

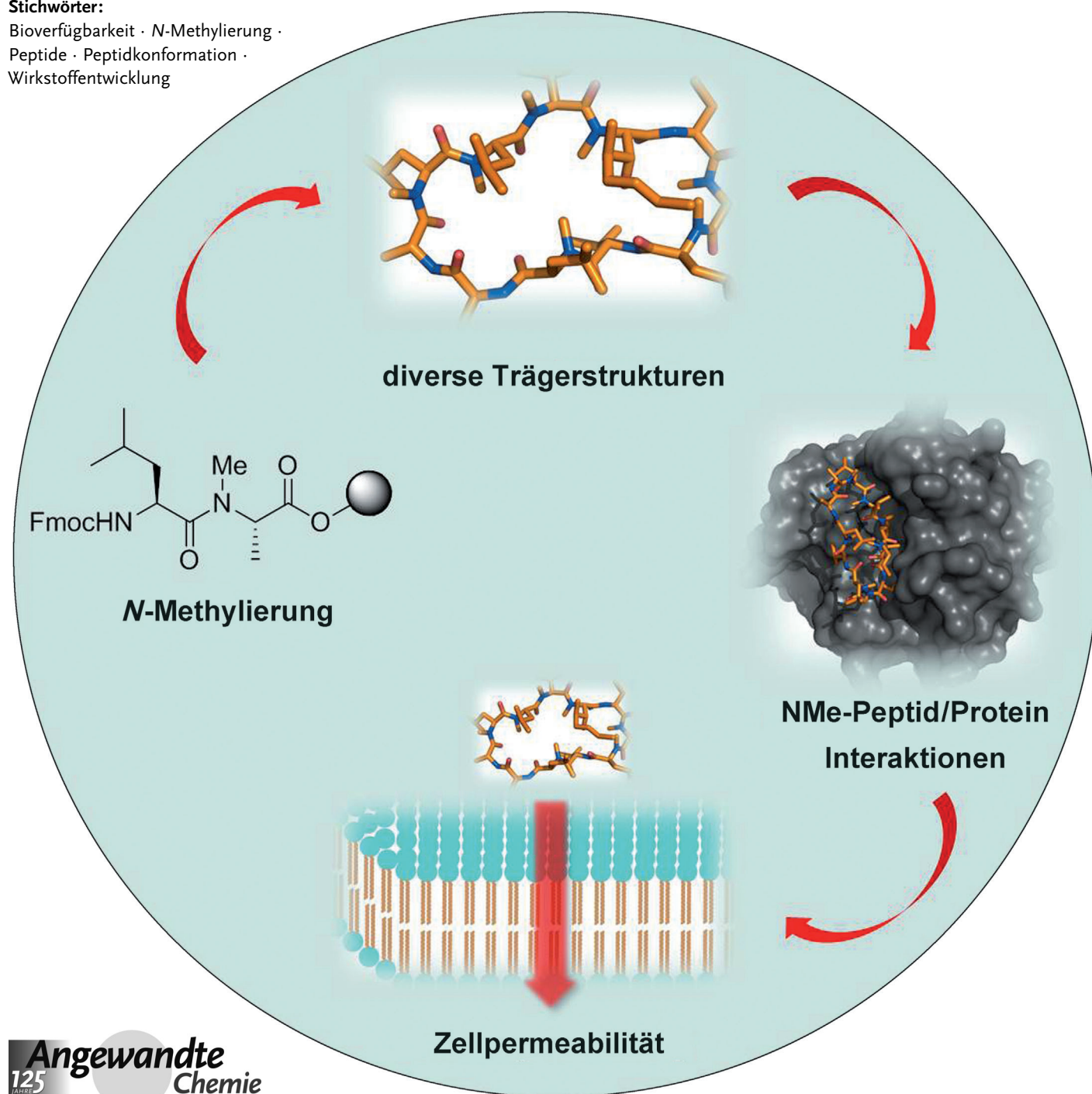


# N-Methylierung von Peptiden und Proteinen: ein wichtiges Element für die Regulation biologischer Funktionen

Jayanta Chatterjee, Florian Rechenmacher und Horst Kessler\*

## Stichwörter:

Bioverfügbarkeit · N-Methylierung ·  
Peptide · Peptidkonformation ·  
Wirkstoffentwicklung



**D**ie N-Methylierung ist eine der einfachsten chemischen Modifikationen und kommt häufig in Peptiden und Proteinen von Prokaryoten und höheren Eukaryoten vor. Die Natur hat die N-Methylierung von Peptiden im Selektionsprozess der Evolution als raffiniertes Element für die Regulation biologischer Funktionen entwickelt, z. B. als Überlebensstrategie durch die Synthese von Antibiotika. Diese kleine strukturelle Veränderung kann nicht nur große Proteinkomplexe mobilisieren (wie im Fall der Methylierung von Histonen), sondern auch enzymatische Aktivitäten durch selektive Erkennung von Protein-Protein-Wechselwirkungen inhibieren. Dank neuer neuer Synthesemethoden konnte die N-Methylierung in den letzten Jahren sowohl zum Modifizieren biologischer Aktivitäten, Selektivitäten und pharmakokinetischer Eigenschaften von Peptiden als auch zur Verbesserung ihrer Pharmakodynamik eingesetzt werden. Wir fassen in diesem Aufsatz den aktuellen Wissensstand über den Einsatz der N-Methylierung zur Modifizierung biologischer, struktureller und pharmakokinetischer Eigenschaften von Peptiden zusammen.

## 1. Einleitung

Die N-Methylierung ist eine der zentralen chemischen Modifikationen zur Regulation biologischer Funktionen und spielt z. B. in der Epigenetik eine entscheidende Rolle. Die Epigenetik umfasst alle vererbaren meiotischen und mitotischen Veränderungen der Genexpression eines Phänotyps, die nicht in der Watson-Crick-Basenpaarung der DNA codiert sind.<sup>[1,2]</sup> Hier spielt die N-Methylierung von Histonen zur Strukturveränderung des Chromatins eine wichtige Rolle und ist maßgeblich an dessen biologischer Funktion beteiligt.<sup>[3]</sup> Die N-Methylierung ist folglich eine der Ursachen dafür, dass ein identischer Genotyp mit der gleichen DNA-Sequenz zu unterschiedlichen Phänotypen führen kann. Neben der Modifikation von Histonen ist die Methylierung der DNA ein bekannter epigenetischer Marker, der eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression und der Architektur des Zellkerns spielt.<sup>[4]</sup> Die DNA-Methylierung erfolgt durch verschiedene DNA-Methyltransferasen in der N<sup>6</sup>-Position des Adenins und in der C<sup>5</sup>-Position des Cytosins in CpG-Sequenzen.<sup>[2,5]</sup> Dabei stellen die globale und die genspezifische Hypomethylierung und Hypermethylierung die wichtigsten Formen der DNA-Methylierung dar.<sup>[6]</sup> Daneben können Veränderungen der epigenetischen Methylierung auch zu ernsthaften Erkrankungen wie Krebs oder geistiger Retardierung führen, wodurch natürlich das Interesse an der Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen geweckt wurde.<sup>[2]</sup> Zusätzlich zu ihrer epigenetischen Rolle trifft man die Methylierung auch in nicht-Histonproteinen wie p53, Hsp90 oder NF- $\kappa$ B an.<sup>[7,8]</sup> In all diesen Proteinen erfolgt die N-Methylierung in den Aminosäureseitenketten, während die N <sup>$\alpha$</sup> -Methylierung nur in einigen bakteriellen und eukaryotischen Proteinen am N-Terminus eines Proteins beobachtet wurde. Bisher ist sehr wenig über die biologische Relevanz der N <sup>$\alpha$</sup> -Methylierung der Proteine bekannt.<sup>[9]</sup> Sie scheint allerdings an der Entwicklung des Zell-

zyklus über adäquate Ausbildung des bipolaren Spindelapparats und Segregation der Chromosomen beteiligt zu sein.<sup>[10,11]</sup> Erst kürzlich wurde die erste N <sup>$\alpha$</sup> -Methyltransferase in der Hefe und im Menschen beschrieben.<sup>[9,12]</sup> Das dürfte für die weitere Untersuchung der N <sup>$\alpha$</sup> -Methylierung von Bedeutung sein. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde jedoch keine N-Methylierung einer Peptidbindung in Proteinen von Säugern beschrieben. Es überrascht sehr, dass die Natur diese Art der Veränderung nicht als posttranslationale Modifikation von Proteinen eingeführt hat.

## 2. Die N-Methylierung von Histonen

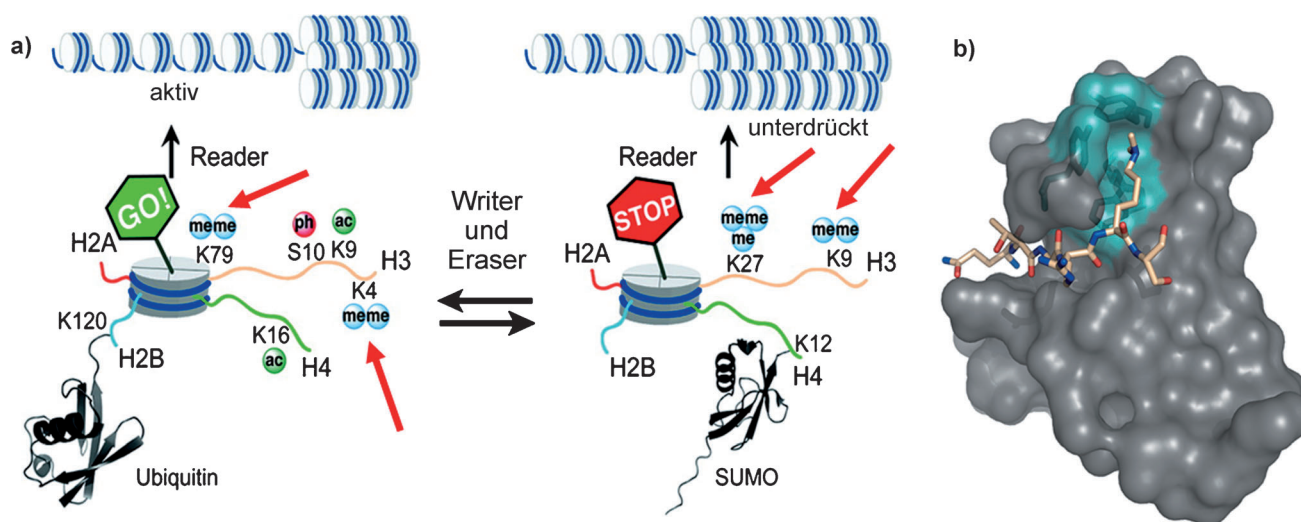
Die N-Methylierung von Histonen erfolgt in den Seitenketten von Lysin und Arginin und ist für die Genregulation von maßgeblicher Bedeutung.<sup>[13,14]</sup> Die N-Methylierung von

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	269
2. Die N-Methylierung von Histonen	269
3. Natürlich vorkommende N-methylierte Peptide	271
4. Biosynthese von N-methylierten Peptiden	275
5. Chemische Synthese von N-methylierten Peptiden	275
6. Ribosomale Synthese von N-methylierten Peptiden	276
7. Prolin als Mimetikum der N-Methylierung in Proteinen	277
8. Einfluss der N-Methylierung auf Peptide	277
9. Ausblick	280

[\*] F. Rechenmacher,<sup>[†]</sup> Prof. H. Kessler  
 Institute for Advanced Study and Center for Integrated Protein Science, Department Chemie, Technische Universität München  
 Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
 E-Mail: Kessler@tum.de  
 Prof. H. Kessler  
 Chemistry Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University  
 P.O. Box 80203, Jeddah 21589 (Saudi-Arabien)  
 Dr. J. Chatterjee<sup>[†]</sup>  
 Abteilung Genombiologie  
 Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie  
 Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben in gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.



**Abbildung 1.** a) Histonmodifikationen und deren Konsequenzen. Die DNA ist um einen oktameren Komplex gewickelt, der aus zwei Sätzen von je vier Kernhistonen (H2A, H2B, H3, H4) gebildet wird. Posttranslationale Modifikationen wie ein- und mehrfache Methylierung (me, markiert durch rote Pfeile), Acetylierung (ac), Phosphorylierung (ph), Ubiquitylierung und SUMOylierung an spezifischen Stellen in den Histonen können das Binden von nicht-Histonproteinen („Readers“) induzieren und dadurch entweder zu Aktivierung oder Unterdrückung der Gentranskription führen. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [19], Copyright 2011 American Chemical Society. b) Kristallstruktur der HP1-Chromodomäne aus *Drosophila* (Oberflächendarstellung) mit dem Ende des Histon-H3-Peptids mit Methyllysin am Rest 9 (Stäbchen). Die erhöhte Hydrophobie des Lysins durch *N*-Methylierung begünstigt Wechselwirkungen mit unpolaren Gruppen und stabilisiert die Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung der Methylammoniumgruppe mit den aromatischen Ringen von zwei Tyrosinen und einem Tryptophan (cyan) (PDB-Code: 1KNA).<sup>[21]</sup>

Lysin, die je nach Position der Methylierung die Aktivierung oder Unterdrückung der Transkription auslösen kann, wird dabei durch eine Familie von hochspezifischen Lysinmethyltransferasen ausgeführt.<sup>[15]</sup> Einzelne Lysine können bis zu dreimal methyliert werden, wodurch sich unterschiedliche Methylierungszustände für jedes Lysin ergeben. Dieser Vorgang ist ein reversibler Prozess, bei dem die Demethylierung von einer Familie von Lysindemethylasen durchgeführt wird.<sup>[15]</sup> Ähnlich wie bei Lysin führt auch die *N*-Methylierung von Arginin zu unterschiedlichen Methylierungszuständen, die sich entweder aktivierend oder unterdrückend auf die Transkription auswirken können.<sup>[16]</sup> Die erste Arginindemethylase wurde erst im Jahr 2007 beschrieben.<sup>[17]</sup> Da auf diese Weise eine derartige Vielzahl an *N*-Methylierungsmustern resultiert, die zudem mit anderen posttranslationalen Modifikation auftreten können, ergibt sich eine große Zahl möglicher Kombinationen derartiger Modifikationen.<sup>[2]</sup> Dies führte zur Hypothese eines „Histon-Codes“, der von Enzymen und Proteinen erkannt und in biologische Funktionen „übersetzt“ werden kann.<sup>[18]</sup> Es wurde berichtet, dass die Art

der Histonmethylierung mit vielen biologischen Prozessen, wie der Erhaltung und Differenzierung der Stammzellen oder der Antwort auf DNA-Beschädigung, im Zusammenhang steht und essentiell für die normale Genregulation ist.<sup>[13,15]</sup> So kann die *N*-Methylierung die Genexpression durch Umwandlung der Chromatinstruktur in eine aktive Form drastisch verändern und dadurch die Bindung von nicht-Histonproteinen beeinflussen (Abbildung 1a).<sup>[14,19]</sup> Fehler in der Histonmethylierung können zu Krebs führen und sind an der Entwicklung verschiedener Tumore beim Menschen beteiligt.<sup>[2,14]</sup> Kürzlich wurde gezeigt, dass Veränderungen im *N*-Methylierungsmuster von Histonen zur Resistenz gegen Medikamente als Folge dynamischer Chromatinmodifikation führen können.<sup>[20]</sup> Chromatin-modifizierende Wirkstoffe können dem entgegenwirken. Es ist durchaus bemerkenswert, dass eine derartig kleine Veränderung von nur 14 Da durch die *N*-Methylierung das dynamische Erkennungsmotiv großer Proteinkomplexe außergewöhnlich erhöhen kann (Abbildung 1b).<sup>[21]</sup>



Jayanta Chatterjee wurde in Kalkutta geboren und studierte Chemie an der Pune University. Nach seinem M.Sc. mit Hauptfach organische Chemie schloss er sich 2004 als Doktorand der Gruppe von Prof. Horst Kessler an der TU München an. Zurzeit absolviert er ein EMBO-Postdoktorat in der Gruppe von Dr. Maja Köhn am EMBL in Heidelberg, wo er Peptide als Werkzeuge zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen untersucht.



