mezo, E. Fellinger, D. Andreu, F. Hudecz, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 642–649.
- [23] G. Byk, D. Halle, I. Zeltser, G. Bitan, Z. Selinger, C. Gilon, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3174–3178.
- [24] J. M. Hows, J. M. Smith, *J. Clin. Pathol.* **1983**, *36*, 720–721.
- [25] L. Sangalli, A. Bortolotti, L. Jiritano, M. Bonati, *Drug Metab. Dispos.* **1988**, *16*, 749–753.
- [26] K. Zheng, M. Trivedi, T. J. Sahaan, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 2813–2824.
- [27] A. Fasano, *Mol. Genet. Metab.* **1998**, *64*, 12–18.
- [28] G. T. Knipp, D. G. V. Velde, T. J. Sahaan, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1332–1340.
- [29] J. D. Irvine, L. Takahashi, K. Lockhart, J. Cheong, J. W. Tolan, H. E. Selick, J. R. Grove, *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 28–33.
- [30] H. Lennernas, *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 403–410.
- [31] Y. B. He, Z. W. Huang, K. Raynor, T. Reisine, M. Goodman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8066–8072.