

# Kleine Ursache, große Wirkung: Modifikation der Guanidiniumgruppe im RGD-Motiv reguliert die Integrinsubtypselektivität

Tobias G. Kapp, Maximilian Fottner, Oleg V. Maltsev und Horst Kessler\*

**Abstract:** Durch ihre einzigartige Rolle als Wasserstoffbrückendor und ihre positive Ladung ist die Guanidiniumgruppe eine wichtige pharmakophore Gruppe, welche häufig in synthetischen Liganden zu finden ist. Meist wird davon ausgegangen, dass eine chemische Modifizierung der Guanidiniumgruppe zum Verlust ihrer Wirkung führt. In dieser Arbeit zeigen wir, dass N-Methylierung, N-Alkylierung und N-Acylierung der Guanidiniumgruppe genutzt werden kann, um die Integrinsubtypselektivität des Integrinliganden Cilengitide gezielt zu beeinflussen. Anhand der Beispiele des  $\alpha\beta 6/\alpha 5\beta 1$ -biselektiven Peptids *c(isoDGRkphg)* sowie des  $\alpha\beta 6$ -selektiven Liganden *c(FRGDLAFp(NMe)K(Ac))* können wir außerdem zeigen, dass auf diese Weise die Bindungsaffinitäten dieser Liganden im Hinblick auf eine erhöhte  $\alpha\beta 6$ -Subtypselektivität abgestimmt werden können. Außerdem beschreiben wir eine neuartige Strategie zur Funktionalisierung von Integrinliganden. Durch das Einführen längerer N-Alkyl- und N-Acylguanidiniumgruppen gelang es uns, einen bisher unbekannten Verankerungspunkt für die Funktionalisierung des Moleküls zu finden, und gleichzeitig die Subtypselektivität zu erhöhen.

Integreine regulieren sowohl die Adhäsion von Zellen untereinander als auch zur extrazellulären Matrix („inside-out“- bzw. „outside-in“-Weiterleitung des Signals).<sup>[1]</sup> Ein gemeinsames Merkmal der Integrinfamilie ist deren heterodimere Struktur, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit.<sup>[2]</sup> Diese Untereinheiten bilden in Säugetieren 24 bekannte Subtypen, welche je nach Bindungspartner in Klassen eingeteilt werden können (z.B. Laminin, Kollagen). Acht dieser Subtypen bilden die Gruppe der Arg-Gly-Asp-bindenden (RGD) Integreine.<sup>[3]</sup> Diese Tripeptidsequenz ist in einer Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen (ECM-Proteine), wie etwa in Vitronektin und Fibronektin, anzutreffen.<sup>[4]</sup> Integreine sind an vielen pathologischen Prozessen beteiligt, beispielsweise der Metastasierung von Krebs und der Blutgefäßbildung von Tumoren.<sup>[5]</sup> Die strukturellen Unterschiede der verschiedenen Subtypen sind häufig gering, da die meisten an dieselben ECM-Proteine – wenn auch häufig mit stark unterschiedlicher Bindungsaffinität – binden können. Beispielsweise erkennt der Subtyp  $\alpha\beta 3$  die ECM-Proteine Vitronektin, von-Willebrand-Faktor, Fibrinogen, Osteopontin

