

Funktionalisierung $\alpha\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -selektiver Integrinantagonisten für die Oberflächenbeschichtung: ein Hilfsmittel zur Unterscheidung von Integrinsubtypen in vitro**

Florian Rechenmacher, Stefanie Neubauer, Julien Polleux, Carlos Mas-Moruno, Mariantosaria De Simone, Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam, Joachim P. Spatz, Reinhard Fässler und Horst Kessler*

Die Untersuchung der unterschiedlichen Funktionen von definierten Oberflächenrezeptoren ist für das Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen Zellen und dem extrazellulären Umfeld von großer Bedeutung. Zellen benötigen dafür spezifische Transmembranrezeptoren der Integrinfamilie, um an die extrazelluläre Matrix (ECM) binden und auf sie reagieren zu können. Dadurch sind Integrine für die Regulation der Zellmigration und -differenzierung, die Progression des Zellzyklus und das Überleben der Zelle verantwortlich, bei denen es sich um essenzielle Prozesse in der Entwicklung aller multizellulären Organismen handelt. Integrine werden oft anhand ihrer Bindungsspezifitäten bezüglich extrazellulärer Liganden klassifiziert. So binden z.B. Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) enthaltende Proteine,^[1] wie Fibronectin (Fn), mit hoher Affinität an 8 der 24 in Säugern exprimierten Integrine. Unter den Fibronectin bindenden Integrinen spielen vor allem $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ Schlüsselrollen bei der Embryogenese und Angiogenese sowie bei pathologischen Prozessen.^[2-4] Obwohl die Integrinbiologie intensiv untersucht wurde, ist es immer noch unklar, wie Zellfunktionen und -reaktionen durch die einzelnen Integrinsubtypen reguliert werden. Um diese außerordentlich wichtige Frage beantworten zu können, ist das Design von neuen aktiven Molekülen, die selektiv einzelne Integrinsubtypen erkennen können, essenziell für In-vitro-Studien und die Entwicklung von selektiven Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheiten („personalisierte Medizin“). Des Weiteren ist die Konjugation von funktionellen Gruppen an solche Liganden ohne die

Beinflussung ihrer Affinität und Selektivität für Zelloberflächenrezeptoren eine höchst anspruchsvolle Aufgabe.

Hier beschreiben wir die Synthese von $\alpha\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -spezifischen Liganden für die Funktionalisierung von nanostrukturierten Goldoberflächen^[5] und zeigen, dass die Zelladhäsion durch einen bestimmten Integrinsubtyp selektiv vermittelt werden kann. Die Adhäsion von $\alpha\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$ exprimierenden Zellen auf Goldoberflächen konnte durch die Beschichtung mit diesen Molekülen induziert oder unterdrückt werden, wodurch die Selektivität eindeutig nachgewiesen werden konnte. Diese Verbindungen sind gut dafür geeignet, den Unterschied zwischen der $\alpha\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -vermittelten Zelladhäsion zu studieren.

Die Wechselwirkung von Integrinen mit ECM-Proteinen führt zur Zusammenlagerung von Integrinen und zur Rekrutierung intrazellulärer Proteine an die zytoplasmatische Domäne der Integrine.^[6] Die gebundenen Proteine werden unter dem Namen „Adhäsom“^[7] zusammengefasst und spielen bei der Umsetzung Integrin-vermittelter Prozesse eine Schlüsselrolle. Sie sind an zahlreichen biologischen Prozessen wie der Angiogenese und der Tumorentwicklung beteiligt und sind damit interessante Zielstrukturen für die pharmakologische Forschung.^[8,9] Die Funktionen der Integrine bei der Zelladhäsion und der Bildung fokaler Kontakte mit unselktiven cyclischen RGD-Peptiden und anderen ECM-Mimetika^[10] sind bereits untersucht worden, allerdings ist die exakte Rolle der $\alpha\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrinsubtypen bei diesen Prozessen noch nicht geklärt. Natürliche Integrinliganden

