

Integrinliganden (1)

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201508709
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201508709**Stabile Peptide statt „gestapelte Peptide“: hochaffine $\alpha\beta 6$ -selektive Integrinliganden**

Oleg V. Maltsev, Udaya Kiran Marelli, Tobias G. Kapp, Francesco Saverio Di Leva, Salvatore Di Maro, Markus Nieberler, Ute Reuning, Markus Schwaiger, Ettore Novellino, Luciana Marinelli und Horst Kessler*

Abstract: Das Integrin $\alpha\beta 6$ bindet mit hoher Selektivität an das die RGD-Sequenz enthaltende Peptid des Maul- und Klauenseuche-Virus. In dieser Arbeit wurde die lange, für die Bindung dieses Liganden wichtige Helix systematisch zu einem enzymatisch stabilen, cyclischen Peptid verkleinert, welches subnanomolare Bindungsaktivität für den $\alpha\beta 6$ -Rezeptor und eine bemerkenswerte Selektivität gegenüber anderen Integrinrezeptoren besitzt. Um die molekularen Grundlagen für die hohe Bindungsaffinität und Rezeptorsubtypselektivität aufzuklären, wurden Dockingexperimente durchgeführt. Des Weiteren wurde auch die Anwendbarkeit des funktionalisierten Liganden in biomedizinischen Studien gezeigt.

Helizes sind häufige Bindungsmotive in Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[1] Jedoch wird die Helix als Strukturmotiv in peptidischen Liganden in der medizinischen Chemie aufgrund ihrer strukturellen und enzymatischen Instabilität selten verwendet. Ein üblicher Ansatz, um diese Problematik zu überwinden, ist die Stabilisierung der Helix durch Cyclisierung über die Seitenketten (z.B. „stapled peptides“, gestapelte Peptide).^[2] Des Weiteren kann die „side-on“-Wechselwirkung der Helix durch cyclische Peptide mit β -Faltblattstruktur imitiert werden, wie in der bahnbrechenden Arbeit von Robinson et al. gezeigt wurde (Abbildung 1).^[3]

[*] Dr. O. V. Maltsev, Dr. U. K. Marelli, T. G. Kapp, Prof. Dr. H. Kessler Institute for Advanced Study and Center for Integrated Protein Science (CIPSM), Technische Universität München Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: kessler@tum.de

Dr. F. S. Di Leva, Prof. Dr. E. Novellino, Prof. Dr. L. Marinelli Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II Via D. Montesano 49, 80131 Napoli (Italien)

Dr. S. Di Maro
DiSTABiF, Secondo Università di Napoli
Via Vivaldi 43, 81100 Caserta (Italien)

Dr. M. Nieberler
Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University Hospital rechts der Isar, Technische Universität München
Ismaninger Straße 22, 81675 München (Deutschland)

Prof. Dr. U. Reuning
Klinische Forschergruppe der Frauenklinik, University Hospital rechts der Isar, Technische Universität München
Ismaninger Straße 22, 81675 München (Deutschland)

Prof. Dr. M. Schwaiger
Department of Nuclear Medicine, University Hospital rechts der Isar, Technische Universität München
Ismaninger Straße 22, 81675 München (Deutschland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508709> zu finden.

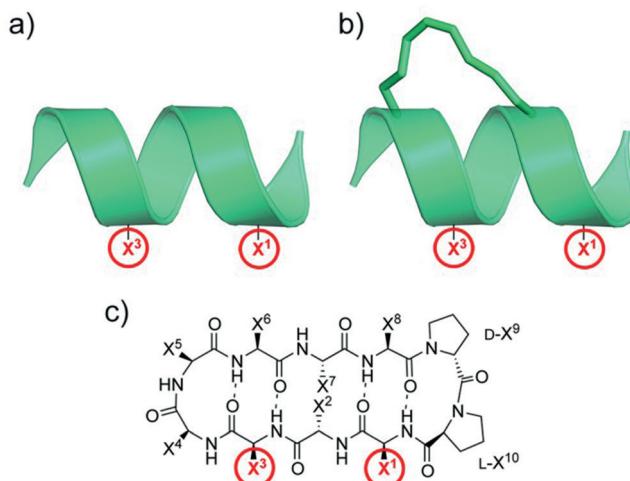


Abbildung 1. a) In der α -Helix sind die Aminosäuren X^1 und X^3 für die Protein-Protein-Wechselwirkung verantwortlich. b) Stabilisierung der Helix durch Cyclisierung der Seitenketten. c) Nachahmung der Interaktion der Helix durch ein cyclisches Peptid mit β -Faltblattstruktur.