Florian Rechenmacher wurde in Meran, Italien, geboren und studierte Chemie an der TU München. Nach seinem M.Sc. 2009 in organischer und biologischer Chemie schloss er sich mit einem Stipendium der International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE) der Gruppe von Prof. Horst Kessler an. Schwerpunkte seiner Doktorarbeit sind die Funktionalisierung von Integrin-subtyp-spezifischen Antagonisten für verschiedene medizinische Anwendungen und Untersuchungen von cyclischen Peptiden für verbesserte orale Bioverfügbarkeit.

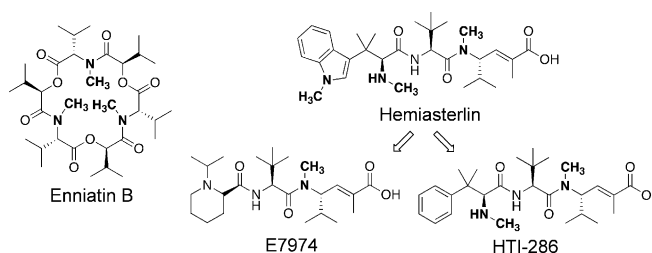


### 3. Natürlich vorkommende N-methylierte Peptide

Wie zuvor erwähnt, wird die N-Methylierung von Amidbindungen nicht als posttranslationale Modifikation von Proteinen verwendet. Trotzdem gibt es eine Vielzahl an N-methylierten linearen oder cyclischen Peptiden, die bemerkenswerte biologische Funktionen ausüben. Solche Peptide werden in der Natur enzymatisch synthetisiert, um bestimmte physikalische oder biologische Eigenschaften zu bekommen. Einige dieser natürlich vorkommenden, N-methylierten linearen oder cyclischen Peptide von unterschiedlichstem Ursprung, Affinität und Spezifität zeigen ein enormes Potential bei der Regulation biologischer Funktionen. Aus diesem Grund möchten wir in den folgenden Abschnitten eine Auswahl von natürlichen N-methylierten Peptiden vorstellen, die Affinität für verschiedenste Biomoleküle in Säugerzellen aufweisen. Es sollen solche Peptide besprochen werden, die besonders ausführlich untersucht wurden oder die faszinierende Phänomene beim Behandeln von Zellen zu Tage gebracht haben. Es sollte allerdings beachtet werden, dass die wenigen hier aufgeführten Beispiele keinesfalls die Vielfalt der N-methylierten peptidischen Naturstoffe widerspiegeln können.

#### 3.1. N-methylierte Peptide mit der Zellmembran als Zielstruktur

Enniatine sind eine Gruppe von N-methylierten cyclischen Depsipeptiden,<sup>[22]</sup> die aus drei Estern eines Dipeptidolmonomers gebildet werden. Das Monomer besteht seinerseits aus einer N-Methylaminosäure (Leu, Val, Ile), die mit der D-2-Hydroxycarbonsäure, abgeleitet von derselben Aminosäure, eine Amidbindung eingeht (Abbildung 2).<sup>[23]</sup> Enniatine lagern sich in die Zellmembran ein und bilden darin mit mono- oder divalenten Kationen vertikal gestapelte Sandwich-Komplexe. Auf diese Weise unterbrechen sie als Ionophore das Membranpotential.<sup>[24]</sup> Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Enniatine p53-abhängige zytostatische und p53-unabhängige zytotoxische Aktivitäten in menschlichen Krebszelllinien bewirken, die sie als potentielle Wirkstoffe zur Behandlung von Krebs charakterisieren.<sup>[25,26]</sup> Des Weiteren wurde gefunden, dass Enniatin B Pdr5p hemmt, bei dem es sich um eine der wesentlichen Effluxpumpen handelt, deren Überexpression zur Arzneimittelresistenz (multidrug resistance, MDR) in *Saccharomyces cerevisiae* führt. Enniatine inhibieren dabei in einer ähnlichen Weise wie das Im-



**Abbildung 2.** Einige natürlich vorkommende N-methylierte Peptide mit der Zellmembran (Enniatin B) oder Mikrotubuli (Hemiasterlin und Analoga) als Zielstruktur.

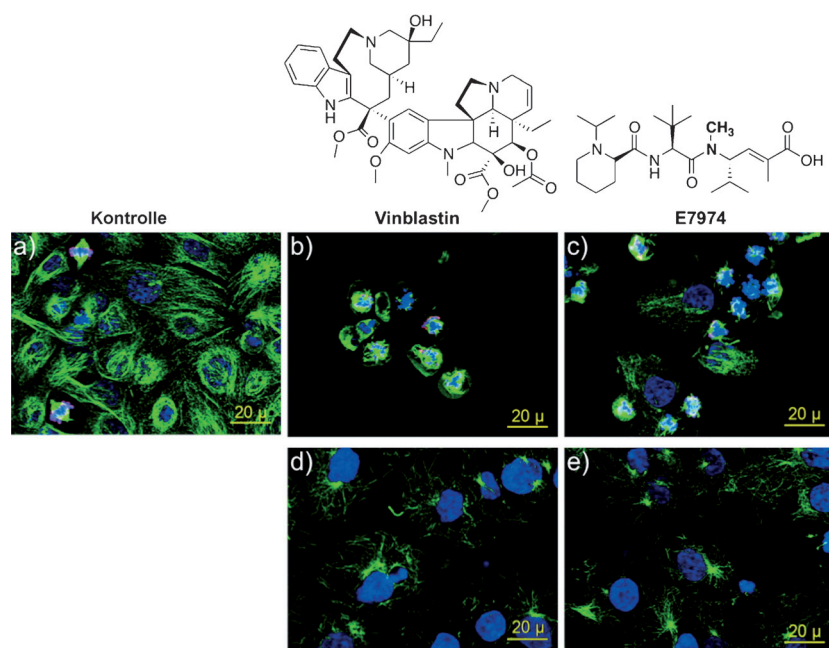
munsuppressivum FK506 (Tacrolimus) spezifisch die Funktion von Pdr5p.<sup>[27]</sup> Zudem wird vermutet, dass Enniatine und ihre Analoga, ebenso wie FK506, an das humane Multidrug-Resistance-Protein 1 (MDR 1) binden und die MDR in Krebszellen unterbinden.<sup>[28,29]</sup>

#### 3.2. N-methylierte Peptide mit Mikrotubuli als Zielstruktur

Hemiasterline umfassen eine Familie von natürlich vorkommenden N-methylierten Tripeptiden, die aus den drei modifizierten Aminosäuren *tert*-Leucin, 4-Amino-2,5-dimethylhex-2-ensäure und *N,N*, $\beta$ , $\beta$ -Tetramethyltryptophan (Abbildung 2) bestehen.<sup>[30–32]</sup> Hemiasterlin ist ein stark zytotoxisches Peptid, dessen antiproliferative Wirkung auf der Verhinderung der Tubulinpolymerisation beruht. Zudem bewirkt es ähnlich wie Vinblastin (ein Antitumormedikament für die Behandlung verschiedener Krebsarten) einen Stopp der Mitose in der G2-M-Phase des Zellzyklus. Da die antitumortheraeutische Wirksamkeit von Hemiasterlin mit Toxizität verbunden war, wurden durch intensive Anstrengungen mehrere wirksame Analoga von Hemiasterlin synthetisch hergestellt.<sup>[33]</sup> Das Hemiasterlin-Analogon HTI-286 (Abbildung 2) ist ein wirksamer Proliferationsinhibitor (IC<sub>50</sub> von 1 nM in 18 menschlichen Tumorzelllinien) und weist eindeutig weniger Interaktion mit MDR 1 auf, als die antimikrotubulären Wirkstoffe Paclitaxel, Docetaxel, Vinorelbin und Vinblastin. HTI-286 inhibierte zudem das Wachstum von menschlichen Tumorexograften, bei denen Paclitaxel und Vincristin aufgrund ihrer mit MDR 1 assoziierten Resistenz ineffektiv waren.<sup>[34]</sup> E7974 (Abbildung 2) ist ein anderes Hemiasterlin-Analogon, das sich momentan in der klinischen Phase I für die Behandlung von Krebs befindet.<sup>[35]</sup> E7974 inhibiert die Tubulinpolymerisation mit einem IC<sub>50</sub>-Wert, der im Bereich des bekannten Tubulinpolymerisationsinhibitors Vinblastin liegt. Die Anheftung der Chromatiden an die Mikrotubuli während der Mitose ist für die korrekte Segregation der Chromosomen von absoluter Wichtigkeit.<sup>[36]</sup> Auf diese Weise blockiert die Wechselwirkung von E7974 mit der Tubulinpolymerisation den erfolgreichen Abschluss der Mitose. Immunfluoreszenzanalysen von mit E7974 behandelten Zellen zeigen eine Erhöhung der Zellanzahl, die auf den Mitosemarker Phosphohiston H3 positiv sind. Des Weiteren treten tiefgreifende Abnormalitäten der Mitosespindeln auf (Abbildung 3), was diese Verbindung zu einem



Horst Kessler studierte Chemie in Leipzig und Tübingen und wurde 1971 Professor an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt. 1989 wechselte er an die TU München. Seit 2008 ist er Carl von Linde-Professor am Institute for Advanced Study an der TUM. Seit 2011 ist er außerdem Adjunct Professor an der King Abdulaziz University in Jeddah, Saudi-Arabien. Seine Forschungsinteressen gelten der Wirkstoffentwicklung aus Peptiden und Peptidomimetika und der NMR-Spektroskopie.

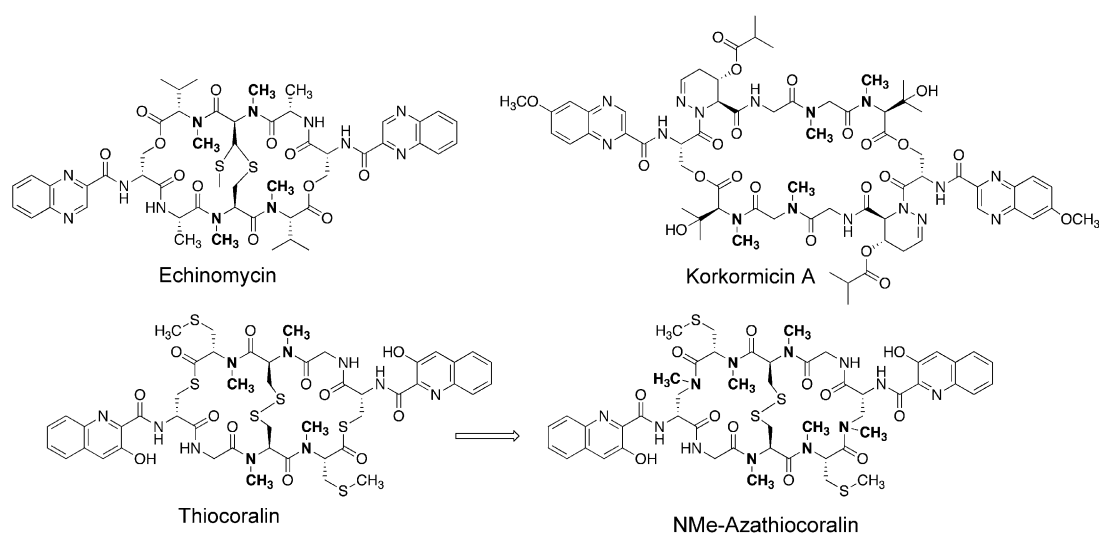


**Abbildung 3.** Vinblastin und E7974 inhibieren die Bildung des Spindelapparats während der Mitose und verringern die Dichte der Mikrotubuli der menschlichen Prostatakrebszelllinie DU 145. Diese wurden für 18 h behandelt. a) Kontrolle (Dimethylsulfoxid; DMSO); b)  $8.4 \text{ nmol L}^{-1}$  und d)  $28 \text{ nmol L}^{-1}$  Vinblastin; c)  $19.5 \text{ nmol L}^{-1}$  und e)  $65 \text{ nmol L}^{-1}$  E7974. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit DAPI (blau), anti-β-Tubulin (grün), und anti-Phosphohiston H3 (rot; obere Reihe) oder DAPI (blau) und anti-β-Tubulin (grün; untere Reihe) angefärbt. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [33], Copyright American Association for Cancer Research.