[*] F. Rechenmacher,^[+] S. Neubauer,^[+] Dr. C. Mas-Moruno, Dr. M. De Simone
Institute for Advanced Study am Department Chemie
Technische Universität München (Deutschland)
Prof. Dr. H. Kessler
Institute for Advanced Study am Department Chemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
und
Chemistry Department, Faculty of Science
King Abdulaziz University
P.O. Box 80203, Jeddah 21589 (Saudi Arabia)
E-Mail: Kessler@tum.de
Homepage: <http://www.org.chemie.tu-muenchen.de>
Dr. J. Polleux, Prof. R. Fässler
Max-Planck-Institut für Biochemie, Department of Molecular Medicine, Martinsried (Deutschland)

Dr. E. A. Cavalcanti-Adam, Prof. J. P. Spatz
Max-Planck-Institut für Intelligente Systeme, Abteilung Neue Materialien und Biosysteme, Stuttgart (Deutschland)
und
Universität Heidelberg, Physikalisch-Chemisches Institut, Abteilung für Biophysikalische Chemie, Heidelberg (Deutschland)

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken für die finanzielle Unterstützung durch die International Graduate School of Science and Engineering (IGSSE), den Bund der Freunde der TU München e.V. und das Doktorandenkolleg Complint (Materials Science of Complex Interfaces) des Elitenetzwerks Bayern. Außerdem wurde diese Arbeit vom Institute for Advanced Study (IAS) der TU München, vom Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM) und der Max-Planck-Gesellschaft gefördert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206370> zu finden.

eignen sich nämlich wegen ihrer mangelnden Spezifität für die Integrinsubtypen nicht für diese Untersuchungen.^[11]

Die Beschichtung von Oberflächen mit peptidischen Integrinliganden für biophysikalische Untersuchungen der Zelladhäsion, die Entwicklung von Implantatmaterialien oder die Identifizierung von Bindungsmotiven wurde in mehreren Fällen realisiert.^[10,12] Es stellte sich jedoch heraus, dass Peptide, im Unterschied zu Peptidmimetika, nicht ausreichend aktiv und selektiv waren. Heutzutage gestaltet es sich immer noch schwierig, selektive Peptidmimetika zu funktionalisieren, ohne die Aktivität zu verlieren.

In den letzten 20 Jahren war das Design von Integrin-antagonisten mit der Fähigkeit, definierte Integrinsubtypen während der Zelladhäsion sichtbar zu machen, zu blockieren oder zu inhibieren, ein wichtiges Ziel in der Forschung. Seit der Entdeckung der Integrinerkennungssequenz RGD^[1] haben wir und andere das Augenmerk auf das Design von Integrinantagonisten gelegt, die spezifisch entweder $\alpha 5\beta 1$ oder $\alpha v\beta 3$, unter Beibehaltung der Selektivität für das Blutplättchenintegrin $\alpha IIb\beta 3$, adressieren können.^[13-15] Diese Spezifität ist besonders bei einer möglichen zukünftigen klinischen Anwendung wichtig, da die Inhibierung des RGD bindenden $\alpha IIb\beta 3$ -Integrins bei der Blutplättchenadhäsion zu schädlichen Nebenwirkungen im Patienten führen würde. Uns gelang durch das Design RGD-basierter Peptidmimetika^[16] die Entwicklung des selektiven Antagonisten **1**, der spezifisch $\alpha 5\beta 1$ binden und inhibieren kann (Schema 1).^[15] Eine ungelöste Aufgabe blieb allerdings die Synthese eines hochaktiven $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten mit geringer Affinität für $\alpha 5\beta 1$. Durch das Design einer Bibliothek β -Tyrosin-basierter Verbindungen ist es uns erstmals gelungen, den subnano-molar aktiven $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten **2** zu synthetisieren (Schema 1), der eine 100-mal höhere Selektivität für $\alpha 5\beta 1$ als für $\alpha v\beta 3$ aufweist (Tabelle 1).

