

Peptidmimetika

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201509782
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201509782

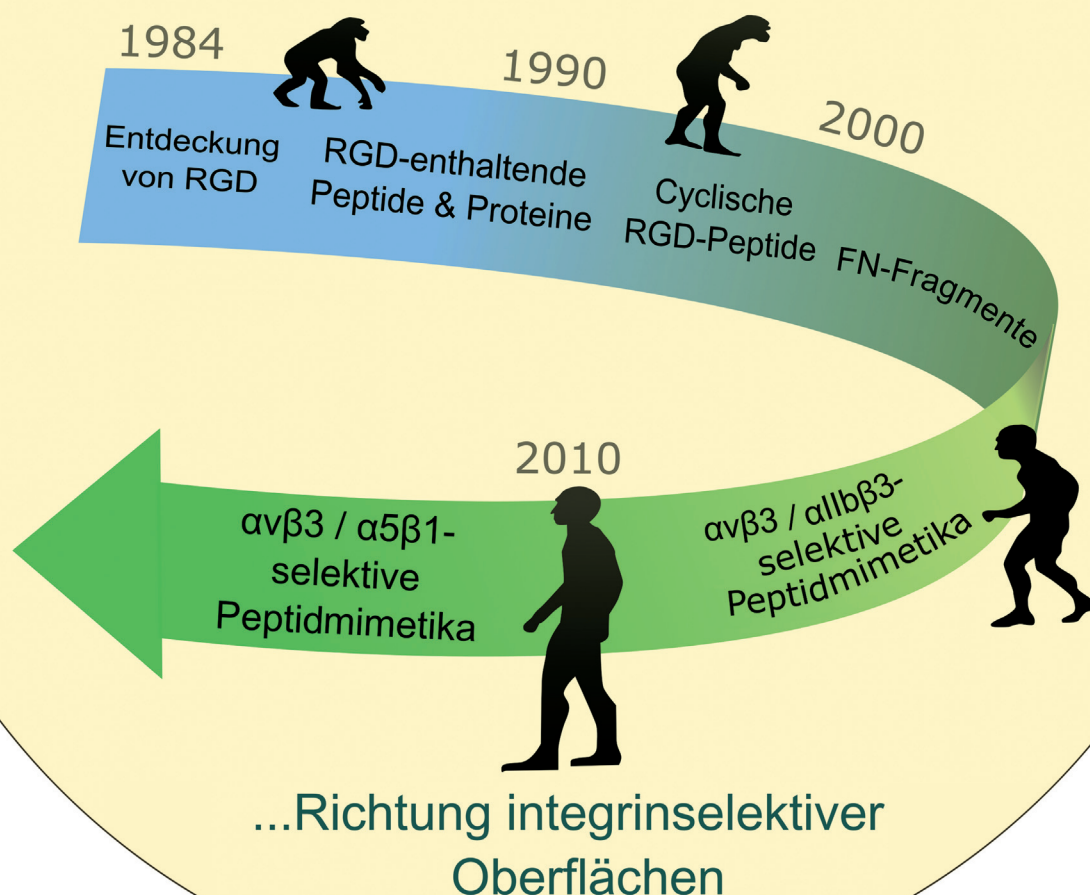
$\alpha\text{v}\beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-selektive Peptidmimetika für die Oberflächenbeschichtung

Carlos Mas-Moruno,* Roberta Fraioli, Florian Rechenmacher, Stefanie Neubauer, Tobias G. Kapp und Horst Kessler*

Stichwörter:

Integrine ·
Oberflächenbeschichtung ·
Peptidmimetika ·
Rezeptorselektivität ·
RGD-Peptide

Die Evolution von Verbindungen zur Oberflächenbeschichtung



Die Entwicklung von Biomaterialien mit Bindungsaffinität für Integrine ist eine ausgezeichnete Methode, die Zelladhäsion zu fördern, zelluläres Verhalten zu regulieren und spezifische biologische Antworten auf der Zelloberfläche zu induzieren. Das Ziel dieses Aufsatzes ist es, die Evolution von Verbindungen für die Beschichtung darzustellen: angefangen von Peptiden und Proteinen mit relativ niedriger Integrinbindungsaffinität und -selektivität bis hin zu hochaffinen und subtypselektiven Peptidmimetika. Insbesondere werden wir auf die Herausforderungen eingehen, die auf dem Weg zu einer Selektivität zwischen den strukturell eng verwandten Subtypen $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$ zu meistern waren. Die Oberflächenfunktionalisierung mit diesen Peptidmimetika öffnet den Weg für eine neue Generation von spezifisch modifizierten Oberflächen, die das Verhalten von Zellen gezielt beeinflussen können. Diese dienen sowohl zur Aufklärung der biologischen Rolle des jeweiligen Integrins als auch für eine Anwendung im „Tissue-Engineering“ und in der regenerativen Medizin.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	7163
2. Die biologische Funktion der Integrinsubtypen $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$	7166
3. Die Entwicklung von subtypspezifischen $\alpha\beta3$ - und $\alpha5\beta1$ -Liganden	7167
4. Beschichtung von Oberflächen mit $\alpha\beta3$ - oder $\alpha5\beta1$ -selektiven Liganden	7173
5. Zusammenfassung und Ausblick	7179

1. Einleitung

Integrine bilden die wichtigste Familie der Zelladhäsionsrezeptoren. Sie sind heterodimere, bidirektionale Rezeptoren auf der Zelloberfläche und von entscheidender Bedeutung für die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix (ECM).^[1] Durch die Wechselwirkung mit Liganden aus der ECM werden durch Integrine intrazelluläre Signaltransduktionswege aktiviert und Prozesse wie Zellmigration und -adhäsion gesteuert. Seit der Entdeckung und erstmaligen Einordnung der Integrine in den späten 1980er Jahren^[2] stand die Erforschung der Struktur, der Ligandenbindung und der biologischen Funktion der Integrine im Fokus der Forschung. Dies macht die Integrine zu der heute am besten untersuchten Klasse von Adhäsionsrezeptoren.


Die Integrinfamilie umfasst mindestens 24 Subtypen; diese werden aus 18 α - und 8 verschiedenen β -Untereinheiten gebildet und durch nichtkovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Beide Untereinheiten sind Typ-I-Membranproteine, die jeweils aus einer großen Ektodomäne sowie einer kurzen, typischerweise nicht katalytischen, cytoplasmatischen Domäne aufgebaut sind. Verbunden werden diese beiden Einheiten durch eine einzelne transmembrane Helix (Abbildung 1).^[3] Die Affinität von Integrinen gegenüber ihren Liganden wird durch die zelluläre Signalgebung reguliert, was zu einer Rezeptoraktivierung führt, diese wird auch als „Inside-out“-Signalgebung bezeichnet.^[4] So dient die intrazelluläre Salzbrücke zur Kontrolle dieser „Inside-out“-Signalgebung: die Auflösung der Salzbrücke zwischen den membrannahen Bereichen der α - und β -Untereinheiten der cytoplasmatischen Domänen (welche den Ruhezustand des Integrins stabilisiert) verstärkt die Adhäsion an den ECM-Liganden.^[5] Umgekehrt führt die Bindung eines ECM-Liganden zu einer Konformationsänderung des Integrins, was eine Trennung der transmembranen Helizes auslöst.^[3c] Dies

führt zu einer Clusterbildung in Oligomere, was die „Outside-in“-Signalgebung initiiert.^[4a,6] Die Ligandenbindung erfolgt schon im membranassoziierten (Ruhe-)Zustand des Integrins; für die Signalweiterleitung ist die Trennung der beiden transmembranen Helizes nötig, was dann zur Rezeptoroligomerisierung und intrazellulären Phosphorylierung durch Kinasen führt.^[7] Daher werden Integrine als bidirektionale Signalmaschinen angesehen, welche die Polarität der Zelle, Adhäsionsprozesse und das Überleben der Zelle steuern. Beim Prozess der Zelladhäsion vermitteln Integrine die Kraftweiterleitung von fokalen Adhäsionspunkten (FAs) auf ECM-Proteine, ein Prozess der als Mechanotransduktion bezeichnet wird.^[8]

Embryogenese, die Entwicklung von Gewebe, Angiogenese und die Funktion des Immunsystems hängen daher stark von der Integrinaktivität ab.^[9] Des Weiteren sind Integrine an pathologischen Prozessen wie Thrombose, Osteoporose, Tumorbildung und -progression, Metastasierung und Entzündungen beteiligt.^[10] Wegen der erwähnten entscheidenden biologischen Funktionen ist es nicht verwunderlich, dass In-

[*] Dr. C. Mas-Moruno, R. Fraioli
Biomaterials, Biomechanics and Tissue Engineering Group
Department of Materials Science and Metallurgical Engineering
and Centre for Research in NanoEngineering
Universitat Politècnica de Catalunya (UPC)
Diagonal 647, 08028 Barcelona (Spanien)
E-Mail: carles.mas.moruno@upc.edu

Dr. F. Rechenmacher, Dr. S. Neubauer, Dr. T. G. Kapp,
Prof. Dr. H. Kessler
Institute for Advanced Study at the Department Chemie
und Center of Integrated Protein Science München (CIPSM)
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: Kessler@tum.de

 Die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201509782> zu finden.