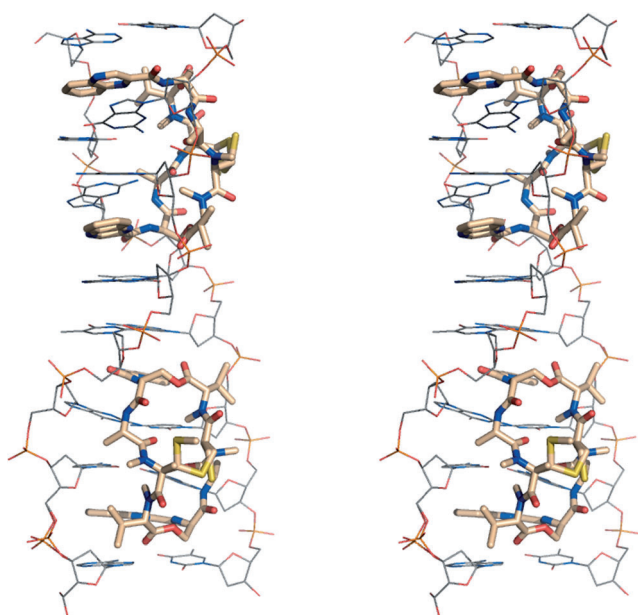
vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung als Chemotherapeutikum macht.<sup>[33]</sup> An dieser Stelle möchten wir darauf hinweisen, dass die chemischen Strukturen von E7974 und Vinblastin nahezu keine Ähnlichkeit aufweisen, beide Moleküle aber trotzdem eine bemerkenswert vergleichbare Bioaktivität als potentieller Antitumorwirkstoff zeigen.

### 3.3. N-methylierte Peptide mit der DNA als Zielstruktur

Einige natürlich vorkommende N-methylierte Peptide wurden als potentielle DNA-Interkalatoren identifiziert und eignen sich daher zur Untersuchung der Signaltransduktion und als potentielle neue Antitumormedikamente. Echinomycin ist ein fast  $C_2$ -symmetrisches N-methyliertes cyclisches Dipeptid (Abbildung 4) und besteht aus zwei Chinoxalin-2-carbonsäure-Einheiten. Echinomycin wurde ursprünglich als Antibiotikum im Kulturfiltrat des *Streptomyces echinatus* entdeckt.<sup>[37]</sup> Es ist der Verbindungsklasse der DNA-Bisinterkalatoren zugehörig,<sup>[38]</sup> die sich in die kleine Furche der DNA einlagern. Echinomycin bindet dabei in einer sequenzspezifischen Art die Basenpaarsequenz 5'-CG-3', wobei sich die Chinoxalinchromophore durch Bildung eines Zwei-Basenpaare-Sandwichs zwischen die Basen der DNA einschieben (Abbildung 5). Dadurch wird die Transkription inhibiert und Apoptose in Krebszellen induziert.<sup>[39]</sup> Als Echinomycin dann vor einigen Jahren durch das National Cancer Institute in die klinische Phase gebracht wurde, konnte in der klinischen Phase II jedoch nur minimale oder keine Antitumoraktivität festgestellt werden; Zudem wurden schwere Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, reversible Leberenzymabnormalitäten usw. beobachtet.<sup>[40]</sup> Kürzlich wurde aber in einem Screening einer Bibliothek bestehend aus 140000 niedermolekularen Verbindungen Echinomycin als eine der wirksamsten Verbindungen zur Inhibierung der Bindung des Hypoxie-induzierten Faktor-1 (HIF-1) an DNA entdeckt.<sup>[41]</sup> HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der Gene kontrolliert, die an der Glykolyse, Angiogenese, Migration und Invasion beteiligt sind, welche alle für die Tumorprogression und -metastasierung wichtig sind. Ein selektiver HIF-1-Inhibitor könnte für die Erforschung des HIF-1-Signalwegs und für die Etablierung des therapeutischen Potentials der HIF-1-Inhibierung



**Abbildung 4.** Natürlich vorkommende N-methylierte Peptide mit der DNA als Zielstruktur.



**Abbildung 5.** Stereobild der Kristallstruktur von Echinomycin (Stäbchen) im Komplex mit dem DNA-Duplex d(ACGTACGT) (Linien), das die Stapelung zeigt (PDB-Code: 3GO3).<sup>[50]</sup>

geeignet sein, da viele andere Methoden wie die Antisense-Strategie oder siRNA bisher versagt haben.<sup>[42,43]</sup> Es ist durchaus bemerkenswert, dass jetzt solche Peptide mittlerer Größe wie Echinomycin zu den niedermolekularen Verbindungen gezählt werden, obwohl die Molekülgröße weit jenseits der 500-Da-Grenze der Lipinski-Regeln liegt,<sup>[44]</sup> die normalerweise als Selektionskriterium für die Wirkstoffentwicklung herangezogen wird.

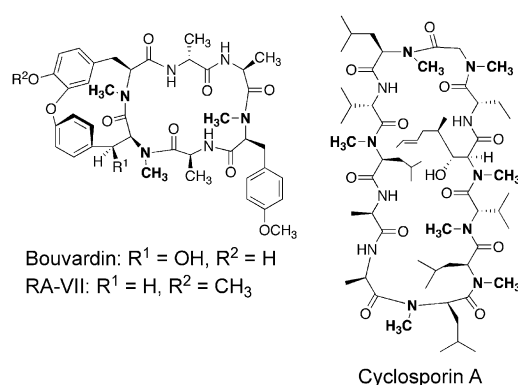
Zu Echinomycin strukturell ähnlich ist Thiocoralin (Abbildung 4).<sup>[45]</sup> Es enthält anstelle der Carbonsäureester in den klassischen depsipeptidischen Antibiotika einen Thioester. Thiocoralin zeigt sowohl *in vitro*<sup>[46]</sup> als auch *in vivo* ein breites Spektrum antiproliferativer Aktivität in verschiedenen Krebszelllinien.<sup>[47]</sup> Dabei entwickelt es seine antiproliferative Aktivität durch Anhalten der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und durch Verminderung der Progressionrate der S-Phase in die G2/M-Phase. Dies geschieht durch Inhibierung der DNA-Polymerase  $\alpha$  unter Ausbildung eines ternären Enzym-Thiocoralin-DNA-Komplexes.<sup>[46]</sup> Thiocoralin ist sehr instabil und auf die Hilfe von Wirkstofftransportsystemen in der medizinischen Anwendung angewiesen.<sup>[48]</sup> Um diesen Nachteil zu beseitigen, haben Albericio et al. die Thioesterbindung durch eine N-methylierte Amidbindung ersetzt, wodurch die Halbwertszeit von NMe-Azathiocoralin im menschlichen Serum verdoppelt werden konnte, ohne dabei die biologische Aktivität zu beeinflussen.<sup>[49]</sup>

Korkormicin A (Abbildung 4)<sup>[51]</sup> ist ein weiterer, strukturell ähnlicher DNA-Bisinterkalator. Es leitet die Apoptose in Krebszellen durch einen neuartigen Mechanismus, die Induktion der p53-Phosphorylierung, ein. Das induziert den p53-Abbau und aktiviert die p53-abhängige Transkription und stellt daher einen vielversprechenden Ansatz für die Krebstherapie dar.<sup>[52]</sup> Wir möchten hier noch einmal auf die

geringfügige Variation der DNA-Bisinterkalatoren hinweisen, in denen kleine Veränderungen der Seitenkettenfunktionalitäten und der Ringgröße die Wirksamkeit als Antitumormittel durch Modulation der Bioaktivität und Pharmakologie der peptidischen Naturstoffe stark beeinflussen können. Zudem überrascht es, dass diese Verbindungen trotz ihrer Ähnlichkeit unterschiedliche biologische Signalwege beeinflussen, was für die Entdeckung von mechanismusbasierten Therapeutika interessant ist.

### 3.4. N-methylierte Peptide mit dem Ribosom als Zielstruktur

Bouvardin ist ein aus der Pflanze *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae) isoliertes N-methyliertes cyclisches Hexapeptid (Abbildung 6), das bereits von antiken mexikanischen In-



**Abbildung 6.** Natürlich vorkommende N-methylierte Peptide mit dem Ribosom (Bouvardin und Analoga) oder mit Proteinphosphatasen (Cyclosporin A) als Zielstruktur.

dianern als Heilmittel gegen Dysenterie und andere Krankheiten eingesetzt wurde.<sup>[53]</sup> Bouvardin besteht aus zwei L-Alaninen, einem D-Alanin und drei modifizierten N-Methyl-L-Tyrosinen. Das besondere Charakteristikum ist ein 14-gliedriger Ring, gebildet durch oxidative Kupplung der phenolischen Hydroxygruppe eines Tyrosins mit dem jeweils benachbarten Tyrosin. Bouvardin und sein Analogon RA-VII zeigen beide beeindruckende Antitumoraktivität durch Anhalten der Zellprogression während des gesamten Zellzyklus. Beide blockieren die Proteinsynthese<sup>[54]</sup> durch Interaktion mit dem eukaryotischen 80S-Ribosom<sup>[55]</sup> und inhibieren die Bindung der Aminoacyl-tRNA und die Translokation der Peptidyl-tRNA. Studien über die Eigenschaften von RA-VII haben nicht nur wirksame Antitumoraktivität zu Tage gebracht, sondern führten sogar zur vollständigen Heilung von soliden Tumoren des kolorektalen Adenokarzinoms.<sup>[56]</sup> In einer jüngsten Konformation-Aktivitäts-Studie durch N-Methylierung von D-Ala-1 und Ala-4 von RA-VII konnte die Bedeutung der Schleifenstruktur für die Vermittlung der Zytotoxizität von RA-VII gezeigt werden. Konformationsstudien von Peptiden helfen also, ein besseres Verständnis von deren biologischen Aktivitäten zu erlangen.<sup>[57]</sup>

### 3.5. *N*-methylierte Peptide mit Proteinphosphatasen als Zielstruktur

Cyclosporin A (CsA) (Abbildung 6) ist zweifelsohne der Klassiker unter den *N*-methylierten Cyclopeptidwirkstoffen und wird in der Medizin umfangreich verwendet. CsA ist ein cyclisches Undecapeptid mit sieben *N*-methylierten Amidbindungen. Es wurde ursprünglich in einem Screening von antibiotischen Substanzen aus Pilzen identifiziert.<sup>[58]</sup> Bedeutung erhielt es vor allem als Immunsuppressivum gegen die Abstoßung von transplantierten Organen durch Inhibierung der T-Zell-Aktivierung.<sup>[59]</sup> Im Zellinneren bildet CsA einen Komplex mit Cyclophilin A (Immunophilin), der die Proteinphosphatase Calcineurin inhibiert. Die Inhibierung von Calcineurin durch den (Cyclophilin-A)-CsA-Komplex kann die Freisetzung des Signals durch den zytoplasmatisch lokalisierten Transkriptionsfaktor NFAT unterdrücken, indem es den Transport in den Zellkern verhindert und dadurch die Aktivierung von IL-2 und anderen Zytokinen blockiert.<sup>[60]</sup> Es ist erwähnenswert, dass NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie eine entscheidende Rolle im Hinblick auf das Verständnis und die Struktur von CsA spielten.<sup>[61–64]</sup> Auch die Erkennung des Wirkungsmechanismus, wobei ein Übergangszustand-ähnlicher Komplex mit Cyclophilin gebildet wird,<sup>[65]</sup> welcher „twisted amide surrogate“ genannt wird und eine *cis-trans*-Peptidylprolyl-Isomerase ist, ist ein schönes Beispiel für die Fähigkeit von *N*-methylierten Cyclopeptiden, Protein-Protein-Wechselwirkungen zu regulieren.<sup>[66–72]</sup>

### 3.6. *N*-methylierte Peptide und ihr Potential als zukünftige Arzneimittel

Am Ende dieses Abschnitts wollen wir einige *N*-methylierte Peptide erwähnen, die sich momentan in der klinischen Phase befinden und das Potential der *N*-Methylierung in zukünftigen Arzneimittel widerspiegeln (Abbildung 7).

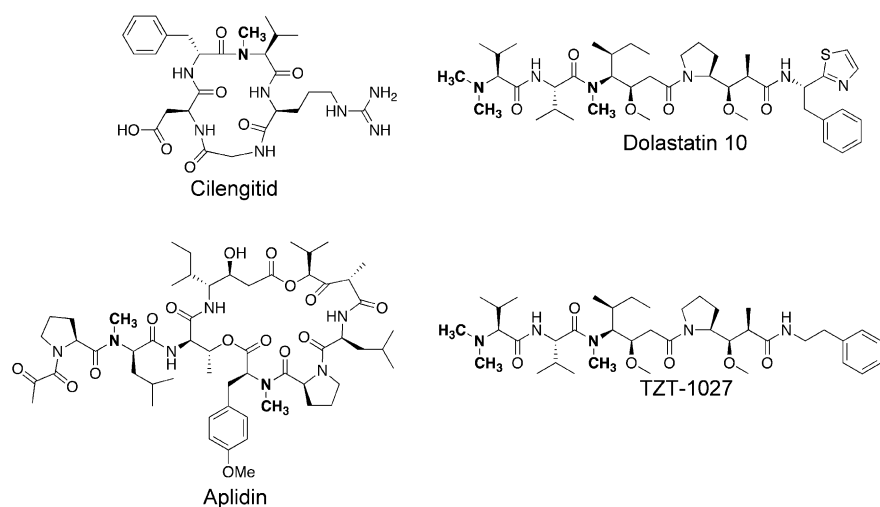
Der Integrin-Antagonist Cilengitid, ein durch „räumliches Screening“ gefundenes cyclisches RGD-Pentapeptid

[*c*-(RGDf(NMe)V-)], befindet sich momentan in der klinischen Phase III für die Behandlung von Glioblastomen und in Phase II für mehrere andere Tumorarten.<sup>[73]</sup> Cilengitid ist ein Analogon von *c*-(RGDfV-), bei dem es sich um den ersten superaktiven  $\alpha\beta3$ -Integrininhibitor mit hoher Selektivität gegen das Blutplättchenintegrin  $\alpha\text{IIb}\beta3$  handelte.<sup>[74]</sup> Die Einführung einer *D*-Aminosäure neben der RGD-Sequenz im Cyclus ist für die richtige Konformation von essentieller Bedeutung. Der Phenylring des Phe interagiert mit aromatischen Resten in der  $\beta$ -Untereinheit von Integrinrezeptoren.<sup>[75,76]</sup> Ein *N*-Methyl-Scan dieser Leitstruktur führte schließlich zu Cilengitid,<sup>[73,77]</sup> das sogar eine noch höhere Affinität für  $\alpha\beta3$  zeigt, jedoch auch Affinität im niederen nanomolaren Bereich für die Integrine  $\alpha\beta5$  und  $\alpha5\beta1$  aufweist.<sup>[77]</sup> Dieses hochaktive und selektive cyclische Pentapeptid wurde daher von der Firma Merck KGaA für die Arzneimittelentwicklung auserkoren und später mit dem Namen Cilengitid belegt. Es sollte erwähnt werden, dass drei Faktoren dafür verantwortlich sind, dass Cilengitid völlig stabil gegen enzymatischen Abbau ist: die Cyclisierung, eine *D*-Aminosäure im Ring und die *N*-Methylierung.