Es wurden Dockingstudien von Peptidmimetika in die Kristallstruktur des $\alpha\beta 3$ -Integrins^[17] und an das Homologiemodell des $\alpha 5\beta 1$ -Integrins^[18] durchgeführt, um die bestgeeignete Position für die Funktionalisierung der Integrin-antagonisten zu finden, ohne dabei ihre biologische Aktivität zu beeinflussen.^[14,15] Dabei fanden wir heraus, dass die Iso-

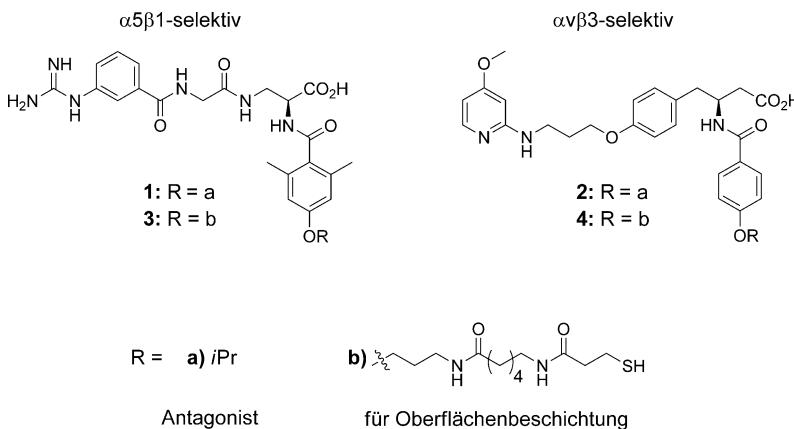
Tabelle 1: Selektivitätsprofile der freien Antagonisten und ihrer entsprechenden Thiol-funktionalisierten Derivate im Vergleich mit Cilengitide.^[13]

| Verbindung | $IC_{50}(\alpha\beta3)$ [nM] | $IC_{50}(\alpha\beta1)$ [nM] |
|------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 3001 ± 205 | 2.3 ± 0.02 |
| 2 | 0.55 ± 0.07 | 120 ± 27 |
| 3 | 229 ± 23 | 1.5 ± 0.09 |
| 4 | 1.8 ± 0.7 | 130 ± 19 |
| Cilengitid | 0.20 ± 0.07 | 11 ± 1.2 |

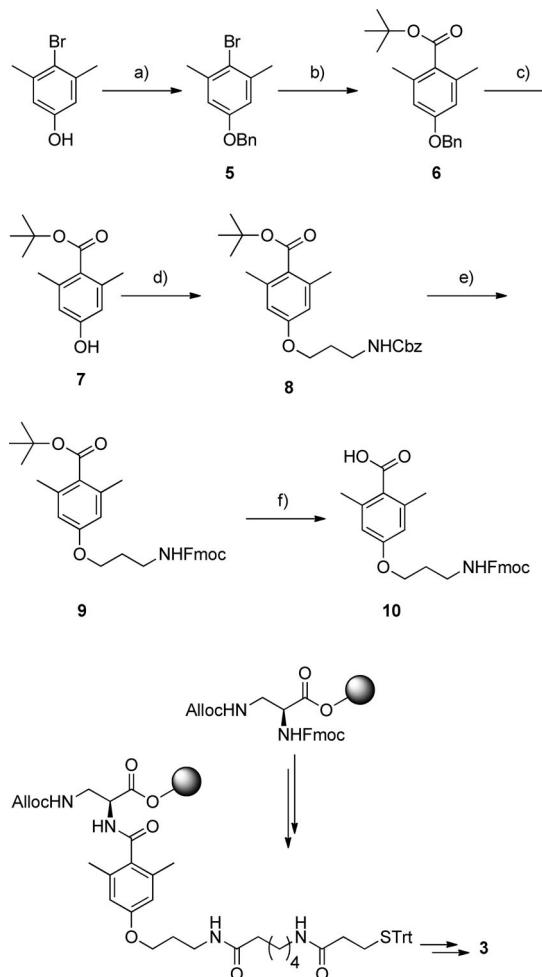
propoxygruppe des aromatischen Rests von **1** aus der Bindungstasche sowohl des $\alpha 5\beta 1$ - als auch des $\alpha v\beta 3$ -Integrins herausragt und dadurch einen geeigneten Angriffspunkt für die Funktionalisierung bietet. Diese Strategie wurde ebenfalls auf **2** angewendet, da durch das Homologiemodell für $\alpha 5\beta 1^{[18]}$ ein ähnlicher Bindungsmodus wie für **1** gegeben ist.