Die Integrinrezeptorfamilie besteht aus mindestens 24 Subtypen, die an Wechselwirkungen und Adhäsionsprozessen zwischen verschiedenen Zellen und von Zellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) wesentlich beteiligt sind.^[4] Unter diesen Subtypen erkennen acht ($\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$, $\alpha\beta 8$, $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\beta 1$ und $\alpha\beta 1$) die Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD) in ihren natürlichen ECM-Liganden. Verbindungen, welche eine hohe Bindungsaffinität sowie eine hohe Selektivität für einen Integrinsubtyp besitzen, sind pharmakologische Schlüsselwerkzeuge für eine eindeutige Identifizierung der exakten biologischen Funktion und zur Aufklärung der Kommunikation zwischen verschiedenen Integrinsubtypen („cross talk“). Die Kenntnis dieser Sachverhalte wiederum ist die Basis für eine maßgeschneiderte, personalisierte Medizin. Wenngleich für die Subtypen $\alpha\text{IIb}\beta 3$, $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 1$ ^[5] bereits erfolgreich hochaffine und selektive Liganden entwickelt werden konnten, sind diese für viele andere RGD-bindende Integrine noch immer nicht verfügbar.^[6]

Kürzlich rückte der Integrinsubtyp $\alpha\beta 6$ in den Fokus, da er ein Rezeptor für den Eintritt von Viren (z.B. den Maul- und Klauenseuche-Virus)^[7] in Zellen ist und auf vielen Tumorzellen^[8] und z.B. auch bei Fibrose^[9] stark überexprimiert wird. Bis heute wurde nur eine geringe Zahl von $\alpha\beta 6$ -Integrinliganden zur Krebsdiagnose entwickelt; darunter lineare

10- bis 20-mere^[10] und „gestapelte“ Cystinpeptide.^[11] Das Design von $\alpha\beta 6$ -spezifischen Liganden begann mit der Entdeckung der Sequenz RXDLXXL durch die biochemische Selektionsmethode des Phagen-Displays. Es wurde angenommen, dass diese Sequenz als helikales Motiv an das Integrin bindet.^[12]

Im Rahmen dieser Studie wurden die pharmakophoren Aminosäuren der $\alpha\beta 6$ -bindenden, helikalen Sequenz in ein Peptid mit β -Faltblattstruktur – ein Sekundärstrukturelement, das häufig bei natürlichen Wechselwirkungen von Proteinen anzutreffen ist (Abbildung 1c) – integriert und mithilfe von β -Schleifen-Mimetika cyclisiert. Anschließend wurde eine Bibliothek von enzymatisch stabilen, cyclischen Peptiden durch Variation und Modifikation von Aminosäureresten generiert. Durch Evaluierung der Bindungsaffinitäten und Subtypselektivitäten der Verbindungen dieser Peptidbibliothek konnte ein neuer $\alpha\beta 6$ -Ligand identifiziert werden, der im Vergleich mit bisher bekannten $\alpha\beta 6$ -Liganden das niedrigste Molekulargewicht besitzt. Dieser Ligand zeichnet sich vor allem durch eine subnanomolare Affinität sowie eine hohe Subtypselektivität aus.

Als Startpunkt verwendeten wir cyclische Decapeptide, welche zuerst von Robinson et al.^[3] beschrieben wurden. Darin ist das Motiv D-Pro-L-Pro (pP) enthalten, welches eine β -Schleife induziert – wobei die entstehende β -Faltblattstruktur tolerant gegenüber der Variation von Aminosäuren ist. Die optimale Position der RGDL- oder RTDL-Sequenz in dem cyclischen Peptid war vorab nicht bekannt, weshalb wir uns dazu entschieden, alle potentiellen Positionen dieses Motivs im Makrocyclus zu untersuchen. Die Position des zweiten Leucins in der Sequenz DLXXL war variabel und wurde in einigen Fällen durch die Einführung des schleifeninduzierenden Motivs pP unterbrochen. Für alle anderen Aminosäuren wurde jeweils L-Alanin verwendet und so ein L-Alanin-Scan durchgeführt. Dadurch gelingt es, den Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die Bindungsaffinität zu untersuchen. Die Optimierung der Seitenkette der Aminosäure sollte in einem späteren Schritt durchgeführt werden.

Durch den vorher beschriebenen Prozess wurden 10 neue cyclische Peptide, welche entweder die Sequenz RGD (Tabelle 1) oder RTD (siehe Hintergrundinformationen, SI) enthielten, entworfen und mittels Fmoc-Peptidfestphasensynthese und anschließender Cyclisierung in Lösung hergestellt.

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten der Verbindungen 1–10 für $\alpha\beta 6$ und $\alpha\beta 3$, ermittelt in einem Festphasenbindungssassay nach einer etablierten Methode.^[14]