Aplidin, ein aus *Aplidium albicans* isoliertes marines Cyclodepsipeptid, ist ein weiteres *N*-methyliertes Peptid, das in einer Reihe von humanen Krebszelllinien, wie Melanoma, Brust- oder Lungenkrebs, Antitumoraktivität zeigte.<sup>[78–80]</sup> Es wurde gefunden, dass Aplidin Apoptose über die Inhibierung der Proteinsynthese induziert und wahrscheinlich durch die Blockade der VEGF-Sekretion antiangiogenetisch wirkt.<sup>[78,81]</sup> Aplidin zeigte Antitumoraktivität in der klinischen Phase I und wurde bereits in Phase II für die Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom, multiplem Myelom und verschiedenen anderen Tumorarten getestet.<sup>[82–87]</sup> Kürzlich erreichte es die klinische Phase III für die Behandlung von rezidiertem/refraktärem multiplem Myelom in Kombination mit Dexamethason.<sup>[88]</sup>

Dolastatin 10 ist ein aus dem marinen Organismus *Dolabella auricularia* isoliertes lineares *N*-methyliertes Pentapeptid. Das zytotoxische Peptid zeigte antiproliferative Wirkung in Krebszellen und wurde in der klinischen Phase II gegen verschiedene Krebsarten getestet.<sup>[89–94]</sup> TZT-1027, ein synthetisches Derivat von Dolastatin 10 wirkt, ähnlich wie Dolastatin, als Inhibitor der Mikrotubuliorganisation und Tubulinpolymerisation. Es erreichte die klinische Phase I und zeigte in Patienten mit soliden Tumoren eine geringere Zytotoxizität als Dolastatin 10.<sup>[95]</sup> TZT-1027 weist allerdings keinerlei Aktivität bei der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Weichteilsarkom sowie bei der Behandlung von Patienten mit vorher behandeltem nichtkleinzelligem Lungenkarzinom auf.<sup>[96,97]</sup>

*N*-Methylierung des Hexapeptids NFGAIL aus dem aus 37 Aminosäuren bestehendem Insel-Amyloid-Polypeptid (IAPP) zeigte Inhibierung der Amyloidbildung und Fibrillogenesse.<sup>[98,99]</sup> Dies ist von großem Interesse, da die Aggregation von IAPP zum zytotoxischen pankreatischen Amyloid in Typ-2-Diabetes-



**Abbildung 7.** Strukturen von vier *N*-methylierten Peptiden, die zurzeit in der klinischen Phase für die Behandlung verschiedener Krebsarten sind.

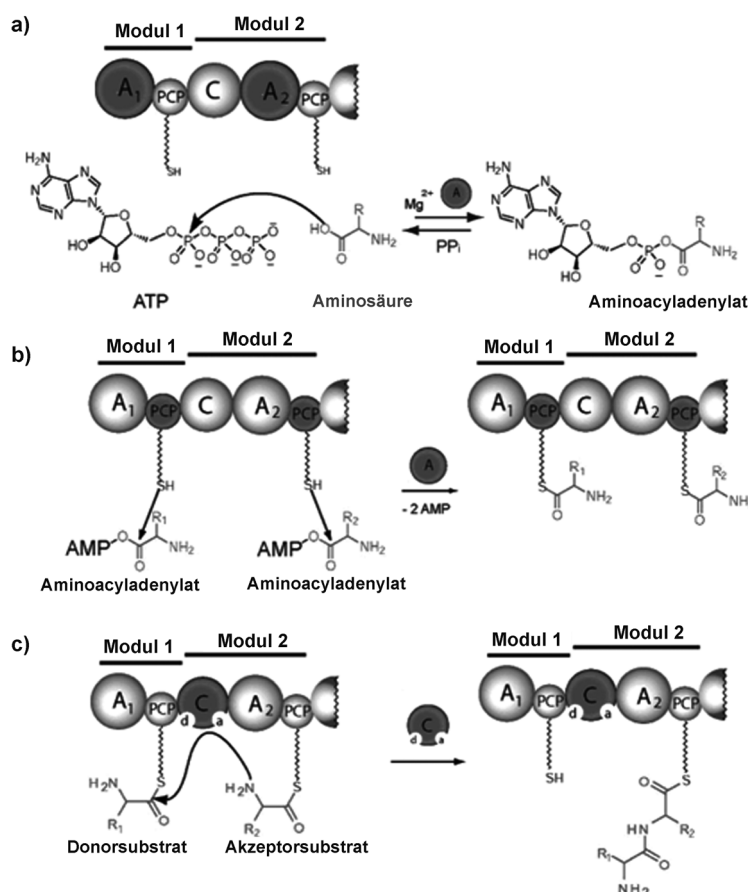


Patienten führt.<sup>[98]</sup> Ein weiteres IAPP-Analogon ist das zweifach *N*-methylierte [NMeG<sup>24</sup>,NMeI<sup>26</sup>]-IAPP (IAPP-GI), das gut löslich, nicht amyloidogen und nicht zytotoxisch ist und die Selbstorganisation von IAPP im nanomolaren Bereich blockiert.<sup>[100]</sup> Des Weiteren wurde gezeigt, dass IAPP-GI mit nanomolarer Affinität die Insulinaggregation und die zytotoxische Oligomerisierung des  $\beta$ -Amyloids inhibiert, bei dem es sich um die Hauptkomponente des Amyloids im von der Alzheimer-Krankheit betroffenen Gehirn handelt.<sup>[101,102]</sup> Dies ist ein möglicher Hinweis für eine molekulare Ähnlichkeit der Alzheimer-Krankheit mit Typ-2-Diabetes.<sup>[101]</sup> Es ist erwähnenswert, dass gezielt auf die *N*-Methylierung zurückgegriffen wurde, um die Fähigkeit zu unterbinden, über Wasserstoffbrückenbindung fibrilläre Strukturen auszubilden, wodurch die Assoziation der  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Peptide gestört wird. In einer anderen Arbeit zeigte die *N*-Methylierung des  $\beta$ -Faltblatt-spaltenden Peptids Ac-LPFFD eine Erhöhung seiner In-vitro-Stabilität und In-vivo-Halbwertszeit, wobei die Aktivität erhalten blieb.<sup>[103]</sup>

#### 4. Biosynthese von *N*-methylierten Peptiden

Alle natürlich vorkommenden *N*-methylierten Peptide werden nicht wie Proteine vom Ribosom synthetisiert, sondern von großen multifunktionellen Enzymen, den sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs).<sup>[104,105]</sup> Im Unterschied zum Ribosom können die NRPSs hunderte verschiedene Fragmente in eine peptidische Kette einfügen, woraus sich eine Vielzahl von Peptiden und Peptidomimetika mit einem breiten Spektrum an biologischer und struktureller Aktivität ergibt.<sup>[105]</sup> Bei der NRPS handelt es sich um einen Multienzymkomplex, der zeitgleich Templat und die eigentliche Biosynthesemaschinerie darstellt.<sup>[105,106]</sup> Diese besteht aus wohldefinierten Bereichen, den sogenannten Modulen, die für die Einführung der Aminosäuren und anderer Bausteine in die wachsende Polypeptidkette zuständig sind.<sup>[104]</sup> Die Module werden ihrerseits wiederum in verschiedene Domänen unterteilt, die enzymatische Einheiten darstellen und für die Substraterkennung, -aktivierung, -bindung, -modifikation, -verlängerung und -freisetzung verantwortlich sind (Abbildung 8).<sup>[105]</sup>

Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) initiiert die Aktivierung des Substrats und kontrolliert die Primärsequenz durch Selektion (Abbildung 8a). Nach Bildung des Aminoacyladenylats wird das Intermediat an die freie Thiolgruppe des Cofaktors ppan überführt, wodurch ein aktivierter Thioester entsteht (Abbildung 8b).<sup>[105]</sup> Anschließend können *N*-Methylierung und andere Modifikationen erfolgen, wobei die *N*-Methylierung durch eine *N*-Methylierungsdomäne ausgeführt wird, die sich in der A-Domäne befindet. Die Methylgruppe wird von *S*-Adenosyl-L-methionin zum Thioester überführt, und *S*-Adenosyl-L-homocystein wird freigesetzt.<sup>[105,107]</sup> Nach Bildung der Peptidbindung (Abbildung 8c) durch Interagieren zweier Carrier-Domänen mit der Elongationsdomäne (Verlängerung) erfolgt schließlich die Freisetzung des linearen oder cyclischen Peptids an der Enddomäne (Termination). Neben der *N*-Methylierung können



**Abbildung 8.** a) Aktivierung der Aminosäure durch die A-Domäne. b) Bildung des Thioesters durch den Transfer der aktivierten Aminosäure an den Cofaktor ppan. An dieser Stelle können *N*-Methylierung und andere Modifikationen erfolgen. c) Bildung der Peptidbindung und Verlängerung. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [105], Copyright 2005 American Chemical Society.

NRPSs auch D-Aminosäuren, Heterocyclen und andere Fragmente einbauen, was zu einer gigantischen Zahl an möglichen Peptiden führt.<sup>[107]</sup>

#### 5. Chemische Synthese von *N*-methylierten Peptiden

Als die *N*-Methylierung von Peptiden in der Natur und das damit verbundene Potential für die Entwicklung neuer Therapeutika erkannt wurde, entstand rasch das Verlangen nach einer günstigen und effizienten Methode für die Synthese *N*-methylierter Peptide.<sup>[108]</sup>

*N*-Methylaminosäuren unterlagen anfänglich der leichten Racemisierung unter sauren oder basischen Bedingungen.<sup>[109]</sup> Daher mussten neue, racemisierungsfreie Methoden für deren Synthese entwickelt werden. Unter den effizienten Methoden für die Synthese von *N*-Methylaminosäuren<sup>[110,111]</sup> ist die von Freidinger et al. entwickelte reduktive Spaltung von 5-Oxazolidinonen die bis heute gängigste Methode zur Synthese enantiomerenreiner *N*-Methylaminosäuren.<sup>[112]</sup> Allerdings ist diese Methode für seitenkettenfunktionalisierte Aminosäuren wie Trp, His oder Cys nicht geeignet. Es hat sich herausgestellt, dass hier die katalysierte *N*-Alkylierung



von *o*-Nitrobenzolsulfonamid(*o*-NBS)-geschützten  $\alpha$ -Aminogruppen mit Dimethylsulfat als Methylierungsreagens Abhilfe schaffen kann.<sup>[113]</sup> Die Mitsunobu-Reaktion bedient sich einer ausgereiften Variante dieser Methode, die so weit optimiert wurde, dass man alle möglichen *N*-Methylamino-säuren in Lösung<sup>[114]</sup> oder an der Festphase<sup>[115,116]</sup> erhalten kann.

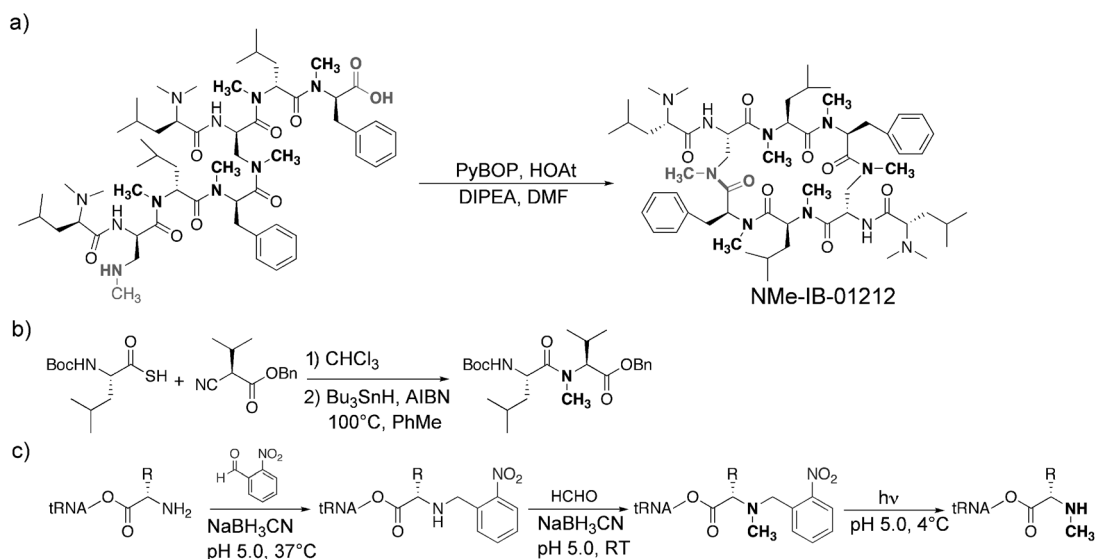
Um ein *N*-methyliertes Analogon einer bestimmten peptidischen Leitstruktur oder bioaktiven Substanz mit bestimmten pharmakologischen Eigenschaften zu erhalten, kann man entweder auf einen „Bibliothek-Ansatz“ zurückgreifen, bei dem alle möglichen *N*-methylierten Derivate der aktiven Sequenz synthetisiert werden, oder ein struktur-basiertes rationales Design für die *N*-Methylierung ausgewählter Peptidbindungen heranziehen, falls strukturbezogene Informationen über die bioaktive Konformation vorhanden sind. Unabhängig von der Wahl der Methode, ist eine schnelle und effiziente *N*-Methylierung von Nöten. Obwohl die oben erwähnten Methoden *N*-methylierte Aminosäuren in guter Ausbeute liefern, besteht die größte Herausforderung darin, diese zu einem vollständigen Peptid zusammenzusetzen. Die Kupplung an sterisch anspruchsvolle *N*-methylierte Aminosäuren ist kritisch und häufig erfolglos. Sie führten zudem oft zu Epimerisierung, Diketopiperazinbildung bei der darauffolgenden Fmoc-Entschützung<sup>[117]</sup> oder dem Verlust von Peptidsegmenten während der Abspaltung vom Harz,<sup>[118]</sup> woraus oft schlechte Ausbeuten des Peptids resultieren. Aus diesem Grund werden die Kupplungen an der Festphase zwei- oder dreifach entweder mit Triphosgen,<sup>[119]</sup> 1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5-*b*]pyridinhexafluorophosphat-3-oxid (HATU)/1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt), (7-Azabenzotriazol-1-yloxy)-tris(pyrrolidino)phosphoniumhexafluorophosphat (PyAOP) oder PyBOP, immer mit einem exzessivem Überschuss der Aminosäure, durchgeführt.<sup>[117]</sup> Kürzlich haben Albericio et al. die bessere Effizienz von zwei vergleichsweise günstigen Reagentien, (1-

Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholinocarbeniumhexafluorophosphat (COMU) und Ethyl(hydroxyimino)cyanoacetat (Oxyma), bei der Kupplung von *N*-methylierten Aminosäuren im Vergleich zu HATU und HOAt beschrieben. Es ist nicht unwesentlich, dass sich COMU und Oxyma als nichtexplosiv im Gegensatz zu HOAt erwiesen haben. Die Effizienz dieser Reagentien wurde bei der Synthese eines cyclischen, hochgradig *N*-methylierten Peptids ausgenutzt, dessen Cyclisierung über eine sterisch gehinderte *N*-methylierten Aminosäureseitenkette gelungen ist (Abbildung 9a).<sup>[120]</sup> Die Ausbeuten bei der Cyclisierung von Peptiden mit *N*-methylierten Peptidbindungen sind oft höher als bei nichtmethylierten Peptiden, da durch die *N*-Methylierung ein gewisser Anteil an *cis*-Peptidbindungen (Induktion von Schleifen, siehe unten) vorherrscht, der die N- und C-Termini näher zueinander hinführt.

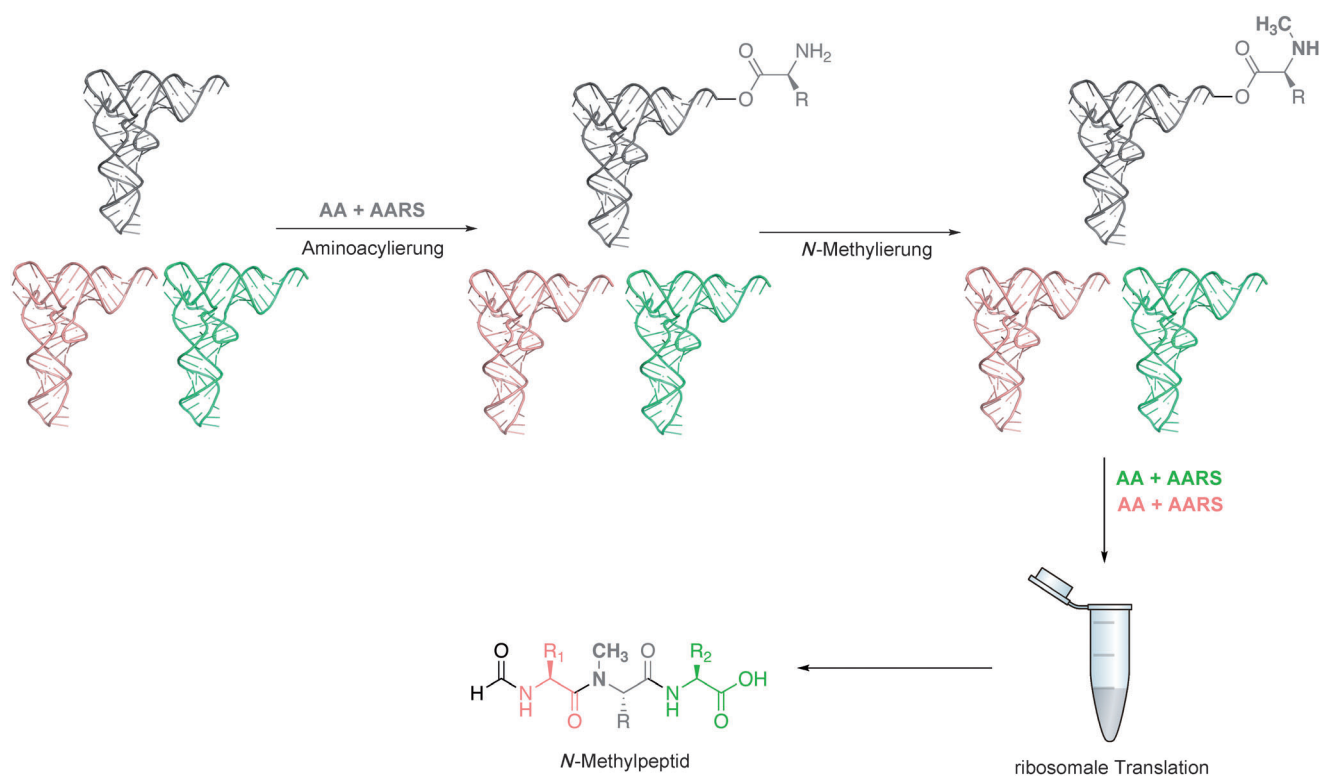
Die Zweckmäßigkeit von *N*-methylierten Peptiden hat reges Interesse für die Entwicklung neuer Ansätze zu ihrer Synthese geweckt.<sup>[123]</sup> Danishefsky et al. zeigten erst kürzlich eine elegante epimerisierungsfreie Isonitrilkupplung (Abbildung 9b) für *N*-methylierte Peptide, wobei diese Methode für die Synthese von Cyclosporin A eingesetzt wurde. Letzteres wurde in mäßigen Ausbeuten von 54% erhalten.<sup>[121]</sup>

## 6. Ribosomale Synthese von *N*-methylierten Peptiden

Als Alternative zu der mühsamen Synthese von *N*-methylierten Peptiden haben Szostak et al. (unter dem Vorhaben, kombinatorische Bibliotheken von *N*-methylierten Peptiden zu erhalten) ein In-vitro-Translationssystem vorgeschlagen, das aus aufgereinigten rekombinanten Faktoren von *Escherichia coli* besteht. Mit dieser eleganten und zugleich einfachen Methode, in der das Translationssystem von *E. coli* mit chemisch synthetisierter *N*-methylierter Amino-



**Abbildung 9.** a) Cyclisierung von hoch *N*-methylierten Peptiden an der sterisch gehinderten *N*-methylierten Seitenkette.<sup>[120]</sup> b) Isonitrilkupplung zur Erhaltung eines *N*-methylierten Dipeptids über die Bildung von *N*-Thioformamid.<sup>[121]</sup> c) Biokompatible *N*-Methylierung zur Erhaltung von *N*-Methylaminoacyl-tRNA.<sup>[122]</sup>



**Abbildung 10.** Schematische Darstellung des ribosomalen Einbaus von N-Methylaminosäuren in Peptide. Die tRNA wird mit der gewünschten N-methylierten Aminosäure beladen und dann anstelle der entsprechenden natürlichen Aminosäure und Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AARS) zum In-vitro-Translati...  
Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [124], Copyright 2008 American Chemical Society.

acyl-tRNA (Abbildung 9c und 10) kombiniert wird, konnte ein dreifach N-methyliertes Peptid synthetisiert werden.<sup>[124]</sup> Eines der besten Beispiele ist die Methode von Suga et al., bei der ein ähnlicher Ansatz wie jener von Szostak et al. verfolgt wurde, jedoch mit dem Einsatz eines Ribozyms genannt Flexizyme,<sup>[125]</sup> um die nicht-kanonischen Aminoacyl-tRNAs bereitzustellen. Erst kürzlich beschrieben die Autoren den signifikanten Vorteil ihrer In-vitro-Translati...  
Damit wurde gezeigt, dass es möglich ist, makrocyclische N-methylierte kombinatorische Bibliotheken zu generieren, um das Potential N-methylierter Peptide in der Interaktion mit neuen Protein-Protein-Wechselwirkungen zu analysieren. Diese ribosomale Synthese ist jedoch momentan nicht auf alle Aminosäuren anwendbar (z. B. nicht auf geladene oder  $\beta$ -verzweigte Seitenketten), und die Ausbeuten sind im Vergleich zur chemischen Synthese gering. Trotzdem erlaubt diese Methode die Untersuchung von Strukturen, die bei Bedarf dann auf andere Weise in größerer Menge hergestellt werden können.

## 7. Prolin als „Mimetikum der N-Methylierung“ in Proteinen

Prolin nimmt durch seine cyclische Struktur eine einzigartige Rolle unter den ribosomal codierten Aminosäuren ein und ist oft in Schleifenstrukturen von Proteinen vorhanden.<sup>[127]</sup> Die Fähigkeit von tertiären Amidbindungen, zu erheblichen Mengen auch die *cis*-Konformation einzunehmen (siehe Abschnitt 8), wird von Proteinen durch den Einbau eines Prolins (nicht durch eine N-methylierte Aminosäure) umgesetzt. Viele Peptidbindungen an der N-terminalen Seite der Proline in Proteinen sind *cis*-konfiguriert, wobei die *cis-trans*-Isomerisierung als Regulationselement von Funktionen verwendet werden kann.<sup>[128,129]</sup> Des Weiteren hat Prolin einen konformativ ähnlichen Einfluss auf Peptide wie N-methylierte Aminosäuren (siehe unten).<sup>[130]</sup> Umgekehrt können Prolin enthaltende, bioaktive Peptide durch den synthetischen Einbau von N-methylierten Aminosäuren modifiziert werden.

## 8. Einfluss der N-Methylierung auf Peptide

### 8.1. Konformative Veränderungen

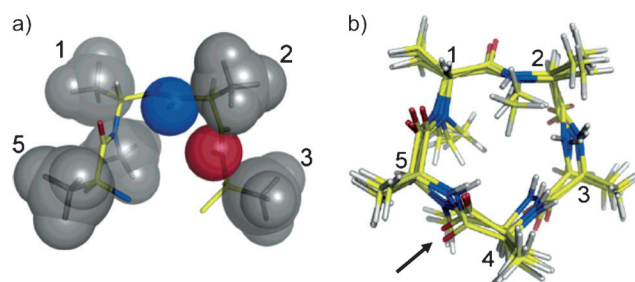
Peptide sind im Allgemeinen durch die niedrigen Rotationsbarrieren der zwei Bindungen neben der Peptidbindung (Diederwinkel  $\phi$  zwischen N und  $C_\alpha$  und Winkel  $\psi$  zwischen  $C_\alpha$  und CO) sehr flexibel. Sterische Effekte, sowie konfor...

mative Rigidität als Folge der Ausbildung der Sekundärstruktur oder einer Cyclisierung, schränken die konformative Vielfalt stark ein. In der Regel bevorzugen jedoch kleine lineare Peptide nicht eine einzige Konformation. In dieser Hinsicht unterscheiden sich Peptide meist von den „niedermolekularen Wirkstoffen“, die weniger rotierbare Bindungen aufweisen.<sup>[131]</sup> Konformative Flexibilität ist aber üblicherweise eine unerwünschte Eigenschaft von Liganden, da ein Ensemble von Konformationen durch entropische Effekte zu niedriger Affinität und Selektivität für Rezeptorsubtypen, wie z. B. bei Subtypen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), führt. Auf der anderen Seite erlaubt Flexibilität die Adaption verschiedener Formen, wodurch mit einer höheren Wahrscheinlichkeit (niedrig affine) Liganden gefunden werden können, die anschließend zu rigideren und selektiveren Liganden mit höherer Affinität optimiert werden können.

Obwohl die *N*-Methylierung von Peptidbindungen Einzug in die Wirkstoffforschung genommen hat, kam der Untersuchung der Konformation von cyclischen *N*-methylierten Peptiden weniger Aufmerksamkeit zu. Erstens führt die *N*-Methylierung in diesem Zusammenhang zu einem erhöhten sterischen Anspruch, der das *cis-trans*-Gleichgewicht der *N*-methylierten Peptidbindung beeinflusst.<sup>[132]</sup> Zusätzlich können sterische Hinderungen zwischen der *N*-Methylgruppe und der Aminosäureseitenkette die Peptidkonformation beeinträchtigen. Dabei bestimmt die *N*-Methylierung nicht nur die Konformation der betroffenen Aminosäure, sondern auch die der benachbarten Reste<sup>[133]</sup> und führt daher besonders in cyclischen Peptiden zu erheblichen Veränderungen im Peptidrückgrat. Zweitens werden Wasserstoffbrücken, an denen eine Peptidbindung beteiligt ist, selbstverständlich gebrochen, sobald diese *N*-methyliert sind. Bei kleineren Peptiden, bei denen intramolekulare Wasserstoffbrücken keine wesentliche Rolle spielen, scheint jedoch der sterische Einfluss zu dominieren. Diese Effekte gelten allerdings nicht allgemein, da sie auch von der spezifischen Sequenz und Struktur abhängig sind.