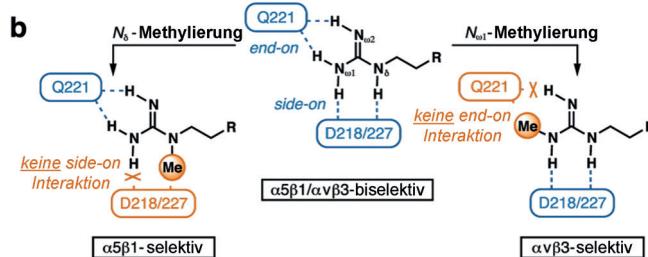
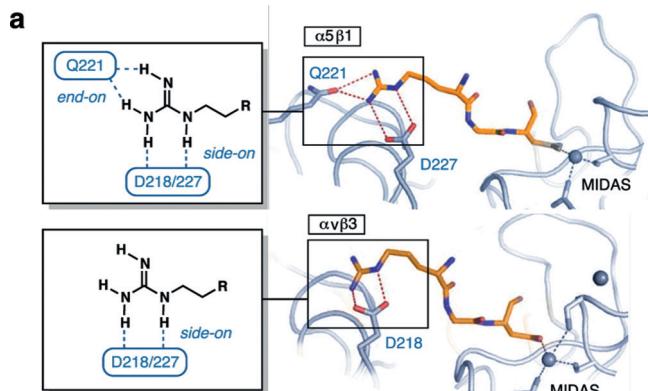
und Fibronektin.<sup>[6]</sup> Das stellt die Entwicklung von selektiven, synthetischen Liganden vor große Herausforderungen, insbesondere wenn es sich um Subtypen handelt, welche häufig koexprimiert sind, die aber in unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Kontexten eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang sind besonders die Subtypen  $\alpha\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$  von Bedeutung, da beide stark bei der Tumorigenese und -entwicklung beteiligt sind.<sup>[7]</sup> Das Hauptziel der frühen Ligandenentwicklung war vorrangig, Liganden mit einer hohen  $\alpha\beta 3$ -Affinität zu erhalten. Der Selektivität gegenüber anderen Subtypen (mit Ausnahme von  $\alpha IIb\beta 3$ ) wurde damals wenig Beachtung geschenkt.

Das räumliche Screening von cyclischen RGD-Peptiden führte zur Entwicklung von *c(RGDf(NMe)V)* (Cilengitide),<sup>[8,9]</sup> welches die höchste  $\alpha\beta 3$ -Bindungsaffinität dieser Ligandenklasse besitzt (0.54 nm). Daneben weist Cilengitide auch eine relativ hohe  $\alpha 5\beta 1$ -Affinität auf (15.4 nm).<sup>[8,10]</sup> Als später die biologische Bedeutung der einzelnen Subtypen klarer wurde, manifestierte sich der Bedarf an subtypspezifischen Peptiden. In einem parallelen Ansatz wurden von unserer Arbeitsgruppe und anderen<sup>[11]</sup> auch Peptidomimetika untersucht, die vor kurzem zur Entwicklung von  $\alpha\beta 3$ - bzw.  $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Liganden führten. Diese Verbindungen wurden für medizinische (z.B. molekulare Bildgebung) oder biophysikalische Studien funktionalisiert. Die Aufklärung der unterschiedlichen Rollen der Integrinsubtypen eröffnet neue Wege für eine zukünftige Anwendung dieser Liganden (z.B. in der personalisierten Medizin).<sup>[12]</sup>

Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne von  $\alpha\beta 3$  in Komplex mit Cilengitide zeigte erstmals den Bindungsmodus von RGD-Integrinliganden mit ihrem Rezeptor.<sup>[13]</sup> Die Schlüsselinteraktionen bei RGD-bindenden Integrinsubtypen sind die Interaktion mit der MIDAS-Region (metal-ion dependent adhesion site), welche sich in der  $\beta$ -Untereinheit befindet, und die starke, zweizähnige *side-on*-Wasserstoffbrückeninteraktion (Guanidinium-Carboxylat) in der  $\alpha$ -Untereinheit. Vor kurzem brachte die Aufklärung der Kristallstruktur von  $\alpha 5\beta 1$  in Komplex mit einem peptidischen Liganden einen bemerkenswerten und wichtigen Unterschied des Bindungsmodus der Guanidiniumgruppe in der  $\alpha$ - bzw.  $\alpha 5$ -Rezeptortasche zu Tage.<sup>[14]</sup> In der  $\alpha 5$ -Untereinheit ist die Guanidiniumgruppe an zwei Wechselwirkungen beteiligt: der zweizähnigen *side-on*-Interaktion von  $\text{HN}_8$  und  $\text{HN}_{\omega 1}$  mit Asp227 und der *end-on*-Interaktion von  $\text{HN}_{\omega 1}$  und  $\text{HN}_{\omega 2}$  mit Gln221. In der  $\alpha$ -Untereinheit ist die zweizähnige *side-on*-Wechselwirkung mit Asp218 dagegen die einzige Interaktion (Abbildung 1). In Kenntnis dieses strukturellen Einblicks interessierte uns, ob dieser kleine Unterschied für die rationale Entwicklung von peptidischen Integrinliganden genutzt werden könnte. Im Modellsystem eines biselektiven Liganden