Peptid	Aminosäuresequenz (X ¹ –X ¹⁰)	$\alpha\beta 6$, IC ₅₀ [nM]	$\alpha\beta 3$, IC ₅₀ [nM]
1	RGDLAALApP	14.5	–
2	ARGDLAALpP	8.3	76.7
3	LARGDLAApP	13.4	–
4	ARGDAAApP	320	–
5	ARGDLAApP	15.4	–
6	ARGDLA-LpP	3.0	106
7	ARGDLA-FpP	0.67	104
8	FRGDLA-LpP	1.25	>1000
9	FRGDLA-Fp (NMe) K	0.26	632
10	FRGDLA-Fp (NMe) K (Ac)	0.30	640

stellt.^[13] In allen untersuchten Fällen zeigten die RTD-Derivate im Vergleich zu deren RGD-Analoga signifikant niedrigere $\alpha\beta 6$ -Bindungsaffinitäten (5- bis 107-fach) (siehe SI). Für die ersten drei synthetisierten RGD-Verbindungen 1–3 (Tabelle 1) konnte eine $\alpha\beta 6$ -Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich (5.8–14.5 nM) bestimmt werden, was in beeindruckender Weise das Potential dieser Methode belegt. Obwohl Peptid 2 noch eine relativ hohe Bindungsaffinität für $\alpha\beta 3$ aufwies (76.7 nM), wurde dieses Peptid aufgrund seiner guten $\alpha\beta 6$ -Affinität als neue Leitstruktur gewählt.

Überraschenderweise ist im Gegensatz zu linearen Peptiden das Motiv DLXXL in den untersuchten cyclischen Peptiden für die Bindung an $\alpha\beta 6$ nicht essentiell.^[10–12] Das zeigt die Betrachtung von Peptid 3, bei dem das schleifeninduzierende Motif pP zum Bruch der DLXXL-Sequenz eingeführt wurde und dabei keine drastische Veränderung der $\alpha\beta 6$ -Bindungsaffinität beobachtet werden konnte. Um die Wichtigkeit der LXXX-Sequenz für die $\alpha\beta 6$ -Affinität aufzuklären, wurde die Aminosäure Leucin an Position 5 und 8 jeweils durch L-Alanin (2 in Tabelle 1) substituiert. Es zeigte sich, dass die Präsenz von Leucin in direkter Umgebung der RGD-Sequenz (4) für die Bindung an $\alpha\beta 6$ entscheidend ist, wohingegen die Substitution des zweiten Leucins (Peptid 5) nur zu einer geringen Abnahme der Bindungsaffinität führt. Die Affinität von 5 entspricht in etwa der von 3. Im Zuge dieser Beobachtungen nahmen wir an, dass der Makrocyclus zur Vereinfachung der Ligandenstruktur möglicherweise um eine oder mehrere Aminosäuren gekürzt werden könnte. Tatsächlich führte das Entfernen von Alanin (Peptid 6) zu einem Liganden mit gleicher $\alpha\beta 6$ -Bindungsaffinität und reduzierter Affinität für $\alpha\beta 3$ (siehe SI). Eine weitere Entfernung von Aminosäuren führte dann aber zu Peptiden mit drastisch reduzierter $\alpha\beta 6$ -Bindungsaffinität (siehe SI).

Nach einigen erfolglosen Versuchen, die $\alpha\beta 6$ -Bindungsaffinität und Selektivität des Liganden durch Variation der Aminosäure X⁶ zu verbessern (siehe SI), konnten wir postulieren, dass diese Aminosäure eine möglichst kleine Seitenkette haben muss (z.B. Alanin). Dies wurde bereits in bekannten linearen Peptiden (z.B. H2009.1, RGDLATLRQL) sowie in c-(CRGDLASLC-) beobachtet.^[10–12]

Im Nonapeptid ist die Aminosäure Leucin, die die RGD-Sequenz flankiert, ähnlich wie im Decapeptid, für die Rezeptorbindung entscheidend (siehe SI). Des Weiteren konnte das zweite Leucin durch andere Aminosäuren mit sterisch anspruchsvoller Seitenkette mit positivem Beitrag zur Bindungsaffinität ersetzt werden. So führte die Substitution Leu → Phe zu einem 5-fachen Anstieg der $\alpha\beta 6$ -Bindungsaffinität ohne dabei die $\alpha\beta 3$ -Affinität zu beeinflussen (Peptid 7). Bemerkenswert war weiterhin, dass aus der Substitution von Ala¹ durch die sterisch anspruchsvollere Aminosäure L-Phe eine Verbindung mit drastisch reduzierter $\alpha\beta 3$ -Affinität bei etwas verbesserter $\alpha\beta 6$ -Affinität hervorging. In ähnlicher Weise verbesserten auch die Aminosäuren L-Thr und L-Trp in Position X¹ und X⁸ die Bindungseigenschaften des Peptids, wenn auch im Vergleich zu den Veränderungen durch L-Phe weniger stark (siehe SI).