Neben der sterischen Hinderung ist die bevorzugte parallele Orientierung der CO- (*i*) und der CH-Bindungsvektoren (*i* + 1) ein weiterer wichtiger Faktor, der die Peptidkonformation bestimmt.<sup>[134]</sup> Diese Faktoren tragen letztendlich auch zur Abweichung von den Standardtorsionswinkeln von  $\beta$ -Faltblättern in *N*-methylierten Peptiden bei. Es muss beachtet werden, dass in kleinen *N*-methylierten oder nicht *N*-methylierten Cyclopeptiden die Ausbildung zu Schleifen viel mehr durch die Chiralität der entsprechenden Aminosäuren und deren sterischer Wechselwirkung bestimmt werden (Abbildung 11), als durch die Möglichkeit zur Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken.<sup>[135]</sup>

Studien unserer Gruppe an cyclischen Alaninpenta- und Alaninhexapeptiden haben nicht nur geholfen, das Verhalten der Peptidrückgratkonformation bei *N*-Methylierung zu verstehen, sondern lieferten auch neue Templatstrukturen,<sup>[136,137]</sup> die für das räumliche Screening von bioaktiven Peptiden verwendet werden können.<sup>[138]</sup> Bei diesem Konzept wird die bioaktive Aminosäuresequenz, der „Pharmakophor“, Schritt für Schritt in jede Position eines gegebenen Templats eingeführt und durch anschließende Bestimmung der biolo-



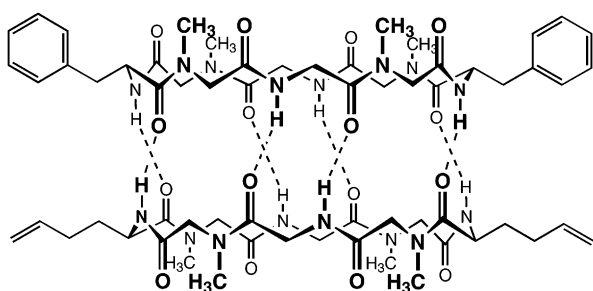
**Abbildung 11.** a) Ein Ausschnitt aus der Konformation von cyclo-(NMe-D-Ala¹-Ala²-Ala³-Ala⁴-Ala⁵) zeigt erlaubte (blau) und unerlaubte Bereiche (rot), wo eine *N*-Methylgruppe eingeführt werden kann, ohne die Bildung einer *cis*-Peptidbindung zu induzieren. b) Die gemeinsame Darstellung der verschiedenen *N*-methylierten Analoga von cyclo-(D-Ala¹-L-Ala⁴) zeigt ähnliche Strukturelemente. Das Umklappen der Ala⁴-Ala³-Peptidbindung durch gemeinsame Rotation der anliegenden  $\phi$ - und  $\psi$ -Bindungen kann der *N*-Methylierung zugeschrieben werden und ermöglicht die sterische Passform der *N*-Methylgruppe.

gischen Aktivität die optimale Konformation des Liganden identifiziert. Das wesentliche Ergebnis dieser Studie war der stabilisierende Effekt der *N*-methylierten D-Aminosäure auf die Rückgratkonformation von cyclischen Peptiden. Dies wurde später auch durch McAlpine et al. bestätigt,<sup>[139]</sup> die die Nützlichkeit dieser Methode beim rationalen Design von *N*-methylierten Sansalvamid-A-Analoga, die wirksamer als bereits auf dem Markt vorhandene Wirkstoffe bei der Behandlung wirkstoffresistenter kolorektaler Karzinome waren, gezeigt haben.<sup>[140]</sup>

Die Relevanz von sterischen Effekten bei der Bestimmung der Konformation und des *cis/trans*-Gleichgewichts wird beim Vergleich der Konformationen der drei Peptide *c*-(RGDFK-), *c*-(RGDFNMeK-) und *c*-(RGDFNMeV-) (Cilengitid) deutlich. Wie erwartet, weist das nicht *N*-methylierte Stammpeptid ausschließlich die all-*trans*-Konformation auf. Die Einführung der *N*-Methylierung am Lysinrest führt zu einer 15-proz. Population der *N*-methylierten *cis*-Peptidbindung, während im Fall von Cilengitid mit NMeVal als sterisch anspruchsvollere,  $\beta$ -verzweigte Aminosäure keine *cis*-Peptidbindung zu beobachten war.<sup>[141]</sup> Des Weiteren wurde gezeigt, dass *N*-methylierte Reste in bestimmten Positionen einen ähnlichen konformativen Einfluss auf das Cyclopeptidrückgrat wie Prolin haben können.<sup>[130]</sup> Dies ist allerdings nicht allgemein gültig.

## 8.2. Unterbinden von Wasserstoffbrücken

Wir haben bereits zuvor erwähnt, dass die *N*-Methylierung durch Substitution von NH-Gruppen, die an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, mit NCH<sub>3</sub>-Gruppen zur Verhinderung der Aggregation von Peptiden zu  $\beta$ -Faltblättern (Fibrillenbildung) verwendet werden kann.<sup>[98–102]</sup> Dieser Effekt wurde auch von Ghadiri et al. bei der Inhibierung der Nanoröhrenbildung durch cyclische D,L-Peptide genutzt. Die fortlaufend wechselnde Orientierung der Amidbindung nach oben und nach unten führt in diesen Peptiden zu einer Stapelung, die durch *N*-Methylierung jeder zweiten Amidbindung unterdrückt werden kann (Abbildung 12).<sup>[142–144]</sup>



**Abbildung 12.** Schematische Darstellung der selektiven Organisation von dimeren *N*-methylierten Cyclopeptiden. Die *N*-Methylierung verhindert die Assoziation von weiteren Cyclopeptiden auf jeder Seite des Dimers durch Blockade der Bildung von Wasserstoffbrücken. Die olefinischen Seitenketten wurden für weitere chemische Modifikationen eingeführt. Abdruck mit Genehmigung aus Lit. [144].

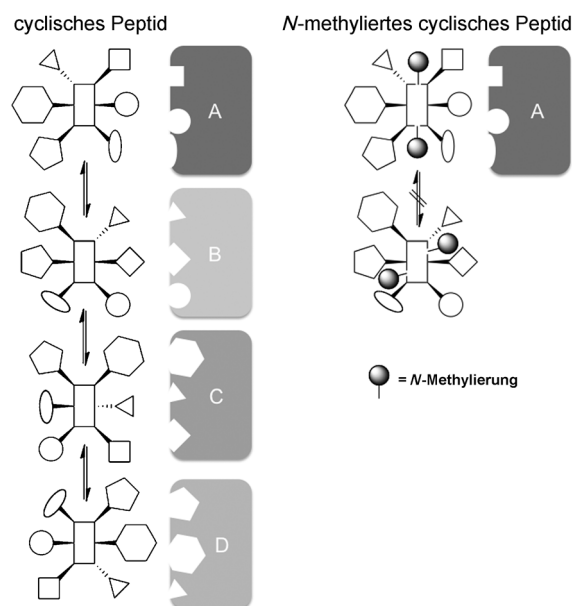
### 8.3. Rezeptorsubtypenselektivität

Im Laufe der Evolution führte die Differenzierung von Rezeptoren in Subtypen durch geeignete Selektion von Mutanten häufig zur Erkennung von unterschiedlichen Konformationen der Liganden. Flexible (lineare) Peptide können sich üblicherweise an all diese Rezeptoren anpassen, was oft zu äußerst kleinen Unterschieden in den Bindungsaffinitäten an die Subtypen führt. Unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Rezeptorsubtypen lassen sich häufig durch Postulieren von weiteren Bindungsstellen („exosites“) erklären. Oft binden diese Subtypen die Liganden jedoch in unterschiedlichen Konformationen. Die Zugänglichkeit von jenen Konformationen durch verschiedene Liganden könnte auch die Präferenz der Subtypen bestimmen. Geeignete konformative Einschränkung durch Cyclisierung, Einbau von starren nichtpeptidischen Fragmenten (Peptidomimetika)<sup>[145]</sup> oder *N*-Methylierung (Abbildung 13) können zu superaktiven und -selektiven Liganden für bestimmte Rezeptorsubtypen führen.<sup>[146–148]</sup> Die RGD-Zelladhäsionssequenz<sup>[149]</sup> ist dafür ein repräsentatives Beispiel: Das Glycin in der Mitte ist ein typischer Rest, der die Rolle einer D- oder L-Aminosäure einnehmen kann und wird von der Natur als flexibles Element verwendet. Einschränkung der Konformation dieser Peptidsequenz in cyclischen Peptiden führte zu hoher Selektivität zwischen den Integrinsubtypen  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  oder  $\alpha5\beta1$  gegenüber dem Blutplättchenintegrin  $\alphaIIb\beta3$ .<sup>[74,150]</sup> Gleichzeitig wurde eine D-Aminosäure eingebaut, um eine bestimmte Rückgrat-Konformation zu bevorzugen. Schließlich führte durch die *N*-Methylierung der Wirkstoffkandidat Cilengitid entwickelt.<sup>[73,77]</sup>

Die *N*-Methylierung führte so zur Selektivität für einen bestimmten Rezeptorsubtyp.<sup>[146–148]</sup> Dies ist eine wichtige Voraussetzung für biologische Untersuchungen der Signalwege.

### 8.4. Orale Bioverfügbarkeit und Zellpermeabilität

Der erfolgreiche Übergang von In-vitro- zu In-vivo- oder zellulären Studien im Zusammenhang mit der biologischen Reaktion auf ein *N*-methyliertes Peptid hängt von der Ver-



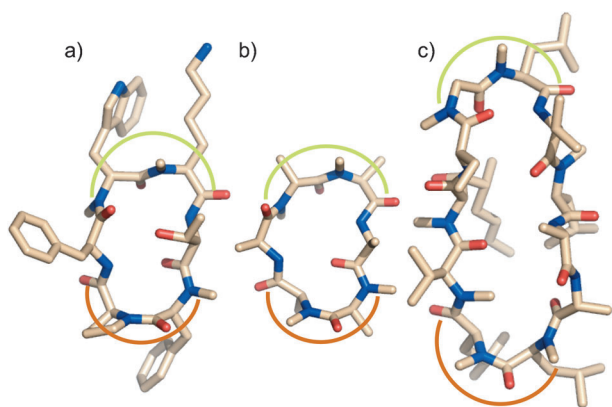
**Abbildung 13.** Schematische Darstellung des Einflusses der *N*-Methylierung von cyclischen Peptiden auf die Rezeptorsubtypenselektivität. A, B, C und D repräsentieren Rezeptorsubtypen. Einschränkung der konformativen Freiheit von Cyclopeptiden über sterische Blockade der konformativen Umwandlung erlaubt ausschließlich die Bindung an Rezeptorsubtyp A.

fügbarekeit einer ausreichenden Menge des Peptids am Zielort ab. Daher müssen die ausgewählten *N*-methylierten Peptide nicht nur die Barriere biologischer Membranen überwinden, sondern auch ausreichende Stabilität gegen den metabolischen Abbau aufweisen. Obwohl oft die *N*-Methylierung zusammen mit der Cyclisierung und/oder dem Einbau von D-Aminosäuren den Peptiden metabolische Stabilität gegen enzymatischen Abbau verleiht, ist ihr Einfluss auf die zelluläre und intestinale Permeabilität der Peptide nicht vollständig geklärt. Zwei Mechanismen, nämlich der parazelluläre<sup>[151]</sup> und der transzelluläre<sup>[152]</sup> (passiv, vermittelt durch Membrantransporter und vesikulär), agieren synergistisch beim Transport von Peptiden durch das intestinale Epithel. Auf der anderen Seite vermindern Effluxpumpen,<sup>[153]</sup> wie z.B. MDR 1, die intrazelluläre Anreicherung oder den transzellulären Durchfluss von einer Vielzahl an Wirkstoffen einschließlich Peptiden, wodurch die Prognose über die Veränderung der zellulären Permeabilität durch *N*-Methylierung erschwert wird. Dennoch liefern neue Studien mit *N*-methylierten Cyclopeptiden eindeutige Hinweise, dass die *N*-Methylierung die intestinale Permeabilität von Peptiden erhöht,<sup>[154–156]</sup> was zu einer besseren oralen Bioverfügbarkeit führt. Es wurde gezeigt, dass die Erhöhung der Permeabilität von *N*-methylierten Peptiden von ihrer Fähigkeit, Wasserstoffbrücken bilden zu können, und der Konformation, Größe und Ladung beeinflusst wird.<sup>[157–159]</sup> Lokey et al. haben oral bioverfügbare Template von Cyclopeptiden identifiziert, die nahezu ausschließlich sehr lipophile Aminosäuren beinhalten und klar definierte Schleifenmotive mit internen Wasserstoffbrücken und extern orientierten (lösungsmittlexponierten) *N*-methylierten Peptidbindungen aufweisen. Diese Beobachtung suggeriert, dass jene Parameter entscheidende



Stellschrauben für die Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Peptiden durch Versteifung der Konformation des Cyclopeptidrückgrats sind.<sup>[160]</sup> Es bekräftigt zudem unsere früheren Studien, in denen wir ähnliche Templatstrukturen (mit veränderten physikochemischen Eigenschaften) mit akzeptabler oraler Bioverfügbarkeit und erhöhter intestinaler Permeabilität beobachten konnten.<sup>[161]</sup> In diesen Untersuchungen haben wir erfolgreich ein biologisch aktives Peptid in ein dreifach *N*-methyliertes Derivat überführt, das seine Aktivität für zwei Somatostatinrezeptorsubtypen fast vollständig erhalten konnte und zudem gegen proteolytischen Abbau in Serum und Darm beständig war. Des Weiteren zeigte das *N*-methylierte Analogon eine orale Verfügbarkeit von 10% in Ratten. Bei diesem scheinbar geringen Prozentsatz sollte man im Auge behalten, dass mehrere auf dem Markt erhältliche Medikamente eine orale Bioverfügbarkeit in diesem Bereich aufweisen.

Kürzlich haben wir in einer Modellstudie mit einer Bibliothek von *N*-methylierten cyclischen Alaninpeptiden die Bedeutung einer bevorzugten Rückgratkonformation durch *N*-Methylierung für die Erhöhung der intestinalen Permeabilität des Cyclopeptids gezeigt.<sup>[156]</sup> Obwohl der eigentliche Transportmechanismus der hoch permeablen, *N*-methylierten Peptide nicht geklärt werden konnte, wurden zwei entscheidende Schleifenstrukturen aufgefunden, welche für den schnellen Transport der Peptide durch die Caco-2-Membran verantwortlich sind (Abbildung 14). Zudem scheint der



**Abbildung 14.** a) Konformation des oral bioverfügbaren Somatostatin-Analogons cyclo-(NMe-D-Trp-NMeLys-Thr-NMePhe-Pro-Phe-). b) Konformation des hoch Caco-2-permeablen *N*-methylierten cyclischen Alaninpeptids cyclo-(NMe-D-Ala-NMeAla-Ala-NMeAla-NMeAla-Ala-). c) Konformation von Cyclosporin A. Die strukturelle Ähnlichkeit in den Schleifen aller drei *N*-methylierter Cyclopeptide ist klar zu erkennen. Die Wasserstoffatome sind zum besseren Verständnis nicht dargestellt. Die zwei entscheidenden Schleifen sind jeweils hervorgehoben.