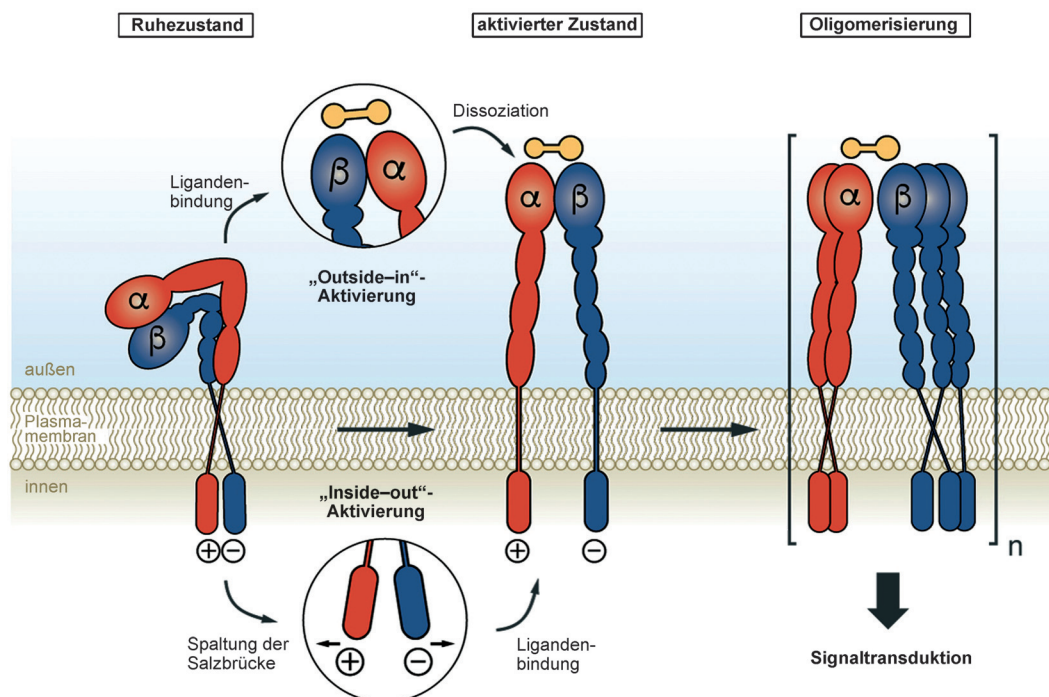


Abbildung 1. Verschiedene Stadien der Integrinaktivierung sowie die Mechanismen der „Inside-out“- und „Outside-in“-Signalweiterleitung. In der geknickten Form haben Integrine eine niedrige Affinität für ECM-Liganden. Bei der „Inside-out“-Signalgebung wird zunächst die intramolekulare Salzbrücke gebrochen, die im cytoplasmatischen Teil zwischen der α- und β-Untereinheit vorhanden ist. Dadurch wird die Dissoziation der transmembranen Helizes induziert, woraufhin eine Reorganisation und Multimerisierung der Rezeptoren zu fokalen Adhäsionspunkten (FAs) stattfindet. Diese FAs binden an die ECM-Liganden mit sehr hoher Affinität. Konformationsänderungen im Ruhezustand des Integrins und Oligomerisierung können aber auch durch die Bindung von ECM-Liganden induziert werden, was dann die stärkere Bindung der FAs auslöst. Die „Outside-in“-Signalgebung setzt eine Oligomerisierung der Integrinrezeptoren voraus.



Carles Mas Moruno studierte Chemie an der Universität Barcelona. Er promovierte 2009 in der Arbeitsgruppe von Prof. F. Albericio am Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona). Anschließend wurde er Post-Doc in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kessler an der Technischen Universität München (2009–2011). Danach erhielt er einen Marie Curie Career Integration Grant und schloss sich der Gruppe Biomaterialien, Biomechanik und „Tissue Engineering“ der Technischen Universität von Katalonien an. Seine Forschungsinteressen liegen in der Funktionalisierung von Biomaterialien für Anwendungen in der regenerativen Medizin.



Florian Rechenmacher studierte Chemie an der Technischen Universität München (TUM). Nach dem Masterabschluss (M.Sc.) in organischer und biologischer Chemie im Jahr 2009 schloss er sich der Gruppe von Prof. H. Kessler an. Hauptforschungsgebiete in seiner Doktorarbeit (Promotionsjahr 2013) waren die Funktionalisierung von α5β1-spezifischen Antagonisten für zahlreiche medizinische Anwendungen und Untersuchungen von cyclischen Peptiden zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit.



Roberta Fraioli studierte Materials Engineering an der Università degli Studi di Napoli Federico II. Nach dem Masterabschluss (M.Sc.) im Jahre 2012 schloss sie sich der Gruppe Biomaterialien, Biomechanik und „Tissue Engineering“ der Technischen Universität von Katalonien in Barcelona an. Vor kurzem absolvierte sie einen Forschungsaufenthalt in der Gruppe von Prof. Dalby am Centre for Cell Engineering der University of Glasgow (UK). Derzeit schließt sie unter Anleitung von Dr. Mas-Moruno ihre Doktorarbeit über die Funktionalisierung von Oberflächen mit integrinselektiven peptidbasierten Liganden zur gezielten Steuerung der Entwicklung von Stammzellen und verbesserten Osteointegration ab.



Stefanie Neubauer studierte Chemie an der Technischen Universität (TUM). Im Jahr 2007 schloss sie sich der Gruppe von Prof. H. Kessler für ihre Diplomarbeit und Doktorarbeit im Bereich organische und biologische Chemie an. Dabei erforschte sie die Synthese und Funktionalisierung von peptidischen und nichtpeptidischen integrinsubtypspezifischen Antagonisten für medizinische Anwendungen wie Oberflächenbeschichtung und molekulare Tumorbildgebung. Als Post-Doc in der Gruppe von Prof. J. P. Spatz am Max-Planck-Institut in Stuttgart untersuchte sie funktionalisierte Integrinantagonisten in biophysikalischen und zellulären Studien.

tegrine häufig als Ziel für die Entwicklung von Wirkstoffen bei unterschiedlichsten Indikationen dienen.^[10b,11] Beispielsweise sind Antagonisten für den Blutplättchenrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Abciximab, Eptifibatide und Tirofiban) als Inhibitoren für die Aggregation der Blutplättchen zugelassen, sie reduzieren so das Risiko der Ischämie bei akuten Herzproblemen.^[12] Natalizumab, ein $\alpha\text{L}\beta 2$ -Inhibitor, wurde für die Behandlung von Psoriasis zugelassen.^[13] Cilengitide, ein hochpotenter Antagonist für die Integrine $\alpha\text{v}\beta 3$, $\alpha\text{v}\beta 5$ und $\alpha 5\beta 1$, erreichte die klinische Phase III für die Behandlung von Glioblastom und wird derzeit in Phase II für andere Krebsarten evaluiert.^[16] Obwohl einige Einschränkungen für diese Medikamente beschrieben wurden,^[17] verdeutlichen diese Beispiele das pharmakologische Potenzial von Integrinen als Target für die Wirkstoffentwicklung.