Nachdem die Positionen und die Art der für die Bindung wichtigsten Aminosäuren feststanden, sollten X⁹ und X¹⁰ optimiert werden, um eine Funktionalisierung der Verbin-

dung, etwa für die molekulare Bildgebung oder zur Beschichtung auf Oberflächen, zu ermöglichen.^[15] Die *N*-Methylierung ist eine bekannte Strategie zur Herstellung von Mimetika von Prolin und zur gezielten Beeinflussung von Eigenschaften wie beispielsweise Stabilität, Affinität und Bioverfügbarkeit.^[16] Hier substituierten wir ein Prolin durch *N*Me-Lys, dessen Seitenkette die Möglichkeit einer weiteren Funktionalisierung bietet. Interessanterweise zeigte sich, dass nur L-Pro¹⁰ durch *N*Me-L-Lys ersetzt werden kann, die Substitution von D-Pro⁹ durch *N*Me-D-Lys verringerte sowohl die $\alpha\text{v}\beta$ 6-Affinität als auch die Selektivität der Verbindung (siehe SI). Es wurde auch beobachtet, dass die NH₂-Gruppe der Lysin-Seitenkette offensichtlich nicht an der Rezeptorbindung beteiligt ist, da deren Acetylierung den IC₅₀-Wert der Verbindung nicht wesentlich beeinflusste (Peptid **10**).

Von den aktivsten Verbindungen **9** und **10** wurde ein umfassenderes Selektivitätsprofil ermittelt. Die Bindungsassays zeigten, dass die beiden Peptide niedrige Bindungsaffinitäten gegenüber den Subtypen $\alpha\text{IIb}\beta$ 3, $\alpha\text{v}\beta$ 3, und $\alpha\text{v}\beta$ 5, jedoch eine signifikante Restaffinität für $\alpha\text{v}\beta$ 1 und $\alpha\text{v}\beta$ 8 besitzen. Wie in Tabelle 2 zu sehen, ist die $\alpha\text{v}\beta$ 6-Bindungsaffinität

Tabelle 2: Bindungsaffinitäten der Verbindungen **9** und **10** für $\alpha\text{v}\beta$ 6, $\alpha\text{v}\beta$ 3, $\alpha\text{v}\beta$ 1, $\alpha\text{v}\beta$ 8, $\alpha\text{IIb}\beta$ 3 und $\alpha\text{v}\beta$ 5 und deren Selektivitäten für $\alpha\text{v}\beta$ 6, ermittelt in einem Festphasenbindungsassay nach einer etablierten Methode.^[14]

Peptid	$\alpha\text{v}\beta$ 6, IC ₅₀ [nM]	$\alpha\text{v}\beta$ 3, IC ₅₀ [nM]	$\alpha\text{v}\beta$ 1, IC ₅₀ [nM]	$\alpha\text{v}\beta$ 8, IC ₅₀ [nM]	$\alpha\text{IIb}\beta$ 3, IC ₅₀ [nM]	$\alpha\text{v}\beta$ 5, IC ₅₀ [nM]
9	0.26 1:2431	632 1:280	72.9 1:280	23.6 1:91	>1000 —	>1000 —
10	0.30 1:2133	640 1:247	74.0 1:247	21.1 1:70	>1000 —	>1000 —

nität von **9** und **10** stets mindestens zwei Größenordnungen besser als für alle anderen RGD-bindenden Integrine. Unseres Wissens nach sind **9** und **10** derzeit die Peptide mit der höchsten $\alpha\text{v}\beta$ 6-Affinität und besten Selektivität, die bislang in der Literatur beschrieben wurden.^[17] Um die Restaffinität für $\alpha\text{v}\beta$ 1 zu reduzieren, wurde eine neue Methode, welche die Einführung von *N*-alkylierten Argininguanidgruppen beinhaltet, angewendet. Dabei wurde ein *N*_ε-Et-Arginin-Derivat von **10** mit einer $\alpha\text{v}\beta$ 6-Bindungsaffinität von 0.28 nM und vollständiger Selektivität gegenüber $\alpha\text{v}\beta$ 1 (>10 μM) erhalten.^[18]

Um die molekularen Grundlagen dieser idealen Bindungseigenschaften aufzudecken, wurde die Konformation in Lösung von **10** mittels NMR-Spektroskopie bestimmt.^[19] Es wurde nur ein Signalsatz von ¹H-chemischen Verschiebungen beobachtet, was für eine Hauptkonformation auf der NMR-Zeitskala spricht.

Die NMR-Daten wiesen auf eine antiparallele β -Faltblattstruktur für **10** hin (Abbildung 2). Die Einheit D-Pro⁸-*N*Me-L-Lys⁹ fungiert als Analogon zu dem $\beta\text{II}'$ -Schleifen induzierenden Motiv D-Pro-L-Pro. In diesem Fall konnte jedoch eindeutig eine γ -Schleife an L-*N*Me-Lys⁹(Ac) mit Diederwinkel von $\phi = -82.4^\circ$ und $\psi = 52.6^\circ$ sowie Wasserstoffbrücken zwischen Phe³-NH und D-Pro⁸-CO beobachtet