Effekt der Minimierung der Polarität eines Peptids durch *N*-Methylierung überschätzt zu sein, da wir darin gescheitert sind, eine Korrelation zwischen der abnehmenden Polarität und der steigenden Anzahl der *N*-Methylierungen zu finden.<sup>[156]</sup> Es ist durchaus erwähnenswert, dass das zuvor beschriebene Cyclopeptid Cyclosporin A, das zu 19% oral verfügbar ist, eine klar definierte Schleifenstruktur mit seinen extern orientierten, lösungsmittel-exponierten, *N*-methylierten

Amidbindungen aufweist, wobei dieses Muster in mehreren Alaninpeptiden vorhanden war, die Caco-2-permeabel waren. Diese Studien zeigen zum ersten Mal die Relevanz einer definierten Rückgratkonformation für die Caco-2-Permeabilität. Trotzdem muss diese Hypothese auch durch Bestimmung der oralen Bioverfügbarkeit in Tiermodellen geprüft werden.

## 9. Ausblick

Die meisten heutzutage entwickelten peptidischen Wirkstoffe zielen auf Rezeptoren ab, die in die Zellmembran eingebunden sind (z.B. GPCRs, Integrine). In diesem Fall muss das Peptid nämlich „lediglich“ die intestinale Barriere überwinden und metabolische Stabilität während des Durchgangs durch die Leber sowie im Blutserum garantieren. In Konkurrenz zu den Peptiden entwickelte sich ein reges Interesse an der Entwicklung von niedermolekularen Verbindungen für die Blockade von Protein-Protein-Wechselwirkungen<sup>[162]</sup> oder für die Identifizierung von neuen Proteinliganden, wie bei strukturbasierten Screenings im Zellinneren.<sup>[163]</sup> Obwohl sich diese Moleküle als großartige Hilfsmittel zur Untersuchung der Funktionen von Proteinen in biologischen System erwiesen haben, interagieren die meisten niedermolekularen Verbindungen aufgrund ihrer Lipophilie auch mit anderen Biomolekülen.<sup>[164]</sup> Auf der anderen Seite zeigen Peptide mit ihren etwas größeren Strukturen eine beachtliche Rezeptorselektivität. Die Nützlichkeit von Peptiden in chemisch-genetischen Screenings<sup>[165]</sup> ist jedoch aufgrund ihrer mangelnden Zellpermeabilität limitiert. Obwohl dies allgemein für Peptide gilt, rufen einige zuvor beschriebene, natürliche *N*-methylierte Peptide erst dann einen bestimmten Phänotyp hervor, sobald sie die Zellmembran durchlaufen haben oder zytoplasmatische und/oder nukleoplasmatische Verteilung aufweisen, wobei es sich um einen weiteren kritischen Parameter beim Aufspüren von intrazellulären Zielstrukturen mit Peptiden handelt.<sup>[166]</sup> Es bedarf noch weiterer Studien, um den Mechanismus der Aufnahme und den Einfluss der *N*-Methylierung auf die zelluläre Permeabilität begreifen zu können. Es handelt sich dabei um ein Problem, das für die Verwendbarkeit von *N*-methylierten Peptiden in vollem Umfang gelöst werden muss. Peptide galten zwar lange Zeit als attraktive Kandidaten für das Design von Liganden für extrazelluläre Rezeptoren, ihre Anwendbarkeit als Wirkstoffe war jedoch aufgrund ihrer unvorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften stets begrenzt. Auf der anderen Seite zeigte die *N*-Methylierung, als einfache Modifikation des Peptidrückgrats, ihren Vorteil im Verbessern der pharmakokinetischen Eigenschaften von natürlichen Peptiden, was die *N*-Methylierung als vielversprechendes Mittel in der zukünftigen Wirkstoffentwicklung erscheinen lässt. Obwohl der Fortschritt in der „omics“-Forschung die Möglichkeit zur Untersuchung einer Vielzahl von Protein-Protein-, Protein-DNA- und Protein-RNA-Wechselwirkungen mit sich gebracht hat, ist die Anzahl neuer Verbindungen als Wirkstoffe stark gesunken, was die Entwicklung von neuen Molekülen für die Erweiterung des existierenden chemischen Raums nötig macht. Daher bieten Pep-

tide mit ihren einzigartigen konformativen Eigenschaften und ihrer funktionellen Vielfalt, die zudem durch N-Methylierung, Cyclisierung und den Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren erweitert werden kann, eine einzigartige Möglichkeit, den bioaktiven und wirkstoffähnlichen Raum auszudehnen.

*Wir danken Prof. Luis Moroder und Dr. Carlos Mas-Moruno für hilfreiche Kommentare beim Korrekturlesen dieses Manuskripts.*

Eingegangen am 17. Juli 2012

Online veröffentlicht am 19. November 2012

- [1] A. D. Goldberg, C. D. Allis, E. Bernstein, *Cell* **2007**, *128*, 635–638.
- [2] G. Egger, G. N. Liang, A. Aparicio, P. A. Jones, *Nature* **2004**, *429*, 457–463.
- [3] T. Kouzarides, *Cell* **2007**, *128*, 693–705.
- [4] M. Esteller, *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1148–1159.
- [5] M. G. Marinus, J. Casadesus, *FEMS Microbiol. Rev.* **2009**, *33*, 488–503.
- [6] A. P. Feinberg, *Nature* **2007**, *447*, 433–440.
- [7] S. Chuikov, J. K. Kurash, J. R. Wilson, B. Xiao, N. Justin, G. S. Ivanov, K. McKinney, P. Tempst, C. Prives, S. J. Gamblin, N. A. Barlev, D. Reinberg, *Nature* **2004**, *432*, 353–360.
- [8] R. J. Sims III, D. Reinberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 815–820.
- [9] C. E. Schaner-Tooley, J. J. Petkowski, T. L. Muratore-Schroeder, J. L. Balsbaugh, J. Shabanowitz, M. Sabat, W. Minor, D. F. Hunt, I. G. Macara, *Nature* **2010**, *466*, 1125–1128.
- [10] T. Chen, T. L. Muratore, C. E. Schaner-Tooley, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, I. G. Macara, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 596–603.
- [11] Y. Hao, I. G. Macara, *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 827–836.
- [12] K. J. Webb, R. S. Lipson, Q. Al-Hadid, J. P. Whitelegge, S. G. Clarke, *Biochemistry* **2010**, *49*, 5225–5235.
- [13] A. P. Feinberg, B. Tycko, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 143–153.
- [14] P. Chi, C. D. Allis, G. G. Wang, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 457–469.
- [15] Y. Shi, J. R. Whetstone, *Mol. Cell* **2007**, *25*, 1–14.
- [16] M. T. Bedford, S. G. Clarke, *Mol. Cell* **2009**, *33*, 1–13.
- [17] B. Chang, Y. Chen, Y. Zhao, R. K. Bruick, *Science* **2007**, *318*, 444–447.
- [18] T. Jenuwein, C. D. Allis, *Science* **2001**, *293*, 1074–1080.
- [19] A. Dhall, C. Chatterjee, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 987–999.
- [20] S. V. Sharma, D. Y. Lee, B. H. Li, M. P. Quinlan, F. Takahashi, S. Maheswaran, U. McDermott, N. Azizian, L. Zou, M. A. Fischbach, K. K. Wong, K. Brandstetter, B. Wittner, S. Ramaswamy, M. Classon, J. Settleman, *Cell* **2010**, *141*, 69–80.
- [21] S. A. Jacobs, S. Khorasanizadeh, *Science* **2002**, *295*, 2080–2083.
- [22] A. E. Desjardins, R. H. Proctor, *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 47–50.
- [23] P. A. Plattner, U. Nager, *Helv. Chim. Acta* **1948**, *31*, 665–671.
- [24] M. Kamyar, P. Rawnduzi, C. R. Studenik, K. Kouri, R. Lemmens-Gruber, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *429*, 215–223.
- [25] R. Dornetshuber, P. Heffeter, M. R. Kamyar, T. Peterbauer, W. Berger, R. Lemmens-Gruber, *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 465–473.
- [26] U. Hyun, D. H. Lee, C. Lee, C. G. Shin, *Toxicol.* **2009**, *53*, 723–728.
- [27] K. Hiraga, S. Yamamoto, H. Fukuda, N. Hamanaka, K. Oda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 1119–1125.
- [28] A. Kralli, K. R. Yamamoto, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17152–17156.
- [29] R. J. Arceci, K. Stieglitz, B. E. Bierer, *Blood* **1992**, *80*, 1528–1536.
- [30] J. E. Coleman, E. D. de Silva, F. Kong, R. J. Andersen, T. M. Allen, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10653–10662.
- [31] R. Talpir, Y. Benayahu, Y. Kashman, L. Pannell, M. Schleyer, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4453–4456.
- [32] W. R. Gamble, N. A. Durso, R. W. Fuller, C. K. Westergaard, T. R. Johnson, D. L. Sackett, E. Hamel, J. H. Cardellina II, M. R. Boyd, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1611–1615.
- [33] G. Kuznetsov, K. TenDyke, M. J. Towle, H. Cheng, J. Liu, J. P. Marsh, S. E. Schiller, M. R. Spyvee, H. Yang, B. M. Seletsky, C. J. Shaffer, V. Marceau, Y. Yao, E. M. Suh, S. Campagna, F. G. Fang, J. J. Kowalczyk, B. A. Littlefield, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 2852–2860.
- [34] F. Loganzo, C. M. Discafani, T. Annable, C. Beyer, S. Musto, M. Hari, X. Tan, C. Hardy, R. Hernandez, M. Baxter, T. Singanallor, G. Khafizova, M. S. Poruchynsky, T. Fojo, J. A. Nieman, S. Ayral-Kaloustian, A. Zask, R. J. Andersen, L. M. Greenberger, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1838–1845.
- [35] C. M. Rocha-Lima, S. Bayraktar, J. Macintyre, L. Raez, A. M. Flores, A. Ferrell, E. H. Rubin, E. A. Poplin, A. R. Tan, A. Lucarelli, N. Zojwalla, *Cancer* **2012**, DOI: 10.1002/cncr.27428.
- [36] M. A. Jordan, L. Wilson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 253–265.
- [37] R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser, H. Zähler, *Helv. Chim. Acta* **1957**, *40*, 199–204.
- [38] S. Dawson, J. P. Malkinson, D. Paumier, M. Searcey, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 109–126.
- [39] G. G. Gause, Jr., N. P. Loshkareva, I. B. Zbarsky, *Biochim. Biophys. Acta Nucleic Acids Protein Synth.* **1968**, *166*, 752–754.
- [40] A. Y. Chang, K. Kim, H. Boucher, P. Bonomi, J. A. Stewart, D. D. Karp, R. H. Blum, *Cancer* **1998**, *82*, 292–300.
- [41] D. Kong, E. J. Park, A. G. Stephen, M. Calvani, J. H. Cardellina, A. Monks, R. J. Fisher, R. H. Shoemaker, G. Melillo, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9047–9055.
- [42] X. Sun, J. R. Kanwar, E. Leung, K. Lehnert, D. Wang, G. W. Krissansen, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 638–645.
- [43] Q. Zhang, Z. F. Zhang, J. Y. Rao, J. D. Sato, J. Brown, D. V. Messadi, A. D. Le, *Int. J. Cancer* **2004**, *111*, 849–857.
- [44] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [45] F. Romero, F. Espliego, J. Pérez Baz, T. García de Quesada, D. Grávalos, F. de La Calle, J. L. Fernández-Puentes, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 734–737.
- [46] E. Erba, D. Bergamaschi, S. Ronzoni, M. Fareta, S. Taverna, M. Bonfanti, C. V. Catapano, G. Faircloth, J. Jimeno, M. D'Incalci, *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 971–980.
- [47] D. Bergamaschi, M. Fareta, S. Ronzoni, S. Taverna, P. De Feudis, M. Bonfanti, G. Guidi, M. Faircloth, J. Jimeno, M. D'Incalci, E. Erba, *Eur. J. Histochem.* **1997**, *41*, 63–64.
- [48] E. F. Brandon, R. W. Sparidans, I. Meijerman, I. Manzanares, J. H. Beijnen, J. H. Schellens, *Invest. New Drugs* **2004**, *22*, 241–251.
- [49] J. Tulla-Puche, E. Marcucci, E. Prats-Alfonso, N. Bayó-Puxan, F. Albericio, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 834–839.
- [50] R. Pföh, J. A. Cuesta-Seijo, G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. F* **2009**, *65*, 660–664.
- [51] K. S. Lam, D. R. Gustavson, G. A. Hesler, T. T. Dabrah, J. A. Matson, R. L. Berry, W. C. Rose, S. Forenza, *J. Ind. Microbiol.* **1995**, *15*, 60–65.
- [52] J. Kitagaki, Y. Yang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *414*, 186–191.
- [53] S. D. Jolad, J. J. Hoffmann, S. J. Torrance, R. M. Wiedhopf, J. R. Cole, S. K. Arora, R. B. Bates, R. L. Gargiulo, G. R. Kriek, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8040–8044.
- [54] R. A. Tobey, D. J. Orlicky, L. L. Deaven, L. B. Rall, R. J. Kisanine, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 4415–4421.