Das Verständnis der biologischen Funktion der Integrin-Subtypen ist von größter Bedeutung für die Entwicklung von neuen Medikamenten mit hoher Wirksamkeit bei gleichzeitig reduzierten Nebenwirkungen. Der Fortschritt auf diesem Gebiet wurde lange durch die geringe Zahl an subtypspezifischen Liganden beeinträchtigt. Die Thematik der Ligandspezifität wurde exemplarisch am Beispiel des bekannten Integrinliganden, dem Peptid mit der Sequenz RGD, gezeigt.^[18] Obwohl viele Integrine an die ECM durch die Er-

kennung des gemeinsamen RGD-Motivs binden, sind die Rezeptoren in der Lage, zwischen vielen verschiedenen natürlichen Liganden zu unterscheiden.^[19] Entscheidende Parameter für diese Subtypspezifität sind vor allem die Anwesenheit von komplementären oder synergistischen Domänen im ECM-Protein, die Art der flankierenden Aminosäure sowie die Konformation oder räumliche Präsentation des Bindungsmotivs.

Während der vergangenen dreißig Jahre wurden intensive daran gearbeitet, die strukturellen Voraussetzungen für spezifische Bindung von Integrinen aufzuklären. Das Ziel war es, potente und selektive Liganden für biomedizinische Anwendungen zu entwickeln. Die Integrine $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$, Schlüsselkomponenten bei Zelladhäsion und -differenzierung, der Angiogenese und dem Tumorstadium, wurden in diesem Zusammenhang als besonders vielversprechende Zielstrukturen betrachtet. Durch die Einschränkung des Konformationsraums der RGD-Peptide mittels Cyclisierung, Einführung von D-Aminosäuren und durch umfassende strukturelle Untersuchungen konnten wir zu Beginn der 1990er Jahre cyclische RGD-Peptide mit sehr hohen Bindungsaffinitäten für $\alpha\text{v}\beta 3$ und mit Selektivität gegenüber $\alpha\text{IIb}\beta 3$ erhalten.^[20]

Jedoch war es mit cyclischen Peptiden nicht möglich, die beiden eng verwandten Subtypen $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ zu unterscheiden (abgesehen von einigen bemerkenswerten Ausnahmen, z. B. den neuesten Entwicklungen auf dem Gebiet der *isoDGR*-Peptide).^[21] Selektivität zwischen diesen beiden Subtypen wurde jedoch mit synthetischen RGD-basierten Peptidmimetika erreicht. Die Entwicklung dieser selektiven Liganden wurde erst durch detaillierte Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung und nach dem Bekanntwerden der Kristallstruktur von $\alpha\text{v}\beta 3$ ^[22] und Homologiemodellen für $\alpha 5\beta 1$ ^[23] ermöglicht (die Kristallstruktur des Letzteren wurde erst im Jahre 2012 beschrieben).^[24] Diese Verbindungen konnten bereits ihr großes Potenzial als Integrin-Antagonisten für die Behandlung von Krebs, bei der molekularen Bildgebung, in biophysikalischen Studien und zur Aufklärung der biologischen Funktion dieser beiden wichtigen Integrine bestätigen.

Parallel dazu wurden ECM-Proteine und kleine synthetische Peptide dazu verwendet, eine Fülle von Materialien zu funktionalisieren, um deren Eigenschaften zu verbessern und Zelladhäsionsprozesse an Oberflächen zu ermöglichen. In vielen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung und Signalgebung an der Oberfläche eines biointerten Materials die Adhäsion von Zellen, die Proliferation sowie die Differenzierung stark verbessern können. Mithilfe dieser Strategie wurde bereits eine neue Generation von Biomaterialien für die Anwendung im „Tissue-Engineering“ und in der regenerativen Medizin entwickelt. Überraschenderweise wurden bisher allerdings nur selten Peptidmimetika zur Beschichtung von Oberflächen eingesetzt, die meisten Studien dagegen verwendeten RGD-Peptide und Proteine mit geringer Subtypspezifität.^[25]

Das Ziel dieses Aufsatzes ist daher, den Gebrauch von RGD-basierten Peptidmimetika mit Selektivität für $\alpha\text{v}\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$ für die gezielte, spezifische Modifizierung der Oberflächen von Biomaterialien aufzuzeigen. Wir werden



Tobias Kapp studierte Chemie an der Technischen Universität München (TUM). Nach dem Abschluss seines Masters (M.Sc.) in organischer und biologischer Chemie im Jahr 2011 schloss er sich der Arbeitsgruppe von Prof. H. Kessler an. Er arbeitet am Design und der Synthese von Liganden für den Chemokinrezeptor CXCR4 und verschiedene Integrin-Subtypen. Ein wesentlicher Teil seiner Arbeit beschäftigt sich weiterhin mit der Entwicklung von speziellen Funktionalisierungsstrategien für diese Liganden, welche ihre Anwendung biophysikalischen und medizinischen Studien finden.



Horst Kessler studierte Chemie in Leipzig und Tübingen und wurde im Jahr 1971 von der J.-W.-Goethe-Universität in Frankfurt zum Lehrstuhlinhaber ernannt. 1989 wechselte er an die Technische Universität München (TUM). 2008 wurde er zum Carl-von-Linde-Professor des Institute for Advanced Study (IAS) der TUM ernannt. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Entwicklung von peptidischen und peptidmimetischen Wirkstoffen sowie die NMR-Spektroskopie.

hier auch eine historische Einordnung der Entwicklung von subtypeselektiven Peptidmimetika ausgehend vom RGD-Motiv geben, wobei stellvertretend einige Beispiele aus unserer Arbeitsgruppe vorgestellt werden. Die Verwendung dieser Liganden für die Beschichtung von Oberflächen, sowohl in medizinischen als auch in biophysikalischen Studien, wird hier vorgestellt. Des Weiteren soll ein Ausblick in die Zukunft dieser Integrinliganden gegeben werden.

2. Die biologische Funktion der Integrinsubtypen $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$

Die Integrinsubtypen $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ wurden von der Arbeitsgruppe um Ruoslahti im Jahre 1985 entdeckt und zunächst nach deren natürlichen ECM-Liganden als Vitronektin(VN)- bzw. Fibronektin(FN)-Rezeptor benannt.^[26] Beide Subtypen erkennen die RGD-Sequenz, die bereits 1984 als minimales Adhäsionsmotiv beschrieben wurde.^[18] Nach heutigem Stand bindet etwa ein Drittel der 24 bekannten Integrine an dieses RGD-Motiv, darunter z. B. alle αv -Integrine, das Integrin $\alpha 5\beta 1$ sowie das Blutplättchenintegrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$.^[27] Im Unterschied zu $\alpha\text{v}\beta 3$, das mit mehreren verschiedenen ECM-Proteinen wie VN, FN, Osteopontin und dem Knochensialoprotein wechselwirken kann, bindet der Integrinsubtyp $\alpha 5\beta 1$, aufgrund der Synergiedomäne mit der Sequenz PHSRN in unmittelbarer Nähe des Adhäsionsmotivs, vor allem an FN.^[28] Außerdem wurden für beide Subtypen auch noch andere natürliche Bindungspartner in der ECM, teilweise mit stark unterschiedlichen Bindungsaffinitäten, beschrieben.^[27b,c]