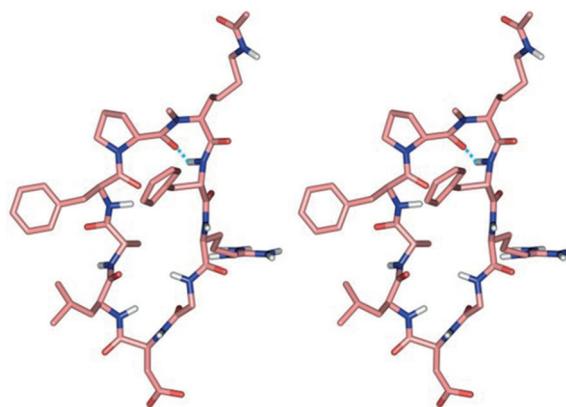


Abbildung 2: Stereoansicht der durch NMR-Spektroskopie erhaltenen Konformation von **10**. Unpolare Wasserstoffatome sind zur Klarheit nicht gezeigt; Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte, blaue Linien gezeichnet.

werden.^[20] Die Diederwinkel $\phi = 56.2^\circ$ und $\psi = -178.3^\circ$ von D-Pro⁸ in Kombination mit jenen von L-*N*Me-Lys⁹(Ac) bestätigen die $\beta\text{II}'$ -Schleife um D-Pro⁸-L-*N*Me-Lys⁹(Ac), was der Gleichgewichtskonformation einer γ -Schleife mit einem $\beta\text{II}'$ -Schleifenmotiv entspricht. Die Struktur zeigt, dass die lipophilen Seitenketten der Aminosäuren Phe¹, Leu⁵ und Phe⁷ auf die gleiche Seite des Cyclopeptids orientiert sind, während die Sequenz RGD in die entgegengesetzte Richtung zeigt (Abbildung 2).

Die NMR-Struktur von **10** wurde anschließend dazu verwendet, den Bindungsmodus dieses Peptids an den Subtyp $\alpha\text{v}\beta$ 6 mittels Dockingexperimenten zu untersuchen. In diesem Fall waren Standard-Dockingmethoden nicht durchführbar, da der sehr umfangreiche potentielle Konformationsraum für die Interaktion von kleinen bis mittelgroßen Peptiden wie **10** nicht abgedeckt werden kann. Aus diesem Grund wurde die gemittelte NMR-Struktur manuell in die $\alpha\text{v}\beta$ 6-Kristallstruktur^[21] (PDB-Code: 4UM9) gedockt und anschließend eine 100 ns MD-Simulation des Komplexes durchgeführt (siehe SI). Zu Beginn der MD-Simulation passte sich die Position und Konformation von **10** leicht an (Abbildung 3), welche dann für den Rest der Simulation beibehalten wurde (siehe SI). Interessanterweise war der durch die MD-Simulationen erhaltene Bindungsmodus in hohem Maße deckungsgleich mit dem helikalen Bindungsmotiv von TGF- β 3 (transforming growth factor- β 3), der mit $\alpha\text{v}\beta$ 6 cokristallisiert wurde (Abbildung 3). Neben den bekannten Interaktionen des RGD-Bindungsmotivs mit der Integrinkopfgruppe konnte durch die Dockingexperimente auch eine Interaktion der Seitenketten von Leu⁵ und Phe⁷ gefunden werden. Diese passen gut in eine größere, lipophile Bindungstasche unterhalb der spezifitätsbestimmenden Schleife (specification-determining loop, SDL) in der β -Untereinheit;^[21] Leu⁵ interagiert mit (β 6)-A117, (β 6)-I174 und (β 6)-A208, Phe⁷ dagegen mit (β 6)-I174 und (β 6)-I210. Dieses Interaktionsmuster wird durch enge, intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen, welche von den Seitenketten der Aminosäuren Phe¹, Leu⁵ und Phe⁷ vermittelt werden, stabilisiert. Tatsächlich weisen alle Seitenketten in dieselbe Rich-

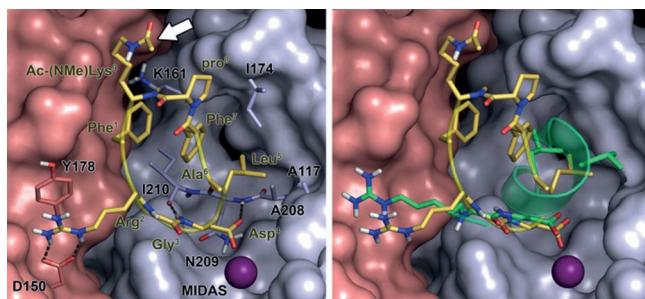


Abbildung 3. Bindungsmodus von Peptid **10**, welcher durch MD-Simulationen erhalten wurde (links), Überlagerung von Peptid **10** und TGF- β 3 am $\alpha v \beta 6$ -Integrinrezeptor (rechts). Peptid **10** (gelb) und TGF- β 3 (grün) sind in Stab- und Bänderdarstellung abgebildet. Die αv - bzw. $\beta 6$ -Untereinheit ist als rötliche bzw. bläuliche Oberfläche dargestellt. Das Metallion am MIDAS ist als violette Kugel dargestellt. Die für die Bindung wichtigen Aminosäuren des Rezeptors sind durch ebenfalls in Stabdarstellung abgebildet. Die Kristallstruktur von $\alpha v \beta 6$, die für die MD-Simulationen verwendet wurde, wurde aus der Protein Data Bank (PDB-Code: 4UM9) entnommen. Im linken Teilbild zeigt der weiße Pfeil die Position der Funktionalisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff an.