- [55] M. Zalacain, E. Zaera, D. Vázquez, A. Jiménez, *FEBS Lett.* **1982**, *148*, 95–97.
- [56] T. Kato, Y. Suzumura, S. Takamoto, K. Ota, *Anticancer Res.* **1987**, *7*, 329–334.
- [57] Y. Hitotsuyanagi, J. E. Lee, S. Kato, I. H. Kim, H. Kohashi, H. Fukaya, K. Takeya, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2458–2463.
- [58] M. Dreyfuss, E. Harri, H. Hoffmann, H. Kobel, W. Pache, H. Tschertter, *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1976**, *3*, 125–133.
- [59] J. F. Borel, C. Feurer, C. Magnée, H. Stähelin, *Immunology* **1977**, *32*, 1017–1025.
- [60] J. Liu, J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- [61] H. Kessler, H. R. Loosli, H. Oschkinat, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 661–681.
- [62] H. R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weber, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682–704.
- [63] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1083–1084.
- [64] H. Kessler, M. Köck, T. Wein, M. Gehrke, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1818–1832.
- [65] J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, *Chem-BioChem* **2005**, *6*, 1672–1678.
- [66] S. W. Fesik, R. T. Gampe, Jr., T. F. Holzman, D. A. Egan, R. Edalji, J. R. Luly, R. Simmer, R. Helfrich, V. Kishore, D. H. Rich, *Science* **1990**, *250*, 1406–1409.
- [67] C. Weber, B. Wider, B. von Freyberg, R. Traber, W. Braun, H. Widmer, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6563–6574.
- [68] S. W. Fesik, R. T. Gampe, Jr., H. L. Eaton, G. Gemmecker, E. T. Olejniczak, P. Neri, T. F. Holman, D. A. Egan, R. Edalji, R. Simmer, R. Helfrich, J. Hochlowski, M. Jackson, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6574–6583.
- [69] S. W. Fesik, P. Neri, R. Meadows, E. T. Olejniczak, G. Gemmecker, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3165–3166.
- [70] C. Spitzfaden, H. P. Weber, W. Braun, J. Kallen, G. Wider, H. Widmer, M. D. Walkinshaw, K. Wüthrich, *FEBS Lett.* **1992**, *300*, 291–300.
- [71] J. Kallen, C. Spitzfaden, M. G. M. Zurini, G. Wider, H. Widmer, K. Wüthrich, M. D. Walkinshaw, *Nature* **1991**, *353*, 276–279.
- [72] G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, F. X. Schmid, *Nature* **1989**, *337*, 476–478.
- [73] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768.
- [74] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- [75] J. P. Xiong, T. Stehle, R. G. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaut, *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [76] L. Marinelli, A. Lavecchia, K.-E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4393–4404.
- [77] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040.
- [78] M. Brogini, S. V. Marchini, E. Galliera, P. Borsotti, G. Tarabozetti, E. Erba, M. Sironi, J. Jimeno, G. T. Faircloth, R. Giavazzi, M. D'Incalci, *Leukemia* **2003**, *17*, 52–59.
- [79] G.-M. Suarez-Jimenez, A. Burgos-Hernandez, J.-M. Ezquerro-Brauer, *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 963–986.
- [80] G. Andavan, R. Lemmens-Gruber, *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 810–834.
- [81] L. F. García-Fernández, A. Losada, V. Alcaide, A. M. Álvarez, A. Cuadrado, L. González, K. Nakayama, K. I. Nakayama, J. M. Fernández-Sousa, A. Muñoz, J. M. Sánchez-Puelles, *Oncogene* **2002**, *21*, 7533–7544.
- [82] C. Peschel, J. T. Hartmann, A. Schmitt, C. Bokemeyer, F. Schneller, U. Keilholz, D. Buchheidt, S. Millan, M. A. Izquierdo, R. D. Hofheinz, *Lung Cancer* **2008**, *60*, 374–380.
- [83] M. V. Mateos, M. T. Cibeira, P. G. Richardson, F. Prosper, A. Oriol, J. de La Rubia, J. J. Lahuerta, R. Garcia-Sanz, S. Extremera, S. Szyldergemajn, C. Corrado, H. Singer, C. S. Mitsiades, K. C. Anderson, J. Blade, J. San Miguel, *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 3260–3269.
- [84] E. Baudin, J. P. Droz, L. Paz-Ares, A. T. van Oosterom, M. Cullell-Young, M. Schlumberger, *Am. J. Clin. Oncol.* **2010**, *33*, 83–88.
- [85] H. Dumez, E. Gallardo, S. Culine, J. C. Galceran, P. Schoffski, J. P. Droz, S. Extremera, S. Szyldergemajn, A. Flechon, *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 451–463.
- [86] T. Eisen, J. Thomas, W. H. Miller, M. Gore, P. Wolter, P. Kavan, J. A. L. Martin, P. Lardelli, *Melanoma Res.* **2009**, *19*, 185–192.
- [87] P. Schöffski, V. Guillem, M. Garcia, F. Rivera, J. Tabernero, M. Cullell, J. A. Lopez-Martin, P. Pollard, H. Dumez, X. G. del Muro, L. Paz-Ares, *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 57–70.
- [88] <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01102426?term=aplidine&rank=3>.
- [89] G. R. Pettit, E. J. Flahive, M. R. Boyd, R. Bai, E. Hamel, R. K. Pettit, J. M. Schmidt, *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, *13*, 47–66.
- [90] L. M. Krug, V. A. Miller, G. P. Kalemkerian, M. J. Kraut, K. K. Ng, R. T. Heelan, B. A. Pizzo, W. Perez, N. McClean, M. G. Kris, *Ann. Oncol.* **2000**, *11*, 227–228.
- [91] U. Vaishampayan, M. Glode, W. Du, A. Kraft, G. Hudes, J. Wright, M. Hussain, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *11*, 4205–4208.
- [92] E. D. Saad, E. H. Kraut, P. M. Hoff, D. F. Moore, D. Jones, R. Pazdur, J. L. Abbruzzese, *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**, *25*, 451–453.
- [93] E. A. Perez, D. W. Hillman, P. A. Fishkin, J. E. Krook, W. W. Tan, P. A. Kuriakose, S. R. Alberts, S. R. Dakhil, *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 257–261.
- [94] H. L. Kindler, P. K. Tothy, R. Wolff, R. A. McCormack, J. L. Abbruzzese, S. Mani, K. T. Wade-Oliver, E. E. Vokes, *Invest. New Drugs* **2005**, *23*, 489–493.
- [95] K. Tamura, K. Nakagawa, T. Kurata, T. Satoh, T. Nogami, K. Takeda, S. Mitsuoka, N. Yoshimura, S. Kudoh, S. Negoro, M. Fukuoka, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 285–293.
- [96] S. Patel, M. L. Keohan, M. W. Saif, D. Rushing, L. Baez, K. Feit, R. DeJager, S. Anderson, *Cancer* **2006**, *107*, 2881–2887.
- [97] G. J. Riely, S. Gadgil, I. Rothman, B. Saidman, K. Sabbath, K. Feit, M. G. Kris, N. A. Rizvi, *Lung Cancer* **2007**, *55*, 181–185.
- [98] A. Kapurniotu, A. Schmauder, K. Tenidis, *J. Mol. Biol.* **2002**, *315*, 339–350.
- [99] M. Tatarek-Nossol, L. M. Yan, A. Schmauder, K. Tenidis, G. Westermarck, A. Kapurniotu, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 797–809.
- [100] L. M. Yan, M. Tatarek-Nossol, A. Velkova, A. Kazantzis, A. Kapurniotu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 2046–2051.
- [101] L. M. Yan, A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1268–1274; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1246–1252.
- [102] A. Velkova, M. Tatarek-Nossol, E. Andreetto, A. Kapurniotu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7222–7227; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7114–7118.
- [103] C. Adessi, M. J. Frossard, C. Boissard, S. Fraga, S. Bieler, T. Ruckle, F. Vilbois, S. M. Robinson, M. Mutter, W. A. Banks, C. Soto, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13905–13911.
- [104] R. Finking, M. A. Marahiel, *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [105] S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715–738.
- [106] D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 275–287.
- [107] H. von Döhren, U. Keller, J. Vater, R. Zocher, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2675–2706.
- [108] „Synthesis of N-Alkylated Peptides“: C. Gilon, M. A. Dechantsreiter, F. Burkhart, A. Friedler, H. Kessler in *Houben-Weyl: Methods of Organic Chemistry. Vol. E22c* (Hrsg.: M. Goodman, A. Felix, L. Moroder, C. Toniolo), Thieme, Stuttgart, **2003**, S. 215–271.

- [109] J. R. McDermott, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 2562–2570.
- [110] L. Aurelio, R. T. Brownlee, A. B. Hughes, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 5823–5846.
- [111] E. Marcucci, N. Bayó-Puxan, J. Tulla-Puche, J. Spengler, F. Albericio, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 69–78.
- [112] R. M. Freidinger, J. S. Hinkle, D. S. Perlow, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77–81.
- [113] S. C. Miller, T. S. Scanlan, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301–2302.
- [114] E. Biron, H. Kessler, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5183–5189.
- [115] E. Biron, J. Chatterjee, H. Kessler, *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 213–219.
- [116] J. Chatterjee, B. Laufer, H. Kessler, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 432–444.
- [117] M. Teixidó, F. Albericio, E. Giralt, *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 153–166.
- [118] W. J. Fang, M. A. Bennett, J. V. Aldrich, *Biopolymers* **2011**, *96*, 97–102.
- [119] E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, *J. Pept. Res.* **1999**, *53*, 507–517.
- [120] E. Marcucci, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 612–615.
- [121] X. Wu, J. L. Stockdill, P. Wang, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4098–4100.
- [122] C. Merryman, R. Green, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 575–582.
- [123] V. R. Pattabiraman, J. W. Bode, *Nature* **2011**, *480*, 471–479.
- [124] A. O. Subtelny, M. C. Hartman, J. W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6131–6136.
- [125] H. Murakami, A. Ohta, H. Ashigai, H. Suga, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 357–359.
- [126] Y. Yamagishi, I. Shoji, S. Miyagawa, T. Kawakami, T. Katoh, Y. Goto, H. Suga, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1562–1570.
- [127] G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1993**, *15*, 235–251.
- [128] M. J. Feige, S. Groscurth, M. Marcinowski, Z. T. Yew, V. Truffault, E. Paci, H. Kessler, J. Buchner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13373–13378.
- [129] M. J. Feige, S. Groscurth, M. Marcinowski, Y. Shimizu, H. Kessler, L. M. Hendershot, J. Buchner, *Mol. Cell* **2009**, *34*, 569–579.
- [130] B. Laufer, J. Chatterjee, A. O. Frank, H. Kessler, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 141–146.
- [131] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- [132] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1970**, *82*, 237–253; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 219–235.
- [133] F. Piriou, K. Lintner, S. Femandjian, P. Fromageot, M. C. Khosla, R. R. Smeby, F. M. Bumpus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 82–86.
- [134] M. Heller, M. Sukopp, N. Tsomaia, M. John, D. F. Mierke, B. Reif, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13806–13814.
- [135] J. P. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2393–2400.
- [136] J. Chatterjee, D. Mierke, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15164–15172.
- [137] J. Chatterjee, D. F. Mierke, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1508–1517.
- [138] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [139] P. S. Pan, K. L. McGuire, S. R. McAlpine, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5072–5077.
- [140] K. Otrubova, G. Lushington, D. Vander Velde, K. L. McGuire, S. R. McAlpine, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 530–544.
- [141] B. Laufer, A. O. Frank, J. Chatterjee, T. Neubauer, C. Mas-Moruno, G. Kummerlöwe, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5385–5390.
- [142] K. Kobayashi, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 79–81; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 95–98.
- [143] T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12364–12365.
- [144] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1016–1041; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988–1011.
- [145] A. Giannis, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267.
- [146] J. Chatterjee, O. Ovadia, G. Zahn, L. Marinelli, A. Hoffman, C. Gilon, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5878–5881.
- [147] L. Doedens, F. Opperer, M. Cai, J. G. Beck, M. Dedek, E. Palmer, V. J. Hruby, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8115–8128.
- [148] C. Mas-Moruno, J. G. Beck, L. Doedens, A. O. Frank, L. Marinelli, S. Cosconati, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9668–9672; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9496–9500.
- [149] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [150] T. Weide, A. Modlinger, H. Kessler, *Top. Curr. Chem. Bioact. Conform.* **2007**, *272*, 1–50.
- [151] M. S. Balda, L. Gonzalez-Mariscal, K. Matter, M. Cerejido, J. M. Anderson, *J. Cell Biol.* **1993**, *123*, 293–302.
- [152] M. Fujikawa, R. Ano, K. Nakao, R. Shimizu, M. Akamatsu, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4721–4732.
- [153] W. H. Peters, C. E. Boon, H. M. Roelofs, T. Wobbes, F. M. Nagengast, P. G. Kremers, *Gastroenterology* **1992**, *103*, 448–455.
- [154] O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon, A. Hoffman, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 479–487.
- [155] Q. G. Dong, Y. Zhang, M. S. Wang, J. Feng, H. H. Zhang, Y. G. Wu, T. J. Gu, X. H. Yu, C. L. Jiang, Y. Chen, W. Li, W. Kong, *Amino Acids* **2012**, DOI: 10.1007/s00726-012-1322-y.
- [156] J. G. Beck, J. Chatterjee, B. Laufer, U. K. Marelli, A. O. Frank, S. Neubauer, O. Ovadia, S. Greenberg, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12125–12133.
- [157] D. C. Kim, P. S. Burton, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1710–1714.
- [158] G. M. Pauletti, F. W. Okumu, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 164–168.
- [159] G. T. Knipp, D. G. V. Velde, T. J. Siahaan, R. T. Borchardt, *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1332–1340.
- [160] T. R. White, C. M. Renzelman, A. C. Rand, T. Rezai, C. M. McEwen, V. M. Gelev, R. A. Turner, R. G. Linington, S. S. Leung, A. S. Kalgutkar, J. N. Bauman, Y. Zhang, S. Liras, D. A. Price, A. M. Mathiowetz, M. P. Jacobson, R. S. Lokey, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 810–817.
- [161] E. Biron, J. Chatterjee, O. Ovadia, D. Langenegger, J. Bruegen, D. Hoyer, H. A. Schmid, R. Jelinek, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2633–2637; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2595–2599.
- [162] J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, *450*, 1001–1009.
- [163] B. R. Stockwell, *Nature* **2004**, *432*, 846–854.
- [164] P. D. Leeson, B. Springthorpe, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 881–890.
- [165] B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 116–125.
- [166] M. Lindgren, M. Hällbrink, A. Prochiantz, U. Langel, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 99–103.