Auch die Herstellung von initialen fokalen Adhäsionspunkten und deren weitere Ausdifferenzierung wird durch Integrine vermittelt. Die geometrische Lokalisierung, die Gestalt und die Dimension dieser Adhäsionspunkte hängen stark vom Expressionsprofil, von der Verfügbarkeit der Liganden in der Mikroumgebung der Zelle und von der Kultivierungszeit ab. In diesem Zusammenhang wurde von der Arbeitsgruppe um Geiger gezeigt, dass naszierende fokale Adhäsionskomplexe eine starke $\alpha\text{v}\beta 3$ -Expression zeigen, wohingegen $\alpha 5\beta 1$ vor allem in vollständig ausgebildeten, fibrillären fokalen Adhäsionspunkten vorkommt.^[29] Jeder Subtyp hat unterschiedliche charakteristische Organisationsformen des Aktin-Cytoskeletts, was sich auf die Gestalt der Zelle auswirkt: $\alpha\text{v}\beta 3$ überexprimierende Zellen zeichnen sich durch breite Lamellipodien und niedrige RhoA-Aktivität (eine kleine GTPase) aus. Dagegen finden sich in Zellen mit hoher Expression von $\alpha 5\beta 1$ wohldefinierte Aktin-Fibrillen sowie eine hohe RhoA-Aktivität.^[30] Diese Beobachtungen der Zellmorphologie und der Organisation der Aktinfilamente korrelieren sehr gut mit der unterschiedlichen Kraftwahrnehmung und -übertragungsmöglichkeiten der verschiedenen Integrinsubtypen. Roca-Cusachs et al. zeigten, dass $\alpha 5\beta 1$ -Cluster hohe Krafteinwirkungen der Matrix vermitteln, $\alpha\text{v}\beta 3$ hingegen initiiert Mechanotransduktion und verstärkt eine bereits vorhandene Kraft auf FN-basierten Oberflächen.^[31] In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Zellen, die $\alpha 5\beta 1$ -vermittelt an Substrate binden, höhere Kräfte entwickeln

können als bei einer Bindung über den Subtyp $\alpha\text{v}\beta 3$.^[32] In einer anderen Studie berichtete die Arbeitsgruppe um Giannone über eine unterschiedliche dynamische nanostrukturierte Organisation der $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Integrine, die lokal Kräfte entwickeln und so die Signalgebung während zellulärer Funktionen wie Migration und Umgestaltung der ECM beeinflussen können.^[33] Die Arbeitsgruppe um Fässler konnte kürzlich in FN-basierten Modellsystemen zeigen, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrine dort die Kraft erzeugen, während die αv -Integrine eher bei der strukturellen Anpassung an Kräfte eine Rolle spielen.^[34] Bei dieser Studie konnten sie verschiedene Funktionen der beiden Integrinsubtypen $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ aufklären; diese arbeiten unter anderem bei der Zellkontraktion und dem Fühlen der Steifigkeit der Umgebung zusammen.

Neben fokalen Adhäsionspunkten und der Organisation von Aktinfilamenten konnte auch gezeigt werden, dass bestimmte Integrinsubtypen Auswirkungen auf die Proliferation und die Differenzierung von Zellen haben können. Trotzdem sind Untersuchungen zur Rolle der Integrine $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ beim Zellwachstum häufig widersprüchlich. So wurde in einigen Studien gezeigt, dass $\alpha 5\beta 1$ die Zelladhäsion und Proliferation unterstützt.^[35] Beispielsweise wurde durch die Blockade von $\alpha 5\beta 1$ eine signifikante Reduzierung des Transkriptionsfaktors c-Fos beschrieben, der mit der Zellproliferation assoziiert ist.^[35c] Demgegenüber stehen Beobachtungen von anderen Autoren, welche diesem Rezeptor keinen Einfluss auf das Zellwachstum, weder in vitro noch in vivo, zuschreiben konnten.^[36] Eine Studie von Martino et al.^[37] mit FN-Fragmenten, die unterschiedliche Affinität für $\alpha 5\beta 1$ haben, verdeutlichte, dass eine Blockierung dieses Rezeptors sich lediglich auf die Proliferation mit hochaffinen Substraten auswirkt (die sowohl die RGD- als auch die PHSRN-Sequenz enthalten), dagegen fördern Vollängen-FN und Proteinfragmente, die nur das RGD-Motiv enthalten, über zahlreiche unspezifische Signale von anderen Rezeptoren lediglich das Zellwachstum. Deutlich weniger Studien haben sich mit dem Subtyp $\alpha\text{v}\beta 3$ beschäftigt. So zeigten murine Zellen, die dieses Integrin überexprimieren, höhere Proliferationsraten als nichttransfizierte Zellen. Dieser Effekt wurde aufgehoben, wenn die transfizierten Zellen vorher mit einem $\alpha\text{v}\beta 3$ -blockierenden Antikörper inkubiert wurden.^[38] Von der Arbeitsgruppe um Garcia wurde jedoch kein Effekt auf die Proliferation durch Blockade von $\alpha\text{v}\beta 3$ beobachtet.^[35d]

Diese häufig widersprüchlichen Beobachtungen haben wahrscheinlich unterschiedliche Ursachen. ECM-Liganden werden häufig nur nach deren Affinität für einen Integrinsubtyp charakterisiert (z. B. $\alpha\text{v}\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$), die Bestimmung der Bindungsaffinität für die anderen Subtypen wird dagegen häufig vernachlässigt. Dadurch wird ein biologischer Effekt mit einem spezifischen Integrinsubtyp assoziiert, wobei die Rolle von anderen Integrinen in diesem Kontext möglicherweise unterschätzt wird. Des Weiteren schwankt das Integrinexpressionsmuster auf der Zelloberfläche stark und hängt von Parametern wie Zelltyp, Kultivierungsbedingungen und verwendeten Substraten ab, sodass unterschiedliche Studien meist nicht einfach vergleichbar sind. Zusätzlich sollte in Betracht gezogen werden, dass die Funktionen von Integrinsubtypen häufig überlappen, d. h. eine Funktion, die

durch die Blockade eines Subtyps unterdrückt wird, könnte durch einen anderen Subtyp übernommen werden.

Die Rolle der beiden Integrinsubtypen bei der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) ist ein wichtiges Forschungsgebiet, vor allem vor dem Hintergrund des allgemein steigenden Interesses an der Stammzellforschung und -therapie sowie der Entwicklung von entsprechenden Biomaterialien. Es entsteht eine zunehmende Nachfrage nach einer Kontrolle der Plastizität von Stammzellen, beispielsweise um diese undifferenziert in Zellkultur zu halten^[39] oder um die Differenzierung in einen speziellen Phänotyp zu erreichen.^[40] Neben den klassischen molekularen Vermittlern einer gezielten Differenzierung, wie etwa verschiedene Wachstumsfaktoren, wurde auch die Zellumgebung als vielversprechender Parameter zur gezielten Beeinflussung der Differenzierung einer Stammzelle bestätigt.^[41] In diesem Zusammenhang ist die Rolle der Integrine bei der Progression von undifferenzierten Zellen zu einer definierten Abstammungslinie noch nicht endgültig postuliert. Einige Studien konnten eine verstärkende Funktion von $\alpha 5 \beta 1$ bei der Induktion von Osteogenese ausmachen. So wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor die Expression von osteogenen Markern sowie die Aktivität von Alkalischer Phosphatase (ALP) *in vitro*^[36,37,42] erhöht und die Osseointegration^[42b,43] von Implantaten sowie eine ektotopische Knochenbildung^[42a] *in vivo* induzieren kann. Niedrigere Spiegel von $\alpha 5 \beta 1$ wurden auch mit einem verstärkten Knochenabbau in Tiermodellen in Verbindung gebracht.^[44]

Auch die Rolle von $\alpha \nu \beta 3$ ist nicht eindeutig. So gibt es Studien die behaupten, dass dieser Rezeptor eine Unterdrückung der Differenzierung von Osteoblasten vermittelt,^[38,42b] andere hingegen führen eine Verstärkung der Mineralisierung der Matrix auf die Bindung von $\alpha \nu \beta 3$ zurück.^[45] In einer kürzlich erschienenen Studie konnten Kilian und Mrksich^[46] zeigen, dass mit einem cyclischen RGD-Peptid, das eine hohe $\alpha \nu \beta 3$ -Bindungsaffinität aufweist, die Differenzierung von MSCs in die Osteoblasten-Abstammungslinie eingeleitet werden kann. Sie konnten eine verstärkte Ausprägung von verschiedenen osteogenen Markern, z.B. eine hohe ALP-Aktivität, ein hoher Spiegel von Runx2 („Runx-related“-Transkriptionsfaktor 2) und eine stärkere Zellspreizung auf einer mit cyclischen Peptiden beschichteten Oberfläche, beobachten. Dagegen induzierte ein lineares RGD-Peptid mit niedrigerer Affinität für $\alpha \nu \beta 3$ die Differenzierung in die myogene Abstammungslinie. Dennoch haben sich bisher nur wenige Studien mit dem osteogenen Potenzial von $\alpha \nu \beta 3$ befasst, da dieser Rezeptor meist in Bezug auf seine Rolle bei der Knochenbildung untersucht wird. Tatsächlich sind Osteoklasten der Zelltyp mit der höchsten *In-vivo*-Expression von $\alpha \nu \beta 3$.^[47] Dieses Integrin vermittelt die Bindung von Osteoklasten an die ECM, entsprechend konnte durch die Blockierung dieses Rezeptors die Resorption von Knochenmaterial inhibiert werden.^[47] Dieser Effekt, der durch blockierende Antikörper *in vitro*^[48] und durch $\beta 3$ -Knockout-Mäuse *in vivo*^[49] bestätigt werden konnte, wurde durch eine $\alpha \nu \beta 3$ -abhängige Migration von Osteoklasten erklärt.^[48] Bemerkenswert ist, dass die Rolle von $\alpha \nu \beta 3$ bei der Zellmigration auch in vielen weiteren Zelltypen beobachtet wurde,

beispielsweise in glatten Gefäßmuskelzellen,^[50] Endothelzellen^[51] und auch in verschiedenen Tumorzelllinien.^[9b]