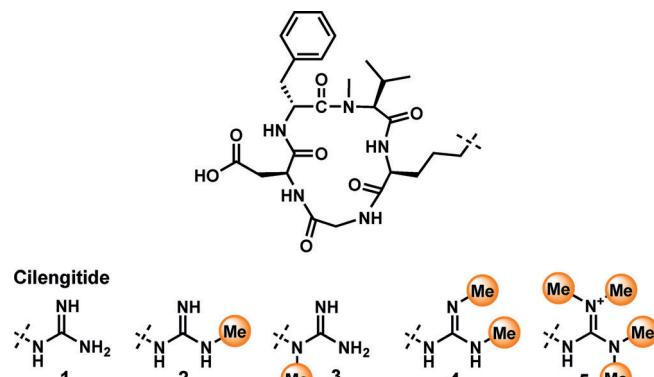
[\*] T. G. Kapp, M. Fottner, Dr. O. V. Maltsev, Prof. Dr. H. Kessler  
Institute for Advanced Study and Center for Integrated Protein Science (CIPSM), Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: kessler@tum.de

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508713> zu finden.



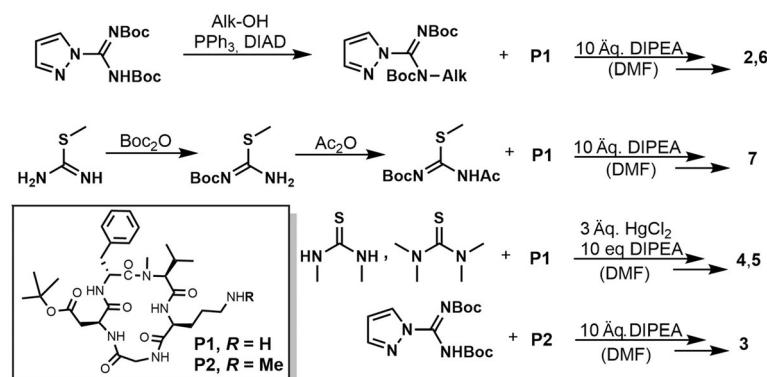
**Abbildung 1.** a) Bindung eines linearen RGD-Peptids an die Subtypen  $\alpha 5\beta 1$  (oben) und  $\alpha v\beta 3$  (unten). Die Unterschiede bestehen vor allem in der Interaktion der Guanidiniumgruppe von Arginin mit der Bindungstasche der  $\alpha 5$ - bzw.  $\alpha v$ -Untereinheit (siehe Vergrößerung im Kasten). Für  $\alpha 5\beta 1$  werden zwei Interaktionen beobachtet („side on“ und „end on“), für  $\alpha v\beta 3$  existiert nur eine „side on“-Interaktion. b) Konzept zur Generierung der Subtypselektivität: Eine biselektive Guanidiniumverbindung (Mitte) wird an  $N_{\omega}$  (rechts) methyliert → Verbesserung der Selektivität für  $\alpha v\beta 3$  durch Blockieren der end-on-Interaktion mit Q221,  $N_{\delta}$ -Methylierung (links) blockiert die side-on-Interaktion mit D218, die end-on-Interaktion ist weiter möglich → Verbesserung der  $\alpha 5\beta 1$ -Selektivität.

den sollte durch jeweils unterschiedliche Modifikation der Guanidiniumgruppe der Argininseitenkette theoretisch zwei Liganden mit entgegengesetzter Subtypselektivität erhalten werden können. Im ersten Fall würde das Blockieren der end-on-Wechselwirkung (Modifikation an  $N_{\omega 1}$ ) zu einer erhöhten  $\alpha v\beta 3$ -Selektivität führen, da ein signifikanter Beitrag zur Bindung an  $\alpha 5\beta 1$  wegfallen würde. Umgekehrt würde die Störung der Interaktion mit  $\alpha v\beta 3$  durch die Modifizierung an  $HN_{\delta}$  nur noch die end-on-Interaktion ermöglichen, wodurch die  $\alpha 5\beta 1$ -Selektivität verbessert würde. Für unsere Studie wählten wir das  $\alpha v\beta 3/\alpha 5\beta 1$ -biselektive Peptid Cilengitide als Modellsystem. Um die Interaktionen zu blockieren, wurden einzelne Protonen der Guanidiniumgruppe gezielt gegen Methylgruppen ausgetauscht. Diese Modifikation verhindert eine Wasserstoffbrückeninteraktion und bringt gleichzeitig nur minimale sterische und elektronische Veränderungen in das System ein. Um unsere Hypothese zu überprüfen, wurden vier methylierte Derivate von Cilengitide synthetisiert, darunter eine di- und eine tetramethylierte Verbindung (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Cilengitide (1) und modifizierte Guanidiniumderivate 2–7.