Für die Funktionalisierung des $\alpha\beta_1$ -selektiven Antagonisten wurde **10** über sechs Stufen in Lösung synthetisiert (Schema 2). Dieses Molekül nimmt eine Schlüsselrolle als Funktionalisierungsbaustein ein, weil dadurch auf einfache Weise jede beliebige Funktionalität in den selektiven Integrinantagonisten **1** über die Fmoc-basierte^[19] (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) Festphasenpeptidsynthese (SPPS)^[20] eingeführt werden kann. Es ist wichtig zu erwähnen, dass zuvor mehrere Versuche zur Funktionalisierung von **1** mit anderen Molekülfragmenten sowohl in Lösung als auch an der Festphase gescheitert sind. Mit **10** konnte hingegen die Synthese des Thiol-funktionalisierten, $\alpha\beta_1$ -Antagonisten **3** effizient an der Festphase durchgeführt werden. Nach Harzbeladung mit *N*- α -Fmoc-*N*- β -alloc-L-diaminopropionsäure und Fmoc-Entschützung wurde **10** an das freie Amin gekuppelt. Die Funktionalisierung wurde an dieser Stelle durchgeführt, um eine beliebige Gruppe, die mit der Fmoc-basierten SPPS kompatibel ist, für die entsprechenden biologischen Untersuchungen einzuführen. Anschließend erfolgte der Aufbau des peptidmimetischen Rückgrats, was schließlich zum Thiol-funktionalisierten $\alpha\beta_1$ -Liganden **3** führte (detaillierte Synthese in den Hintergrundinformationen (SI)). Die Funktionalisierung des $\alpha\beta_3$ Liganden geschah auf ähnlichem Weg (SI).

Um unser Konzept der Funktionalisierung hinsichtlich der biologischen Aktivität zu überprüfen, bestimmten wir die IC₅₀-Werte der synthetisierten Verbindungen für die Integrine αvβ3 und α5β1 in einem von uns kürzlich entwickelten kompetitiven Integrin-bindungssassay (detaillierte Anleitung in den SI).^[21] Die α5β1-Aktivität (1.5 nm) des Thiols **3** konnte im Vergleich zum freien Antagonisten **1** (2.3 nm) vollkommen erhalten werden, ebenso wie die Selektivität gegenüber αvβ3. Die Thiol-funktionalisierte Verbindung **4** behielt ebenfalls ihre Aktivität für αvβ3 (1.8 nm) und zeigte beachtliche Selektivität für α5β1 (130 nm). Des Weiteren zeigte keine der Verbindungen Aktivität für das Blutplättchen-integrin αIIbβ3, was von großer Bedeutung für die weitere Verwendung ist. Die gemessenen IC₅₀-Werte sind somit ein stichhaltiger Beleg



Schema 1. α 5 β 1-selektiver (**1**) und α v β 3-selektiver (**2**) Integrinantagonist und die entsprechenden Thiol-funktionalisierten Verbindungen (**3**, **4**) für die Beschichtung von Goldnanopartikeln.