tung wie dies die Aminosäuren i , $i+4$, und $i+7$ in einer α -Helix (z. B. in TGF- β 3) tun. Diese Ergebnisse können auch erklären, warum die Substitution einer dieser drei hydrophoben Aminosäuren jeweils die $\alpha v \beta 6$ -Bindungsaffinität stark reduzierte (**9–10** vs. **6–8**). Abschließend wurde durch die MD-Simulation gezeigt, dass von den Aminosäuren Ala⁵, D-Pro⁸ und (NMe)Lys(Ac)⁹ in **10** keine Bindungsinteraktion ausgeht, was vermuten lässt, dass diese Aminosäuren für die Struktur der Verbindung wichtig (z. B. zur Stabilisierung der bioaktiven Konformation), jedoch für die eigentliche Bindung an $\alpha v \beta 6$ unwichtig sind. Die Seitenkette von (NMe)Lys(Ac)⁹ zeigt aus der Bindungstasche in Richtung Solvens. Das verdeutlicht, warum durch die Acetylierung von (NMe)Lys⁹ die $\alpha v \beta 6$ -Bindungsaffinität nicht signifikant beeinträchtigt wurde. Der vorausgesagte Bindungsmodus von **10** mit dem $\alpha v \beta 6$ -Integrinrezeptor dient auch zur Aufklärung der molekularen Grundlagen für die Selektivität gegenüber allen untersuchten Subtypen, insbesondere jedoch gegenüber $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$. Bei $\alpha v \beta 3$ sind die Aminosäuren ($\beta 6$)-A117, ($\beta 6$)-K161, ($\beta 6$)-A208 und ($\beta 6$)-I210 durch die sterisch anspruchsvolleren Aminosäuren ($\beta 3$)-Y122, ($\beta 3$)-Y166, ($\beta 3$)-R214 und ($\beta 3$)-R216 ersetzt.^[17a] Durch diese Aminosäuren wird eine sterische Hinderung generiert, welche vermutlich die Bindung der Seitenketten von Leu⁵ und Phe⁷ in die SDL-Region von $\alpha v \beta 3$ verhindert. Dies wiederum könnte dazu führen, dass die RGD-Sequenz schwächer gebunden wird, was die mikromolare Bindungsaffinität von **10** erklären würde. In $\alpha 5 \beta 1$ sind die vorher genannten Aminosäuren von $\alpha v \beta 6$ durch ($\beta 1$)-Y127, ($\beta 1$)-S171, ($\beta 1$)-G217 und ($\beta 1$)-L219, ersetzt.^[22] Unter diesen Veränderungen kann nur ($\beta 1$)-Y127 und ($\beta 1$)-L219 eine günstige lipophile Interaktion mit den Seitenketten von Leu⁵ und Phe⁷ eingehen, die Substitution des hydrophilen ($\beta 6$)-I174 durch die polare Aminosäure ($\beta 1$)-E184 trägt zur verminderten $\alpha 5 \beta 1$ -Affinität von **10** im Vergleich zur Affinität für $\alpha v \beta 6$, bei.

Die Anwendung von Peptiden in biologischen Experimenten ist häufig durch deren geringe metabolische Stabilität limitiert. Für die hier entwickelten Nonapeptide wurde daher eine Stabilitätsuntersuchung in menschlichem Blutplasma, im Vergleich mit dem linearen Peptid RTDLDLRT^[12a] als Kontrollsubstanz, durchgeführt. Die cyclischen Peptide **9** und **10** waren über den gesamten Untersuchungszeitraum von 3 h hinweg stabil, dagegen war das lineare Kontrollpeptid innerhalb von 30 min bereits zu 50 % abgebaut (siehe SI).

Um die biologische Anwendbarkeit des neu entwickelten, $\alpha v \beta 6$ -selektiven Liganden zu zeigen, wurde das Peptid **9** mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5.5 über die Seitenkette von Lys⁹ funktionalisiert. Als Modellsystem verwendeten wir die hochaggressive und invasive Zelllinie HN (humane orale Karzinomzellen).^[23] Als Kontrolle wurde die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie OVMZ6,^[24] welche eine niedrige $\alpha v \beta 6$ - und eine hohe $\alpha v \beta 3$ -Expressionsrate besitzt, verwendet. Nach der Inkubation der HN-Zellen mit **9-Cy5.5** wurde eine starke Fluoreszenzintensität der Zellmembran beobachtet. Dagegen wurde das Konjugat **9-Cy5.5** nicht an OVMZ6-Zellen gebunden (Abbildung 4 und Abbildung S4).