Für die Synthese der Verbindungen 2, 4, 5, 6 und 7 wurde zunächst das lineare, orthogonal Dde-geschützte Peptid H-Asp(O'Bu)-D-Phe-(NMe)Val-Orn(Dde)-Gly-OH durch Festphasenpeptidsynthese (SPPS) hergestellt, in Lösung cyclisiert und die Dde-Schutzgruppe anschließend abgespalten (Abbildung 3). Die Endverbindungen wurden nach entsprechender Guanidinylierung und Abspaltung der säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen erhalten. Für die Guanidinylierung selbst wurden zwei verschiedene Vorschriften verwendet. Die terminal monoalkylierten Verbindungen 2 und 6 wurden nach der Umsetzung mit entsprechend alkylierten Derivaten von *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin (P1, R = H; P2, R = Me) unter Mitsunobu-Bedingungen erhalten. Diese können durch Reaktion von *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin mit dem entsprechenden Alkohol (z.B. Ethanol für eine Ethylgruppe) unter Mitsunobu-Bedingungen erhalten werden.<sup>[15]</sup> Die Vorläuferverbindung zur Synthese des acetylierten Guanidiniumderivats 7 wurde ausgehend von S-Methylpseudothioharnstoff synthetisiert (Hintergrundinformationen, SI).<sup>[16]</sup> Bei der Umsetzung zu 4 und 5 wurde das orthogonal entschützte Peptid mit den ent-



**Abbildung 3.** Synthese der Verbindungen 2–7.

den erhalten. Diese können durch Reaktion von *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin mit dem entsprechenden Alkohol (z.B. Ethanol für eine Ethylgruppe) unter Mitsunobu-Bedingungen erhalten werden.<sup>[15]</sup> Die Vorläuferverbindung zur Synthese des acetylierten Guanidiniumderivats 7 wurde ausgehend von S-Methylpseudothioharnstoff synthetisiert (Hintergrundinformationen, SI).<sup>[16]</sup> Bei der Umsetzung zu 4 und 5 wurde das orthogonal entschützte Peptid mit den ent-

sprechenden, kommerziell erhältlichen Thioharnstoffen *N,N'*-Dimethylthioharnstoff und *N,N,N',N'*-Tetramethylthioharnstoff in Gegenwart von  $\text{NEt}_3$  als Base und  $\text{HgCl}_2$  als Aktivator umgesetzt. **3** wurde nach *N*-Methylierung der Seitenkette von Ornithin an der Festphase, Cyclisierung, *o*-Ns-Abspaltung in Lösung und Guanidinylierung mit *N,N*'-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin erhalten (SI).

Die Ergebnisse der In-vitro-Evaluierung der Liganden stimmten erstaunlich gut mit dem oben beschriebenen, theoretischen Modell überein. Für die Verbindung **2**, bei der die Guanidiniumgruppe an  $N_{\omega 1}$  methyliert ist, war die Bindungsaffinität für  $\alpha 5\beta 1$  komplett aufgehoben ( $> 1 \mu\text{M}$ ), wohingegen die  $\alpha 5\beta 3$ -Affinität von 0.54 nm auf 8.4 nm abnahm (Tabelle 1). Die terminale Methylgruppe verhindert dabei die

**Tabelle 1:** Bindungsaffinitäten von Cilengitide (**1**) und der Derivate **2–7** für die Subtypen  $\alpha 5\beta 3$  und  $\alpha 5\beta 1$ .<sup>[a]</sup>