Schema 2. Synthese des Bausteins **10** und Funktionalisierung an der Festphase des $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Integrinantagonisten zum Thiol **3**.

a) NaH, 0°C, DMF; BnBr, RT; b) *n*BuLi, 78°C, THF; Boc₂O, RT; c) H₂, [Pd/C], MeOH; d) 1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidin, PBu₃, THF; e) H₂, [Pd/C], MeOH; Fmoc-OSu, NaHCO₃, THF/H₂O; f) TFA/Triisopropylsilan/H₂O 95/2.5/2.5. Alloc = Allyloxycarbonyl, Bn = Benzyl, Cbz = Carboxybenzyl, TFA = Trifluoressigsäure, Trt = Trityl.

für unser erfolgreiches Konzept der Funktionalisierung.

Um das Selektivitätsprofil von **3** und **4** zu überprüfen, führten wir in einem nächsten Schritt Adhäsionsassays auf funktionalisierten Goldnanoarrays mit zwei genetisch modifizierten Fibroblastenlinien durch, die entweder $\alpha v\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -Integrine exprimieren. In früheren Studien hatten wir cyclische RGD-Peptide in Goldnanoarrays verwendet, um den räumlichen Anspruch der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und -spreitung zu bestimmen.^[5] Dieser Ansatz war sehr nützlich, da die quasi-hexagonal angeordneten Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 7 nm die Untersuchung der Zelladhäsion ermöglichen. Eine ungleichmäßige Verteilung der immobilisierten Liganden wird auf diese Weise vermieden. Aus sterischen Gründen kann an jeden Goldpunkt nur ein einziges Integrin binden. Die Integrin-vermittelte Zelladhäsion spielt sich daher relativ homogen auf dem gesamten Substrat ab. Dies ermöglicht folglich die Untersuchung der Zelladhäsion an definierten Bindungsstellen für Integrine, während zugleich die unspezifische

Adhäsion und Integrinbindung vermieden wird. In diesen Experimenten wurden als Ankerpunkte für die endständige Thiolgruppe der Peptidmimetika Goldnanopartikel in einem lateralen Abstand von 30 nm verwendet.^[5,22] Nach Passivierung der Glasoberfläche mit Polyethylenglycol (PEG) und Funktionalisierung der Goldoberfläche mit den Integrin-selektiven Verbindungen **3** und **4** wurden $\alpha v\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$ exprimierende Fibroblasten in Medium mit niedriger Serumkonzentration (0.5% fetales Kälberserum (FBS)) ausgesetzt. Diese niedrige Serumkonzentration ist nötig, um unspezifische Proteinadsorption auf dem Substrat zu vermeiden und dadurch den Zellen ausschließlich die Wechselwirkung mit den immobilisierten Peptidmimetika zu ermöglichen (Abbildung 1). Der Unterschied zwischen der Adhäsion der beiden Zelllinien auf den mit **3** oder **4** funktionalisierten Oberflächen ist überzeugend. Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, konnten die $\alpha 5\beta 1$ exprimierenden Fibroblasten nach einer Stunde ausschließlich auf der Goldoberfläche, die mit der $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Verbindung **3** beschichtet war, adhären. Im Unterschied dazu adhärierten und spreiteten die $\alpha v\beta 3$ exprimierenden Zellen lediglich auf der immobilisierten $\alpha v\beta 3$ -spezifischen Verbindung **4**. Zudem war es beiden Zelllinien selbst nach sechs Stunden nicht möglich, auf der jeweils anderen Oberfläche zu adhären. Um zu überprüfen, ob die Zelladhäsion spezifisch durch die Peptidmimetika induziert wurde, wurden Zelladhäsionsassays auf Oberflächen durchgeführt, die mit nicht an Integrin bindenden Peptiden – in diesem Fall der Thiol-funktionalisierten Negativkontrolle c(RADfK) – beschichtet waren. Dabei konnte keine Adhäsion bei beiden Zelllinien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Zudem haben wir die Fläche und den Prozentsatz der gespreiteten, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ exprimierenden Zellen auf den selektiv funktionalisierten Nanoarrays nach einer und nach sechs Stunden Inkubation untersucht (Abbildungen S1 und S2 in den SI). Die Analyse der Zellfläche auf jeder Oberfläche zeigte eine durch **3** und **4** selektiv vermittelte Zelladhäsion, allerdings erfolgte das Spreiten der $\alpha v\beta 3$ exprimierenden Zellen gegenüber dem der $\alpha 5\beta 1$ exprimierenden Zellen um eine Stunde verzögert. Die ähnlichen Zeiträume, die für die $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha v\beta 3$ exprimierenden Fibroblasten für das Spreiten auf den mit **3** und **4** funktionalisierten Goldnanopartikeln sowie auf Fibronectin beschichteten Plastikoberflächen nötig sind, lassen darauf schließen, dass die Integrin-vermittelte Zelladhäsion selektiv durch die zwei verschiedenen Integrin bindenden Peptidmetika induziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Bei **3** und **4** handelt es sich um die ersten Thiol-funktionalisierten $\alpha 5\beta 1$ - oder $\alpha v\beta 3$ -selektiven Integrinantagonisten, die für die Modifikation von Gold-basierten Substraten synthetisiert wurden. Die Liganden ergaben auf diesen Oberflächen einen bemerkenswerten Unterschied zwischen der Stimulation der Zelladhäsion von $\alpha v\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ exprimierenden Fibroblasten. Zudem konnten wir durch die Bestimmung der IC₅₀-Werte bestätigen, dass sich die Antagonisten **1** und **2** unter Erhaltung der Aktivität und Selektivität auf effiziente Weise funktionalisieren lassen. Dies lässt stark darauf schließen, dass wir die Antagonisten in dieser Position für beliebige Anwendungen (z.B. für die molekulare Bildgebung) unter Erhaltung des biologischen Profils funktiona-