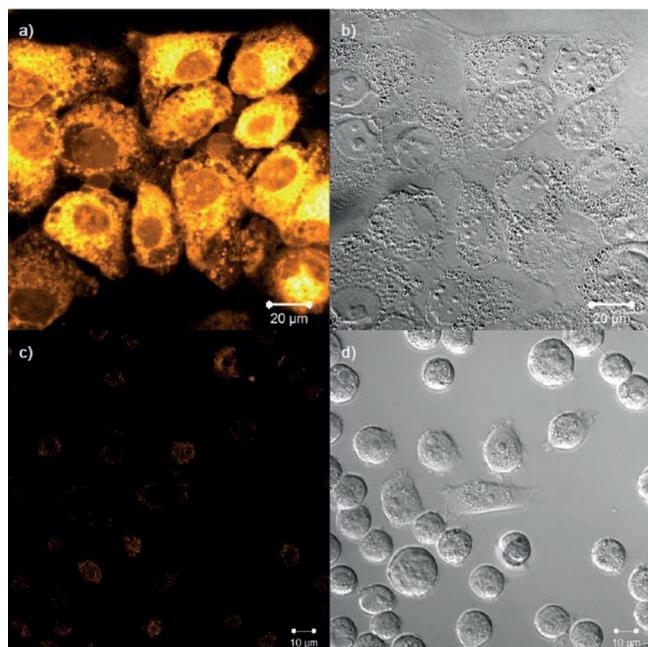


Abbildung 4. a) Fluoreszenz-Bildgebung mit der Cy5.5-markierten Verbindung **9** an der humanen oralen Karzinomzelllinie (OSCC) mit hoher $\alpha v \beta 6$ -Expressionsrate. b) Darstellung desselben Ausschnitts der HN-Zellen aus (a) mit Durchlichtmikroskopie. c) Fluoreszenz-Bildgebung mit der Cy5.5-markierten Verbindung **9** an der humanen Ovarialkarzinomzelllinie OVMZ6, welche eine niedrige Expressionsrate von $\alpha v \beta 6$ und hohe $\alpha v \beta 3$ -Expression besitzt. d) Darstellung desselben Ausschnitts der OVMZ6-Zellen aus (c) mit Durchlichtmikroskopie.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Studie ein bekanntes, RGD-enthaltendes Peptid aus dem Maul-und-Klauseuche-Virus, welches eine die RGD-Sequenz flankierende Helix besitzt, zu einem enzymatisch stabilen, cyclischen Nonapeptid verkleinern. Die Verbindung besitzt eine

subnanomolare Bindungsaffinität für $\alpha\beta\delta$ und außergewöhnlich hohe Subtypselektivität gegenüber anderen Integrinsubtypen. Zusammen mit den Ergebnissen der Dockingstudien bietet die NMR-Struktur des Peptids Einblicke in die molekularen Grundlagen der hohen Bindungsaffinität und Rezeptorsubtypselektivität. Erste Studien zur Fluoreszenzmarkierung von oralen Karzinomzellen deuten auf eine erfolgreiche medizinische Anwendbarkeit des Peptids hin, z. B. für die Krebsdiagnose und -therapie.

Acknowledgements

H.K. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ke 147/42-1) für den Reinhard Koselleck Grant.

Stichwörter: Cyclopeptide · Integrinhibitoren · Molekulare Bildgebung · Subtypselektivität · $\alpha\beta\delta$ -Integrin

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1535–1539
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1559–1563