	$\alpha 5\beta 3$ [nM]	$\alpha 5\beta 1$ [nM]
<b>1</b> <sup>[b]</sup>	$0.54 \pm 0.04$	$15.4 \pm 1.7$
<b>2</b>	$8.4 \pm 0.8$	i.a.
<b>3</b>	i.a.	$51 \pm 4.2$
<b>4</b>	i.a.	i.a.
<b>5</b>	i.a.	i.a.
<b>6</b>	$0.93 \pm 0.1$	i.a.
<b>7</b>	$6.5 \pm 0.5$	$15.3 \pm 0.9$

[a] Die Werte wurden in einem Festphasenbindungsassay nach etablierter Methode ermittelt.<sup>[20]</sup> Das Selektivitätsprofil gegenüber anderen Integrinen ist in den SI gezeigt. i.a.:  $> 1000 \text{ nM}$ . [b] Cilengitide.

*end-on*-Bindung; dagegen blockiert die  $N_8$ -Methylierung die *side-on*-Interaktion. In der  $\alpha 5$ -Untereinheit, wo diese *side-on*-Bindung die einzige Interaktion ist, führt die Modifizierung zu einem totalen Verlust der Bindungsaffinität. In der Bindungstasche der  $\alpha 5$ -Untereinheit ist die *side-on*-Bindung ebenfalls blockiert, jedoch ist eine *end-on*-Bindung weiter möglich, woraus sich bei Verbindung **3** eine Erhöhung der Selektivität zugunsten  $\alpha 5\beta 1$  ergibt, jedoch mit etwas reduzierter Gesamtaffinität (51 nm). Des Weiteren sollte eine Verbindung mit höherem Methylierungsgrad, bei der sowohl die *side-on*- als auch die *end-on*-Bindung blockiert ist, keine Integrin-Bindungsaffinität mehr besitzen. Die Evaluierung von **4** und **5** bestätigte diese Voraussage, die Verbindungen waren inaktiv sowohl gegenüber  $\alpha 5\beta 3$  als auch gegenüber  $\alpha 5\beta 1$  (jeweils  $> 1 \mu\text{M}$ ).

Nach genauerer Betrachtung des Modells der  $\alpha 5$ -Bindungstasche und unter Beachtung der Tatsache, dass in  $\alpha 5\beta 3$ -selektiven Peptidomimetika, die in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurden, 6-Methyl-2-aminopyridin als Mimetikum für die Guanidiniumgruppe eingesetzt wurde,<sup>[17]</sup> vermuteten wir, dass auch größere Alkylsubstituenten als die Methylgruppe in der Bindungstasche toleriert werden können. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass durch terminale Ethylierung der Guanidiniumgruppe ein Ligand mit einer wesentlich verbesserten Bindungsaffinität dargestellt werden kann. Mit einer Bindungsaffinität von 0.93 nm blieb in Verbindung **6** die hohe  $\alpha 5\beta 3$ -Affinität von Cilengitide nahezu erhalten, wobei für  $\alpha 5\beta 1$  und alle weiteren untersuchten Integrine keine

Bindung beobachtet wurde. Unter den bisher in der Literatur beschriebenen Integrinliganden besitzt **6** demnach einen der besten Werte für die  $\alpha 5\beta 3$ -Bindungsaffinität sowie ein exzellentes Selektivitätsprofil (siehe SI). Es ist bekannt, dass die Basizität von Acylguanidinen ( $\text{p}K_a \approx 8$ ) im Vergleich zu der unmodifizierten Guanidiniumgruppe ( $\text{p}K_a \approx 13$ ) um etwa 4–5 Größenordnungen reduziert ist,<sup>[18]</sup> für Alkylguanidine wird ein  $\text{p}K_a$ -Wert von 11–12 berichtet.<sup>[19]</sup> Daraus resultiert, dass in physiologischer Umgebung Guanidine und Alkylguanidine generell positiv geladen vorliegen, wohingegen Acylguanidine dort zumindest teilweise ungeladen sind. Diese reduzierte Basizität wird häufig zur gezielten Beeinflussung der pharmakokinetischen Eigenschaften, beispielsweise zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit, genutzt. Des Weiteren bilden Acylguanidine sowohl im geladenen als auch im ungeladenen Zustand ein planares System. Zusätzlich zu den oben beschriebenen *N*-alkylierten Guanidiniumderivaten wurde auch eine Verbindung mit einer terminal acetylierten Guanidiniumgruppe (**7**) untersucht. Interessanterweise wurde für **7** der bei den monoalkylierten Derivaten beobachtete Wechsel der Subtypselektivität nicht beobachtet. Dagegen wurde eine Erhöhung der  $\alpha 5\beta 1$ -Selektivität beobachtet: Während die Bindungsaffinität für  $\alpha 5\beta 1$  nahezu konstant blieb, nahm die  $\alpha 5\beta 3$ -Affinität von 0.54 nm (Cilengitide) auf 6.5 nm ab. Als mögliche Erklärung für diesen Effekt nehmen wir an, dass die Carbonylgruppe der Acetylgruppe mit einem Amidproton von Gln221 in der  $\alpha 5$ -Untereinheit wechselwirkt und so die nicht mehr vorhandene Interaktion zwischen  $\text{HN}_{\omega 1}$  und der Carbonylgruppe von Gln221 kompensieren kann.