Tatsächlich ist das $\alpha \nu \beta 3$ -Integrin ein kritischer Regulator sowohl der physiologischen als auch der pathologischen Angiogenese, die wiederum einen entscheidenden Schritt der Tumorprogression und Metastasierung darstellt.^[9b,10b,52] Ganz am Anfang der Tumorprogression kann in ruhenden Tumoren durch Hypoxie der „angiogenetische Wechsel“^[53] eingeleitet werden, bei dem Wachstumsfaktoren wie VEGF („vascular endothelial growth factor“) ausgeschüttet werden und dadurch die Expressionsrate von Integrinen hochreguliert wird. Durch die Wechselwirkung von $\alpha \nu \beta 3$ mit seinen natürlichen ECM-Liganden können Endothelzellen bei der Bildung von neuen Blutgefäßen mitwirken, die den Tumor mit zusätzlichem Sauerstoff und Nährstoffen versorgen können.^[54] Seit den ersten Studien, die auf den Einfluss von $\alpha \nu \beta 3$ bei der pathologischen Angiogenese hinwiesen,^[55] bestätigten viele Studien die Hochregulation dieses Rezeptors auf Tumoren und Tumorzelllinien, was deutlich auf eine proangiogenetische Rolle von $\alpha \nu \beta 3$ hinweist. Jedoch war bei Studien mit Mäusen, bei denen sämtliche $\alpha \nu$ -Integrine ausgeschaltet waren, eine starke Angiogenese erkennbar,^[56] Mäuse mit fehlenden $\beta 3$ - und $\beta 5$ -Integrinen zeigten ebenfalls pathologische Angiogenese und erhöhtes Tumorwachstum.^[57] Dies weist auf eine zwar wichtige, jedoch nicht essenzielle Rolle von $\alpha \nu \beta 3$ bei der Regulation der Angiogenese hin.^[9a,58]

Die biologische Funktion von $\alpha 5 \beta 1$ in der Angiogenese ist ebenfalls noch nicht vollständig aufgeklärt. Dessen Fähigkeit zum Cotransport mit EGFR („epidermal growth factor receptor“) ^[59] sowie seine Hochregulation bei der Angiogenese und in Blutgefäßen von Tumoren^[60] lassen eine tumorfördernde Funktion dieses Integrins vermuten. Andere Berichte deuten eher auf eine kontextabhängige Funktion mit einer verstärkenden Rolle in manchen und einer schwächenden in anderen Tumoren hin. Vor kurzem konnte die Gruppe um Hynes zeigen, dass $\alpha \nu$ und $\alpha 5$ möglicherweise bei der Reorganisation von Gefäßen zusammenarbeiten und sich auch gegenseitig ersetzen können.^[61]

3. Die Entwicklung von subtypspezifischen $\alpha \nu \beta 3$ - und $\alpha 5 \beta 1$ -Liganden

3.1. RGD-Peptide und darüber hinaus

In einer bahnbrechenden Arbeit von Pierschbacher und Ruoslahti aus dem Jahr 1984 wurde die Tetrapeptidsequenz Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) als das minimale Motiv in FN für die Bindung von Zellen beschrieben.^[18] In diesen Studien wurden synthetische Peptide mit der RGD-Sequenz dazu verwendet, die Adhäsion von Fibroblasten an mit FN beschichteten Oberflächen zu inhibieren. Bemerkenswert war dabei, dass auch mit synthetischen Liganden beschichtete Agarose-Kügelchen die Adhäsion von Fibroblasten erhöhen konnten. Weitere Untersuchungen zur spezifischen Rolle jeder Aminosäure des Tetrapeptids konnten zeigen, dass Arg, Gly und Asp essenziell für die biologische Aktivität sind, nicht jedoch Ser, das durch verschiedene Aminosäuren ohne Verlust an Bindungsaffinität ersetzt werden konnte.^[18,62]

Dieses Bindungsmotiv wurde später auch in Fibrinogen und Typ-I-Kollagen identifiziert; kurze RGD-enthaltende Peptide aus der Sequenz dieser Proteine zeigten ebenfalls eine Verstärkung der Zelladhäsion.^[18] Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Zellen gemeinsame Rezeptoren (z. B. Integrine) exprimieren, mit denen sie an die ECM über die RGD-Sequenz binden können. Weitere Studien konnten das RGD-Motiv auch in vielen anderen ECM-Proteinen identifizieren, z. B. in VN,^[63] Von-Willebrand-Faktor,^[64] Osteopontin^[65] und Laminin.^[66]

Viele Integrine erkennen ECM-Proteine über die gemeinsame RGD-Sequenz, doch die Spezifität dieser Wechselwirkung mit den verschiedenen Subtypen ist nicht trivial. Dies wurde bald an den Integrinen $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha \nu \beta 3$ erkennbar, da sie jeweils unterschiedliche, charakteristische Wechselwirkungen mit der ECM eingehen. Zum Beispiel konnten Liposomen, die $\alpha 5 \beta 1$ enthielten, an FN-beschichtete Oberflächen binden. Auf VN-beschichteten Substraten zeigte sich hingegen keine Bindung. Im anderen Fall, mit $\alpha \nu \beta 3$ -modifizierten Liposomen, wurde das gegenteilige Ergebnis erhalten.^[26b] Ein synthetisches Peptid war dagegen in der Lage, die Proteinbindung in beiden Fällen zu verhindern. Heute ist bekannt, dass die Ligandenspezifität von vielen Faktoren abhängt. Obwohl Beispiele für den Einfluss von synergistischen Domänen auf die Subtypspezifität bekannt sind (z. B. die PHSRN-Sequenz, die in FN die Bindung von RGD an $\alpha 5 \beta 1$ synergistisch unterstützt),^[28] sind die Konformation und die räumlichen Präsentation des RGD-Motivs in den ECM-Proteinen die wichtigsten Faktoren für die Vermittlung der Subtypspezifität.^[19,67]

Die Integration einer Aminosäuresequenz in ein cyclisches Peptid stellt eine plausible Methode dar, den Konformationsraum einzuschränken, die biologische Aktivität zu erhöhen und die Subtypspezifität zu beeinflussen.^[68] Frühe Untersuchungen mit einem über eine Disulfidbrücke verbrückten RGD-Cyclopeptid zeigten eine Verbesserung der Inhibition VN-vermittelter Adhäsion von Fibroblasten; dagegen konnte mit diesem Peptid im Gegensatz zum linearen Kontrollpeptid keine inhibitorische Aktivität von FN-vermittelter Adhäsion beobachtet werden.^[69] In einer weiteren Studie führte die Reduktion der Disulfidbrücken in einem aus Schlangengift isolierten, RGD-enthaltenden Peptid zum Verlust der biologischen Aktivität. Dies kann wahrscheinlich durch eine reduzierte Integrinbindungsaffinität, ausgelöst durch den Verlust der günstigen biologisch aktiven Konformation, erklärt werden.^[70]

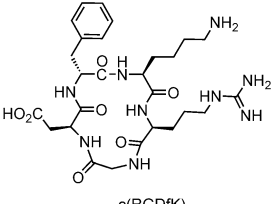
In diesem Zusammenhang war unsere Gruppe in den 1990er Jahren führend an einer Reihe von Studien zum Verständnis des Einflusses der Konformation auf die Integrin-subtypselektivität beteiligt.^[20] Untersuchungen zur Auswirkung der Substitution einer L- durch eine D-Aminosäure in einem cyclischen Peptid auf dessen Konformation und biologische Aktivität, ein Prozess der als „räumliches Screening“^[71] bezeichnet wird, führten zur Entwicklung des Pentapeptids $c(\text{RGDfV})$ (Tabelle 1). Dieses Peptid zeigte eine im Vergleich zum linearen Stammpeptid 100-fach verbesserte Inhibition der Adhäsion von A375-Zellen an VN und hohe Selektivität gegenüber dem Blutplättchenintegrin $\alpha \text{IIb} \beta 3$.^[20a] Des Weiteren konnte dieses Cyclopeptid die tumorinduzierte

Tabelle 1: Strukturen von cyclischen RGD-Peptiden mit Bindungsaffinität für den Integrinsubtyp $\alpha \nu \beta 3$ und/oder $\alpha 5 \beta 1$.