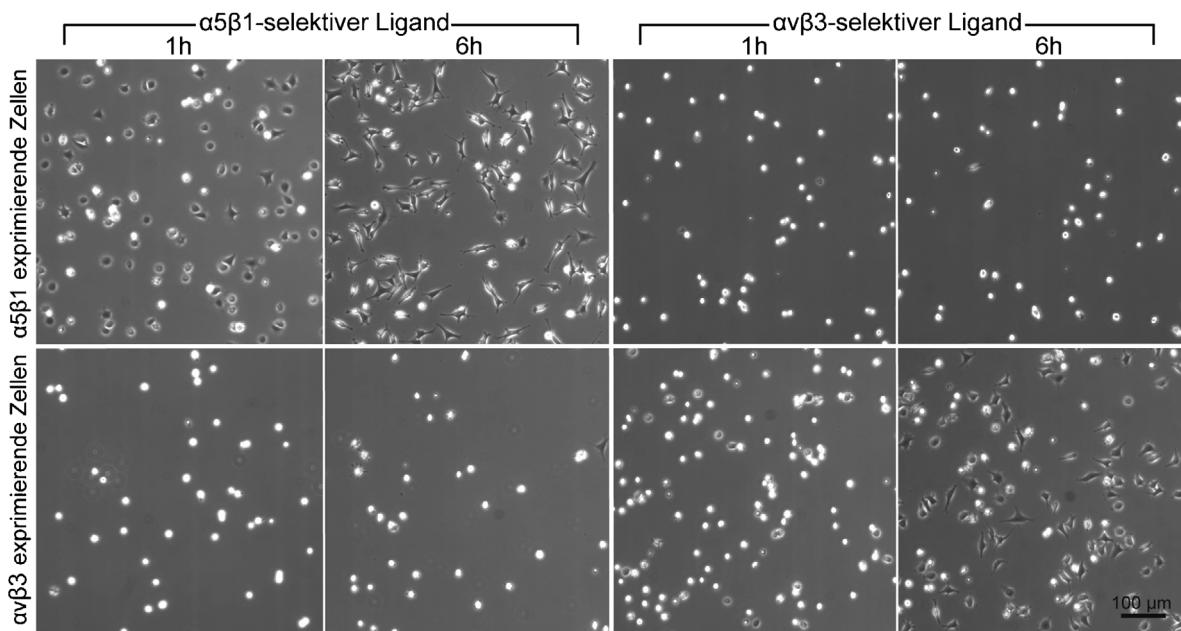


Abbildung 1. Zelladhäsionsassay. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen mit geringer Vergrößerung der $\alpha v\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -Integrin exprimierenden Fibroblasten auf Goldnanoarrays, die mit der $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Verbindung (links) oder der $\alpha v\beta 3$ -selektiven Verbindung (rechts) funktionalisiert wurden. Der Maßstab von 100 μm bezieht sich auf alle Bilder.