Überrascht vom drastischen Einfluss dieser relativ einfachen Änderungen auf die Selektivität entschieden wir uns, diese Methode auch auf andere Systeme anzuwenden, um so das Selektivitätsprofil von Integrinliganden gezielt anpassen zu können. Insbesondere wollten wir untersuchen, ob eine terminale Alkylierung der Guanidiniumgruppe generell dazu geeignet ist, durch die Blockierung der *end-on*-Interaktion mit Gln221 die  $\alpha 5\beta 1$ -Bindungsaffinität signifikant zu erniedrigen bzw. komplett zu verlieren. Das erste untersuchte System war das  $\alpha 5\beta 6/\alpha 5\beta 1$ -biselektive, cyclische Peptid *c(isoDGRkphg)* (**10**).<sup>[21]</sup> Nach der Methylierung an  $N_{\omega 1}$  nahm die  $\alpha 5\beta 1$ -Affinität von 8.3 auf 120 nm ab, wohingegen die  $\alpha 5\beta 6$ -Affinität leicht von 18 auf 13 nm zunahm (Tabelle 2). In einem weiteren Beispiel untersuchten wir das kürzlich von

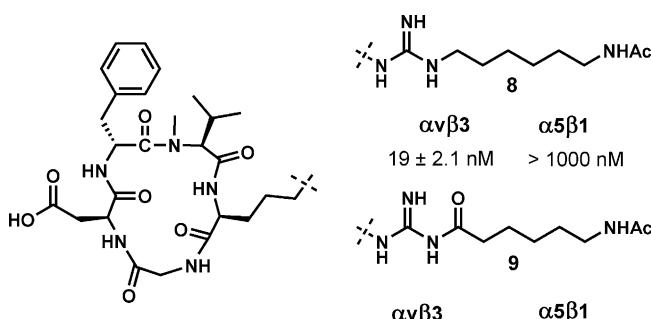
**Tabelle 2:** Bindungsaffinitäten der Verbindungen **10–14** für  $\alpha 5\beta 6$  und  $\alpha 5\beta 1$ .<sup>[a]</sup>

	$\alpha 5\beta 6$ [nM]	$\alpha 5\beta 1$ [nM]
<b>10</b> <i>c(isoDGRkphg)</i>	$18 \pm 2.5$	$8.3 \pm 0.7$
<b>11</b> <i>c(isoDGR(Me)kphg)</i> <sup>[b]</sup>	$13 \pm 2.1$	$120 \pm 15$
<b>12</b> <i>c(FRGDLAFp(NMe)K(Ac))</i>	$0.26 \pm 0.04$	$72 \pm 9$
<b>13</b> <i>c(FR(Me)GDLAFp(NMe)K(Ac))</i> <sup>[b]</sup>	$1.3 \pm 0.23$	i.a.
<b>14</b> <i>c(FR(Et)GDLAFp(NMe)K(Ac))</i> <sup>[b]</sup>	$0.28 \pm 0.03$	i.a.