Verbindung	IC ₅₀ $\alpha \nu \beta 3$ [nM]	IC ₅₀ $\alpha 5 \beta 1$ [nM]	Lit.
 $c(\text{RGDfV})$	4.9 ^[a]	480 ^[b]	[20a, 72]
 $c(\text{RGDf(NMe)V})$ (Cilengitide)	0.58 ^[c]	13.2 ^[c]	[16a, 77]
 $c(\text{RGD-}\beta\text{-HPhe})$	63 ^[d]	> 1000 ^[d]	[87, 88]
 $c(\text{RGD-(+)-}\beta\text{-Acc-V})$	20	1500	[89]
 $c(\text{G-isoDGR-phg})$	89	406	[21a]
 $c(\text{phg-isoDGR-G})$	> 1000	19	[21a]
 $c(\text{phg-isoDGR-k})$	> 1000	8.7	[21b]

Angiogenese in einem Chorion-Allantois-Membran(CAM)-Modell im Huhn (HET-CAM) unterbrechen^[55b] und diente später als Leitstruktur für die Entwicklung von vielen weite-

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Verbindung	IC ₅₀ αvβ3 [nM]	IC ₅₀ α5β1 [nM]	Lit.
 c(RGDfK)	2.6 ^[e]	133 ^[e]	[21b, 72b]

[a] In der Originalpublikation (Lit. [20a]) wurde die Aktivität dieses Peptids durch die Inhibition der Zelladhäsion zu VN und dem Fragment P1 aus Laminin bestimmt. Die Bestimmung der αvβ3-Aktivität wurde später mit isolierten Integrinen durchgeführt. (Lit. [72b]). [b] Die α5β1-Affinität wurde in der Originalliteratur nicht beschrieben (Lit. [20a]), wurde später jedoch in Lit. [72a] berichtet. [c] In der Originalpublikation (Lit. [16a]) wurde lediglich die Aktivität für αvβ3 und αIIbβ3 bestimmt. IC₅₀-Werte für αvβ5 und α5β1 wurden später in Lit. [77] bestimmt. [d] Die Aktivität für αvβ3 wurde in Lit. [87] und für α5β1 in Lit. [88] berichtet. [e] In der Originalpublikation (Lit. [72b]) wurde die Aktivität dieses Peptids für αvβ3 als Verhältnis $Q = IC_{50}[\text{Peptid}] / IC_{50}[\text{GRGDSPK}]$ angegeben. IC₅₀-Werte für α5β1 und αvβ3 wurden kürzlich in Lit. [21b] berichtet. Eine ausführliche Studie des Aktivitäts- und Selektivitätsprofils der Peptide c(RGDfV), c(phg-isoDGR-k) und c(RGDfK) wurde kürzlich für RGD-bindende Integrine durchgeführt (T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, C. Mas-Moruno, A. E. Cavalcanti-Adam, J. Spatz, B. Geiger, H. Kessler, unveröffentlichte Ergebnisse).

ren αvβ3-selektiven Integrinliganden.^[72] c(RGDfV) wurde einer Reihe von Modifikationen unterzogen, etwa der Reduktion von Peptidbindungen,^[73] dem Einbau von Schleifenmimetika,^[74] dem Einbau von Zuckeraminoinsäuren^[75] sowie der Herstellung von Retro-inverso-Analoga.^[76] Die in diesen Studien entwickelten Liganden zeigten zwar eine hohe Selektivität zwischen αvβ3 und αIIbβ3, jedoch wurde keine Selektivität für αvβ3 gegenüber α5β1 erreicht.

Die N-Methylierung von c(RGDfV) führte zum Wirkstoffkandidaten Cilengitide c(RGDf(NMe)V) (Tabelle 1)^[16] mit einer antagonistischen Aktivität für αvβ3 im subnanomolaren Bereich (IC₅₀ = 0.58 nM) sowie für αvβ5 und α5β1 im nanomolaren Bereich (IC₅₀ = 11.7 nM bzw. 13.2 nM).^[77] Peptidische Liganden sind häufig nur wenig stabil gegen enzymatischen Abbau, durch Cyclisierung und N-Methylierung^[78] konnte jedoch ein metabolisch und enzymatisch stabiles Peptid erhalten werden. Aufgrund seiner hohen Aktivität für proangiogenetische Integrinsubtypen, aber auch wegen seiner hohen Selektivität gegenüber dem Blutplättchenintegrin αIIbβ3, wird Cilengitide als Wirkstoffkandidat untersucht. Derzeit wird eine Studie in klinischer Phase II für die Behandlung von verschiedenen Tumorarten durchgeführt.^[16b] Cilengitide erreichte Phase III für die Behandlung von Glioblastomen,^[16b, 79] konnte jedoch die Überlebensrate der Patienten, die parallel mit Cilengitide und einer konventionellen Chemoradiotherapie behandelt wurden, nicht signifikant steigern, sodass die Studie an dieser hochaggressiven Tumorart abgebrochen wurde.^[80] Vor kurzem wurde über einen „Crosstalk“ zwischen α5β1 und dem Tumorsuppressor p53 berichtet, der in Gliomzellen die Apoptose einleiten kann. Dieser biologische Effekt wurde für das Integrin αvβ3

nicht beschrieben. Die geringere Bindungsaffinität von Cilengitide für α5β1 könnte also die fehlende Wirksamkeit des Peptids bei der Behandlung von Glioblastomen erklären.^[81] Den betroffenen Patienten wurde Cilengitide einmal wöchentlich oder zweimal täglich intravenös verabreicht (2 g pro Patient). Durch die geringe Halbwertszeit im menschlichen Serum (der Wirkstoff wird nach 4 Stunden ohne metabolische Veränderung ausgeschieden) und die geringe Konzentration im Blut nach einigen Stunden können Integrine im Ruhezustand zwar aktiviert, die Ligandenbindung und die Signaltransduktion jedoch nicht wie erforderlich blockiert werden.^[82] Nach heutigem Stand wurde auch noch kein anderer αvβ3- oder α5β1-Integrin-Ligand von der FDA zugelassen.^[11b]

Daneben war die Adressierung des Subtyps α5β1 ein stark untersuchtes Forschungsgebiet. Seit über 20 Jahren befassen sich unsere und andere Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von Peptiden mit hoher Bindungsaffinität für diesen Rezeptorsubtyp. In diesem Zusammenhang sind cyclische^[72a] und auch lineare Peptide, die mithilfe der Selektionsmethode Phagen-Display identifiziert wurden,^[83] als α5β1-Liganden beschrieben worden, wenn auch ohne nennenswerte Selektivität gegenüber αvβ3. Einige Jahre später wurde ein nicht RGD enthaltendes, lineares Peptid aus der Sequenz von FN, das an die Synergiedomäne von α5β1 bindet, entdeckt. Das acetylierte Analog Ac-PHSCN-NH₂, später als ATN-161 bezeichnet, zeigte antiinvasive, Antitumor- und antimetastatische Aktivität in Zelllinien des Prostatakarzinoms.^[84] ATN-161 wird derzeit in klinischer Phase II für die Behandlung von Krebs untersucht. Neben der Affinität für α5β1 wurde auch über Affinitäten für αvβ3^[85] und für αvβ5^[11b] berichtet.