- [1] V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161–173.
- [2] a) L. D. Walensky, G. H. Bird, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6275–6288; b) C. Yu, J. W. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 161–175; c) T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020–13041; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13234–13257.
- [3] a) R. Fasan, R. L. Dias, K. Moehle, O. Zerbe, J. W. Vrijbloed, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2109–2112; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2161–2164; b) R. Fasan, R. L. Dias, K. Moehle, O. Zerbe, D. Obrecht, P. R. Mittl, M. G. Grutter, J. A. Robinson, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 515–526.
- [4] Y. Takada, X. Ye, S. Simon, *Genome Biol.* **2007**, *8*, 215.
- [5] a) S. Neubauer, F. Rechenmacher, A. J. Beer, F. Curnis, K. Pohle, C. D'Alessandria, H. J. Wester, U. Reuning, A. Corti, M. Schwaiger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11656–11659; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11870–11873; b) S. Rahmouni, A. Lindner, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. R. Sobahi, H. Kessler, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5869–5874; c) D. Heckmann, A. Meyer, L. Marinelli, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3571–3574; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3641–3644; d) F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, R. Fassler, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1572–1575; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1612–1616; e) S. L. Goodman, M. Picard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 405–412.
- [6] T. G. Kapp, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, H. Kessler, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 1273–1295.
- [7] Y. Zhang, Y. Sun, F. Yang, J. Guo, J. He, Q. Wu, W. Cao, L. Lv, H. Zheng, Z. Zhang, *Viruses* **2013**, *5*, 1114–1130.
- [8] a) A. Bandyopadhyay, S. Raghavan, *Curr. Drug Targets* **2009**, *10*, 645–652; b) D. M. Ramos, D. Dang, S. Sadler, *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 125–130.
- [9] a) A. L. Tatler, G. Jenkins, *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2012**, *9*, 130–136; b) S. K. Agarwal, *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 131.
- [10] Für einen besseren Überblick siehe eine Auswahl neuerer Veröffentlichungen: 20-mer A20FMDV2: a) A. E. John, J. C. Luckett, A. L. Tatler, R. O. Awais, A. Desai, A. Hab-good, S. Ludbrook, A. D. Blanchard, A. C. Perkins, R. G. Jenkins, J. F. Marshall, *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 2146–2152; b) M. Ueda, T. Fukushima, K. Ogawa, H. Kimura, M. Ono, T. Yamaguchi, Y. Ikebara, H. Saji, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *445*, 661–666; 20-mer H2009.1: c) B. P. Gray, S. Li, K. C. Brown, *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 85–96; multimerisiertes RGDLATLRLQ: d) A. N. Singh, M. J. McGuire, S. Li, G. Hao, A. Kumar, X. Sun, K. C. Brown, *Theranostics* **2014**, *4*, 745–760.
- [11] Für einen besseren Überblick siehe eine Auswahl neuerer Veröffentlichungen: Cystinpeptide: a) X. Zhu, J. Li, Y. Hong, R. H. Kimura, X. Ma, H. Liu, C. Qin, X. Hu, T. R. Hayes, P. Benny, S. S. Gambhir, Z. Cheng, *Mol. Pharmaceutics* **2014**, *11*, 1208–1217; b) J. R. Hsiao, Y. Chang, Y. L. Chen, S. H. Hsieh, K. F. Hsu, C. F. Wang, S. T. Tsai, Y. T. Jin, *Head Neck* **2010**, *32*, 160–172.
- [12] a) S. Kraft, B. Diefenbach, R. Mehta, A. Jonczyk, G. A. Luekenbach, S. L. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 1979–1985; b) J. L. Wagstaff, S. Vallath, J. F. Marshall, R. A. Williamson, M. J. Howard, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7533–7535; c) J. L. Wagstaff, M. L. Rowe, S.-J. Hsieh, D. DiCara, J. F. Marshall, R. A. Williamson, M. J. Howard, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 11019–11028.
- [13] J. Chatterjee, B. Laufer, H. Kessler, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 432–444.
- [14] A. O. Frank, E. Otto, C. Mas-Moruno, H. B. Schiller, L. Marinelli, S. Cosconati, A. Bochen, D. Vossmeier, G. Zahn, R. Stragies, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9278–9281; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 9465–9468.
- [15] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415.
- [16] a) J. Chatterjee, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 254–269; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 268–283; b) O. Ovadia, S. Greenberg, J. Chatterjee, B. Laufer, F. Opperer, H. Kessler, C. Gilon, A. Hoffman, *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 479–487; c) J. Chatterjee, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331–1342; d) E. Biron, J. Chatterjee, O. Ovadia, D. Langenegger, J. Brueggen, D. Hoyer, H. A. Schmid, R. Jelinek, C. Gilon, A. Hoffman, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2595–2599; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2633–2637; e) J. Chatterjee, O. Ovadia, G. Zahn, L. Marinelli, A. Hoffman, C. Gilon, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5878–5881; f) B. Laufer, J. Chatterjee, A. O. Frank, H. Kessler, *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 141–146.
- [17] a) A. Bochen, U. K. Marelli, E. Otto, D. Pallarola, C. Mas-Moruno, F. S. Di Leva, H. Boehm, J. P. Spatz, E. Novellino, H. Kessler, L. Marinelli, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1509–1519; b) A. Jonczyk, B. Diefenbach, S. Goodman, U. Groth, G. Zischinsky, EP1196433, **2000**.
- [18] T. G. Kapp, M. Fottner, O. V. Maltsev, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, DOI: 10.1002/ange.201508713; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, DOI: 10.1002/anie.201508713.
- [19] Wir wählten das Peptid **10** für die Modellstudien aus, weil es das engste Analogon funktionalisierter Peptide ist, deren Funktionalisierung über eine Amidbindung zum NH_2 der Lysin-Seitenkette eingeführt wurde.
- [20] C. M. Nair, M. Vijayan, Y. V. Venkatachalapathi, P. Balaram, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 1183–1184.
- [21] X. Dong, N. E. Hudson, C. Lu, T. A. Springer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21*, 1091–1096.
- [22] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207.
- [23] H. Kawamata, K. Nakashiro, D. Uchida, K. Harada, H. Yoshida, M. Sato, *Int. J. Cancer* **1997**, *70*, 120–127.
- [24] M. A. Müller, J. Opfer, L. Brunie, L. A. Volkhardt, E. K. Sinner, D. Boettiger, A. Bochen, H. Kessler, K. E. Gottschalk, U. Reuning, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 2988–3000.

Eingegangen am 17. September 2015,
veränderte Fassung am 26. Oktober 2015
Online veröffentlicht am 9. Dezember 2015