[a] Die Werte wurden in einem Festphasenbindungsassay nach etablierter Methode ermittelt.<sup>[20]</sup> Das Selektivitätsprofil gegenüber anderen Integrinen ist in den SI gezeigt. i.a.:  $> 1000 \text{ nM}$ . [b] Der jeweilige Substituent an  $N_{\omega 1}$  des Arginins ist in Klammern nach R angegeben, z. B. R(Alk). Kleinbuchstaben (z. B. phg, k) kennzeichnen eine D-Aminosäure.

uns entwickelte Nonapeptid *c*(FRGDLAFp(NMe)K(Ac) (**12**), welches ein helikales Strukturmotiv strukturell imitiert.<sup>[22]</sup> Dieses Peptid besitzt eine sehr hohe  $\alpha\beta 3$ -Bindungsaffinität von 0.26 nm sowie eine Restaffinität von 72 nm für  $\alpha 5\beta 1$ . Genau wie in den vorigen Beispielen gelang die Anwendung der Modifizierungsmethode auch hier: Die Bindungsaffinität für  $\alpha 5\beta 1$  wurde durch die  $N_{\omega 1}$ -Methylierung der Guanidiniumgruppe von Arginin auf >1  $\mu\text{m}$  reduziert (**13**). Allerdings verringerte sich durch die Methode auch die  $\alpha\beta 3$ -Affinität signifikant, was jedoch, analog zum Fall von Cilengitide, durch den Wechsel zu einem Ethylsubstituenten kompensiert werden konnte (**14**  $\alpha\beta 3$ : 0.28 nm).

Wie oben gezeigt, erlaubt uns die Substitution der Guanidiniumgruppe, die Subtypselektivität für  $\alpha\beta 3$ - bzw.  $\alpha 5$ -enthaltende Integrine gezielt zu beeinflussen. Bei Betrachtung der strukturellen Bedingungen in den Bindungstaschen der beiden  $\alpha$ -Untereinheiten scheint es, als wäre der Raum in Verlängerung zu  $\text{HN}_{\omega 2}$  jeweils frei. Eine lange *N*-Alkyl- bzw. *N*-Acylkette an  $N_{\omega 2}$  würde eine neue Art der Funktionalisierung von Integrinliganden erlauben, wobei gleichzeitig die Bindungswechselwirkung stattfinden kann und eine Anbindungsmöglichkeit geschaffen wird. Um dieses Konzept erstmalig zu verifizieren, wurden zwei funktionalisierbare Verbindungen hergestellt: ein mit 6-Acetylaminohexansäure acyliertes Derivat (**8**) sowie ein mit 6-Acetylaminohexyl alkyliertes Derivat (**9**) (Abbildung 4). Zur Herstellung von **8**



**Abbildung 4.** Funktionalisierung von Cilengitide über die Guanidiniumgruppe.

und **9** wurde das orthogonal Dde-entschützte Peptid P1 in Lösung mit der jeweiligen Vorläuferverbindung umgesetzt. Das alkylierte Reagens wurde dabei ausgehend von *N,N'*-Di-Boc-1*H*-pyrazol-1-carboxamidin, die acylierte Verbindung dagegen aus *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylpseudothioharnstoff hergestellt (siehe SI).

Die Ergebnisse der In-vitro-Evaluierung bestätigten unsere Hypothesen. Durch beide Modifikationen konnten jeweils die ersten Guanidinium-funktionalisierten Integrinliganden erhalten werden, die Affinitäten für  $\alpha\beta 3$  betragen jeweils um 20 nm mit kompletter Selektivität gegenüber  $\alpha 5\beta 1$ . Die bei Verbindung **7** beobachtete Interaktion, die zu einer verbesserten  $\alpha 5\beta 1$ -Affinität führte, ist bei **9** durch sterische Hinderung nicht möglich. Stattdessen zeigt der lineare Aminohexansäurerest aus der Bindungstasche hinaus. Das Gleiche wurde auch für den Hexylguanidinium-Linker be-