Von der Arbeitsgruppe um Sewald wurden des Weiteren mehrere cyclische RGD-Peptide, die β-Aminosäuren enthalten, synthetisiert und hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur untersucht.^[86] Auf diese Weise wurde das cyclische Tetrapeptid c(RGD-β-H-Phe) als αvβ3-aktive Verbindung (63 nM in einem Assay mit isolierten Integrinen)^[87] mit sehr geringer Affinität für α5β1 (> 1000 μM in einem Adhäsionsassay mit K562-Zellen) (Tabelle 1)^[88] gefunden. Im Rahmen dieser Studien wurden auch weitere hochaffine Liganden beschrieben, allerdings ohne signifikante Selektivität zwischen den Subtypen αvβ3 und α5β1. Später wurden von der gleichen Gruppe die Synthese, die Strukturanalyse und die biologische Evaluierung von Pentapeptiden beschrieben, welche die konformativ eingeschränkte Aminosäure *cis*-β-Aminocyclopropancarbonsäure (β-Acc) enthalten.^[89] Das cyclische Pentapeptid c(RGD-(+)-β-Acc-V) (Tabelle 1) hat eine sehr hohe Affinität für αvβ3 (20 nM in einem Adhäsionsassay mit WM115-Zellen auf FN) sowie gute Selektivität gegenüber α5β1 (1.5 μM, Faktor 75, Adhäsionsassay mit K562-Zellen auf FN). Im Jahr 2008 wurde von Pramanik et al. ein Lipopeptid entwickelt, das auf die Tetrapeptidsequenz RGDK als biologisch aktive Sequenz aufbaut. Das Konjugat konnte in vitro Gene selektiv über den α5β1-Integrin-Rezeptor adressieren.^[90]

Diese Studien verdeutlichen, dass die Entwicklung von Peptiden, die eine Selektivität zwischen αvβ3 und α5β1 aufweisen, bisher sehr begrenzt war. Vor diesem Hintergrund stellen cyclische Peptide, die auf die *isoDGR*-Sequenz auf-

bauen, einen der seltenen Fälle dar, bei dem es gelang, sowohl eine hohe Bindungsaffinität als auch eine gute Subtypselektivität zwischen diesen beiden Rezeptoren zu erreichen. Das *isoDGR*-Motiv, das durch Demidierung von Asparagin in dem fünften Wiederholungsmodul I von FN gebildet wird, wurde von der Arbeitsgruppe um Corti als unerwartetes Bindungsmotiv in diesem ECM-Protein identifiziert.^[91] Ausgehend von diesen Ergebnissen entwickelten wir ein Kopf-Schwanz-cyclisiertes Peptid mit der *isoDGR*-Sequenz, wobei wiederum die Methode des „räumlichen Screening“ angewendet wurde.^[21a] In diesen Peptiden wird die *isoDGR*-Sequenz durch ein Gly und eine aromatische Aminosäure (entscheidend für die Bindung an $\alpha\beta 3$) flankiert.^[72b] Der aromatische Rest wurde sowohl in L- als auch in D-Konfiguration eingebracht, was die Bildung von verschiedenen Peptidrückgratstrukturen zur Folge hat. Interessanterweise zeigte sich, dass die relative Position der beiden flankierenden Reste die Selektivität zwischen den Subtypen $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ festlegt. Dies wurde beispielsweise an dem Peptid *c*(phg-*isoDGR*-G) gezeigt, das für $\alpha 5\beta 1$ eine Affinität im nanomolaren Bereich hat ($IC_{50} = 19$ nM), jedoch gegenüber $\alpha\beta 3$ inaktiv ist. Im anderen Fall führte ein Vertauschen der flankierenden Aminosäuren im Peptid *c*(G-*isoDGR*-phg) zu einem exakt umgekehrten biologischen Aktivitätsprofil (Tabelle 1). Diese Daten wurden mit Dockingstudien und in Zellassays mit $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha\beta 3$ exprimierenden Fibroblasten gestützt.^[21a] Für Folgestudien mit dem $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Peptid *c*(phg-*isoDGR*-G) wurde Gly durch andere L- und D-Aminosäuren substituiert.^[21b] Aus der untersuchten Bibliothek konnte *c*(phg-*isoDGR*-w) erhalten werden, bei dem eine Steigerung der Affinität für $\alpha 5\beta 1$ ($IC_{50} = 5.5$ nM) bei gleichzeitigem Erhalt der Selektivität gegenüber $\alpha\beta 3$ beobachtet wurde. Dieses Peptid zeigte überraschenderweise auch eine Affinität für den Subtyp $\alpha\beta 6$ von $IC_{50} = 92$ nM. Die Einführung von D-Lys anstelle von D-Trp im Cyclopeptid *c*(phg-*isoDGR*-k) steigerte die Affinität für $\alpha\beta 6$ noch ($IC_{50} = 19$ nM), während gleichzeitig die Affinität für $\alpha 5\beta 1$ im niederen nanomolaren Bereich sowie die Selektivität gegenüber $\alpha\beta 3$ erhalten blieben. Dieses Peptid wurde mit einer Thiolgruppe funktionalisiert und fest auf eine nanostrukturierte Goldoberfläche aufgebracht, um das Adhäsionsverhalten von REF52-Zellen darauf zu untersuchen.^[21b]

Die vor publizierte Kristallstruktur der Kopfgruppe des Integrins $\alpha 5\beta 1$ gewährt weitere Einblicke in den unterschiedlichen Bindungsmodus von Liganden in den Bindungstaschen der α - und der $\alpha 5$ -Untereinheit.^[24] Zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Guanidingruppe von Arginin in der α -Untereinheit von $\alpha\beta 3$ nur durch „Side-on“-Wechselwirkungen mit Asp218 gebunden ist. Dagegen wird bei der Bindung der Guanidingruppe in der $\alpha 5$ -Untereinheit von $\alpha 5\beta 1$ neben der „Side-on“- auch eine „End-on“-Wechselwirkung beobachtet (mit Asp227 bzw. Gln221). Durch unterschiedliche N-Methylierungsmuster der Guanidingruppe in Integrinliganden konnte deren Selektivitätsprofil für beide Rezeptoren angepasst werden.^[92] Beispielsweise wird durch die Methylierung von N_{ω} die „End-on“-Wechselwirkung vollständig aufgehoben, wodurch die Bindung an $\alpha 5$ verhindert wird. Das führt zu einer Verbesserung der Selektivität gegenüber $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 6$.

3.2. RGD-basierte Peptidmimetika

Die Entwicklung von cyclischen RGD-Peptiden wurde vom Design und der Synthese von nichtpeptidischen Antagonisten mit dem Ziel begleitet, die Aktivität und das Selektivitätsprofil der peptidischen Liganden weiter zu verbessern.^[20c, 93] Unzweifelhaft war das Bekanntwerden der ersten Kristallstruktur des extrazellulären Segments von $\alpha\beta 3$ im Jahre 2001 ein Durchbruch für das Design von selektiven Integrinliganden.^[22a] Ein Jahr später wurde auch die Kristallstruktur des extrazellulären Segments von $\alpha\beta 3$ in Komplex mit Cilengitide gelöst.^[22b] Diese Arbeit gewährte wichtige Einblicke in den Bindungsmodus von Integrinliganden und dient seitdem als Basis für Dockingstudien, die für das Wirkstoffdesign von entscheidender Bedeutung sind. Da die $\alpha 5\beta 1$ -Kristallstruktur unbekannt war, veröffentlichten wir 2005 ein dreidimensionales Homologiemodell dieses Subtyps, das auf der experimentell bestimmten Struktur von $\alpha\beta 3$ in gebundener Rezeptorkonformation basierte.^[23] Aufgrund der Ähnlichkeit der Bindungstaschen von $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ (α : α 53 % Gemeinsamkeit; β 3: β 1 55 % Gemeinsamkeit in der Integrinkopfgruppe),^[23] diente dieses Modell, zusammen mit den vorher beschriebenen Kristallstrukturen, als Grundlage für ein rationales Design von Liganden für diese beiden Integrinsubtypen. In diesem Abschnitt werden wir nur auf peptidmimetische Integrinliganden eingehen, die zwischen diesen beiden Subtypen differenzieren können. Integrinliganden, die lediglich für ihre Bindung an einen Integrinsubtyp getestet wurden, oder biselektive Liganden, die $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ binden, werden im Rahmen dieses Aufsatzes nicht vorgestellt und sind an anderer Stelle beschrieben.^[94]