lisieren könnten. Die Entwicklung dieser Moleküle hat somit zu neuen Hilfsmitteln für die Untersuchung der Unterschiede zwischen den $\alpha v\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -induzierten Zelladhäsionsprozessen geführt.

Eingegangen am 8. August 2012,
veränderte Fassung am 3. Oktober 2012
Online veröffentlicht am 12. Dezember 2012

Stichwörter: Goldnanoarrays · Integrinantagonisten · Oberflächenchemie · Peptidmimetika · Zelladhäsion

- [1] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [2] C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, J. A. Varner, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617.
- [3] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [4] R. O. Hynes, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918–921.
- [5] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blümmel, W. Eck, M. Kantlehner, H. Kessler, J. P. Spatz, *ChemPhysChem* **2004**, *5*, 383–388.
- [6] B. Geiger, J. P. Spatz, A. D. Bershadsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 21–33.
- [7] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, B. Geiger, *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 858–868.
- [8] S. L. Goodman, M. Picard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 405–412.
- [9] E. Ruoslahti, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 83–90.
- [10] a) B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. Garcia, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, *66A*, 247–259; b) B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. Garcia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5953–5957; c) E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2964–2974; d) M. Arnold, V. C. Hirschfeld-Warneken, T. Lohmüller, P. Heil, J. Blümmel, E. A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, P. Walther, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2063–2069; e) J. H. Huang, S. V. Graeter, F. Corbellini, S. Rinck, E. Bock, R. Kemkemer, H. Kessler, J. D. Ding, J. P. Spatz, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 1111–1116; f) S. H. Shabbir, J. L. Eisenberg, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 7872–7875; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7706–7709; g) K. A. Kilian, M. Mrksich, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4975–4979; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4891–4895.

- [11] E. F. Plow, T. K. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.
- [12] a) S. P. Massia, J. A. Hubbell, *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 1089–1100; b) D. J. Irvine, A. V. G. Ruzette, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 545–556; c) U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415; d) W. Kuhlman, I. Taniguchi, L. G. Griffith, A. M. Mayes, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3206–3213; e) Y. Ohmuro-Matsuyama, Y. Tatsu, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7637–7639; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7527–7529; f) J. Sánchez-Cortés, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 990–1000; g) J. Sánchez-Cortés, M. Mrksich, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1078–1086; h) B. F. Bell, M. Schuler, S. Tosatti, M. Textor, Z. Schwartz, B. D. Boyan, *Clin. Oral Impl. Res.* **2011**, *22*, 865–872.
- [13] a) 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; b) C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768; c) S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045–1051; d) R. Stragies, F. Osterkamp, G. Zischinsky, D. Vossmeyer, H. Kalkhof, U. Reimer, G. Zahn, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3786–3794.
- [14] a) D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3641–3644; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3571–3574; b) D. Heckmann, B. Laufer, L. Marinelli, V. Limongelli, E. Novellino, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4501–4506; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4436–4440.
- [15] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1397–1407.

- [16] C. Dahmen, J. Auernheimer, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6818–6821; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6649–6652.
- [17] J.-P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151–155.
- [18] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207.
- [19] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404–3409.
- [20] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [21] A. O. Frank, E. Otto, C. Mas-Moruno, H. B. Schiller, L. Marinelli, S. Cosconati, A. Bochen, D. Vossmeyer, G. Zahn, R. Stragies, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9465–9468; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9278–9281.
- [22] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103–1169.