obachtet. Die Bindungsaffinitäten für diese neue Klasse von funktionalisierten Derivaten sind vergleichbar mit der Affinität der Verbindung *c*(RGDfK(AhxAc)), dem „Goldstandard“ funktionalisierter Integrinliganden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass durch einfache Modifikationen der Guanidiniumgruppe die Integrin-subtypspezifität in zwei unterschiedliche Richtungen beeinflusst werden kann. Die erhaltenen, isomeren Verbindungen, die sich lediglich in der Position der Methylgruppe an der Guanidiniumgruppe unterscheiden, zeigen ein exakt entgegengesetztes Selektivitätsprofil gegenüber  $\alpha\beta 3$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -enthaltenden Subtypen. Des Weiteren wurde die Anwendbarkeit dieser Methode anhand von zwei weiteren Systemen demonstriert, wobei dabei die Selektivität von  $\alpha\beta 3$  gegenüber  $\alpha 5\beta 1$  deutlich verbessert werden konnte. Zuletzt konnten wir zeigen, dass über die Substitution der Guanidiniumgruppe auch eine Funktionalisierung von Integrinliganden möglich ist.

### Danksagung

T.G.K. dankt der International Graduate School for Science and Engineering (IGSSE) der Technischen Universität München für die finanzielle Unterstützung. H.K. dankt CIPSM und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für Unterstützung.

**Stichwörter:** Cilengitide · Integrinliganden · Peptidmodifikation · Rezeptorsubtypselektivität · RGD-Motiv

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1540–1545  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 1564–1568

- [1] S. J. Shattil, C. Kim, M. H. Ginsberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 288–300.
- [2] M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311–339.
- [3] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [4] M. D. Pierschbacher, E. Rouslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [5] a) S. L. Goodman, M. Picard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 405–412; b) T. G. Kapp, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, H. Kessler, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 1273–1295; c) J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22; d) U. K. Marelli, F. Rechenmacher, T. R. A. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 222.
- [6] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.
- [7] R. O. Hynes, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918–921.
- [8] 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.
- [9] C. Mas-Moruno, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 753–768.
- [10] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54.
- [11] a) R. Dayam, F. Aiello, J. Deng, Y. Wu, A. Garofalo, X. Chen, N. Neamati, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4526–4534; b) 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; c) F. Zanardi, P. Burreddu, G. Rassu, L. Auzzas, L. Battistini, C. Curti, A. Sartori, G. Nicastro, G. Menchi, N. Cini, A. Bottonocetti, S. Raspanti, G. Casiraghi, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1771–1782; d) L. Gentilucci, G. Cardillo, S. Spampinato, A.

Tolomelli, F. Squassabia, R. De Marco, A. Bedini, M. Baiula, L. Belvisi, M. Civera, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 106–118; e) L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207; f) D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1397–1407.

[12] a) F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Calvalcanti-Adam, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1572–1575; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1612–1616; b) 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.

[13] a) J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2001**, *294*, 339–345; b) J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151–155.

[14] M. Nagae, S. Re, E. Mihara, T. Nogi, Y. Sugita, J. Takagi, *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 131–140.

[15] a) G. Maccari, S. Sanfilippo, F. De Luca, D. Deodato, A. Casian, M. C. D. Lang, C. Zamperini, E. Dreassi, G. M. Rossolini, J.-D. Docquier, M. Botta, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5525–5529; b) S. Rossiter, C. L. Smith, M. Malaki, M. Nandi, H. Gill, J. M. Leiper, P. Vallande, D. Selwood, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4670–4678.

[16] S. Weiss, M. Keller, G. Bernhardt, A. Buschauer, B. König, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6292–6304.

[17] S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Brimiouille, F. S. Di Leva, A. Bochen, T. R. Sobahi, M. Schottelius, E. Novellino, C. Mas-Moruno, L. Marinelli, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 3410–3417.

[18] R. Kleinmaier, M. Keller, P. Igel, A. Buschauer, R. M. Gschwind, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11223–11233.

[19] S.-X. Xie, P. Ghorai, Q.-Z. Ye, A. Buschauer, R. Seifert, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *317*, 1139–1146.

[20] 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.

[21] 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.

[22] O. V. Maltsev, U. K. Marelli, T. G. Kapp, F. S. Di Leva, S. Di Marco, M. Nieberler, U. Reuning, M. Schwaiger, E. Novellino, L. Marinelli, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, DOI: 10.1002/anie.201508709; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, DOI: 10.1002/ange.201508709.

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