Neben einigen peptidischen Liganden mit niedrigen mikromolaren Aktivitäten für $\alpha 5\beta 1$ sowie den *isoDGR*-Peptiden war SJ749 (**M1**, Tabelle 2) der erste kleine, hochaffine und nichtpeptidische $\alpha 5\beta 1$ -Ligand. Diese Verbindung wurde durch die konformative Restriktion eines $\alpha\beta 3$ -Antagonisten erhalten und enthält ein Spiro-Oxazolin-Gerüst. Der Ligand hat eine exzellente Aktivität für $\alpha 5\beta 1$ ($IC_{50} = 0.18$ nM) und eine mindestens 200-fache Selektivität gegenüber $\alpha\beta 3$.^[95] Dockingstudien mit **M1** in der Bindungstasche von $\alpha 5\beta 1$ konnten Schlüsselwechselwirkungen aufdecken, die für die gute Bindungsaffinität an diesen Rezeptorsubtyp entscheidend sind (Abbildung 2a).^[23] **M1** zeigte eine Inhibition der Angiogenese durch ein verändertes Adhäsions- und Migrationsverhalten von Endothelzellen,^[96] eine Inhibition der Tumorzellproliferation^[97] und eine erleichterte Apoptose zusammen mit funktionellem p53 bei der Glioblastom-Zelllinie U87MG.^[98]

Die ersten rational entworfenen, selektiven Peptidmimetika wurden gleichzeitig von unserer Arbeitsgruppe^[99] und von der Jerini AG^[100] entwickelt. Das Design dieser Verbindungen basierte auf vorangegangenen Dockingstudien in die Kristallstruktur von $\alpha\beta 3$ ^[101] und dem Homologiemodell von $\alpha 5\beta 1$ im Komplex mit **M1** (Abbildung 2a).^[23] Beim Vergleich der beiden Bindungstaschen zeigten sich zwei Regionen als geeignet, um Selektivität zwischen den beiden Subtypen $\alpha\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ zu generieren: In der β -Untereinheit wurden (β 3)-Arg214 und (β 3)-Arg216 durch (β 1)-Gly217 bzw. (β 1)-Leu219 ersetzt. Die Substitution der beiden Arginine durch

Tabelle 2: Struktur von RGD-basierten Peptidmimetika mit Bindungsaffinitäten für die Integrine $\alpha\beta3$ und/oder $\alpha5\beta1$.

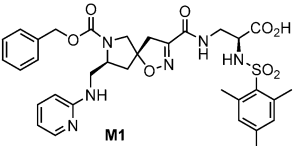
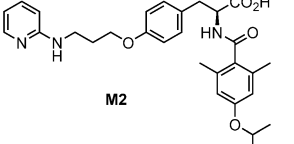
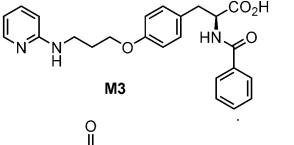
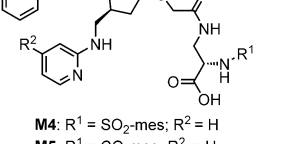
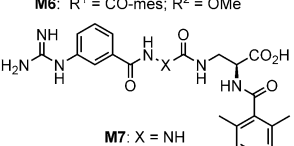
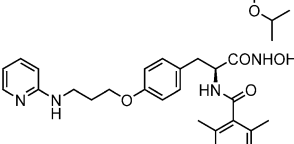
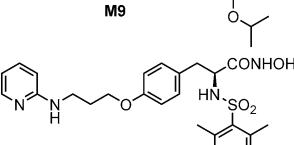
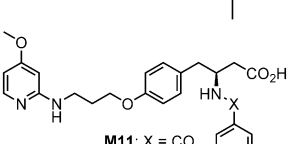
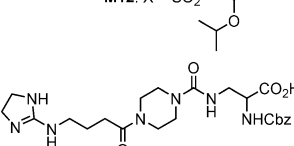
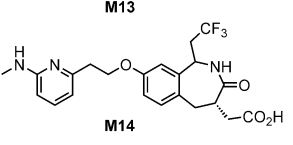
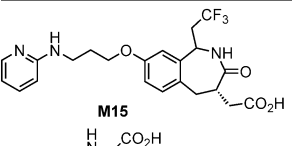
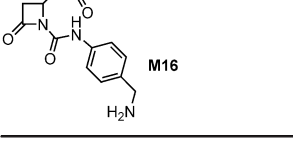
Verbindung	IC ₅₀ $\alpha\beta3$ [nM]	IC ₅₀ $\alpha5\beta1$ [nM]	Lit.
	49	0.18	[95]
	279	0.7	[99]
	1.2	264	[99]
	16 ~30 000 3400	3.7 (M4) 3.5 (M5) 0.54 (M6)	[100]
	> 4750 9600	0.96 (M7) 0.86 (M8)	[107]
	13.5	40	[109]
	4.8	132	[109]
	0.86 0.65	127 (M11) 108 (M12)	[110]
	1.1	660	[111]
	1.2 ^[a]	110 ^[a]	[112]

Tabelle 2: (Fortsetzung)

Verbindung	IC ₅₀ $\alpha\beta3$ [nM]	IC ₅₀ $\alpha5\beta1$ [nM]	Lit.
	0.9 ^[a]	1000 ^[a]	[112]
	11 ^[b]	763 ^[b]	[113]

[a] Integrinbindungsaktivitäten in Lit. [112] sind als K_i -Werte angegeben.

[b] Integrinbindungsaktivitäten in Lit. [113] sind als EC_{50} -Werte angegeben; dabei wurden Zellen verwendet, die entweder $\alpha\beta3$ (SK-MEL-24) oder $\alpha5\beta1$ (K562) überexprimieren.

Aminosäuren mit kleineren Seitenketten vergrößert den verfügbaren Raum an dieser Stelle der $\alpha5\beta1$ -Bindungstasche. Im Unterschied zum $\alpha\beta3$ -Integrin können so sterisch anspruchsvolle Substituenten in die Kernstruktur des Liganden eingeführt werden. Zweitens zeigte sich, dass die $\alpha5$ -Untereinheit durch die Mutation von (α)-Asp150 zu (α)-Ala159 weniger azide ist. Weiterhin führt der Austausch von (α)-Thr212 durch (α)-Gln221 zu einer veränderten Geometrie in der Bindungsregion; daraus ergibt sich die Möglichkeit, Subtypeselektivität durch die Modifikation des basischen Molekülteils zu erhalten.^[99] Wie bereits erwähnt, wurde vor kurzem eine Methode zur Regulation der Selektivität zwischen den beiden Subtypen beschrieben; Selektivität wird dabei durch N-Alkylierung der Guanidingruppe von Arginin im Liganden erreicht.^[24,92]

Auf Grundlage dieser Beobachtungen synthetisierten wir eine Reihe von Peptidmimetika mit einer Tyrosin-Grundstruktur, die bereits vorher erfolgreich in anderen Integrinliganden eingesetzt wurde.^[102] Der Ligand mit der höchsten $\alpha5\beta1$ -Affinität (**M2**, Tabelle 2) zeigte eine $\alpha5\beta1$ -Affinität im subnanomolaren Bereich ($IC_{50} = 0.7$ nM) und gute Selektivität gegenüber $\alpha\beta3$.^[99] In Dockingstudien wurde die ideale Passung dieses Liganden in die $\alpha5\beta1$ -Bindungstasche bestätigt (Abbildung 2b). Dagegen passt ein Ligand, bei dem die beiden Methylgruppen des aromatischen Rings entfernt wurden, ideal in die $\alpha\beta3$ -Bindungstasche; es resultierte ein hochaktiver $\alpha\beta3$ -Integrin-Ligand (**M3**, Tabelle 2; $IC_{50} = 1.2$ nM) mit hoher Selektivität gegenüber $\alpha5\beta1$.^[99]

Stragies et al. von der Jerini AG berichteten über die Entwicklung von hochaktiven Verbindungen ausgehend von einer virtuellen kombinatorischen Bibliothek.^[100] Sie gingen zunächst von einer Startverbindung (**M4**) mit Aktivität für $\alpha5\beta1$ ($IC_{50} = 3.7$ nM), jedoch geringer Selektivität gegenüber $\alpha\beta3$ ($IC_{50} = 16$ nM), aus, die erste untersuchte Variation war die hydrophobe Seitenkette an R^1 (Tabelle 2). Die Einführung eines Sulfonamids anstelle eines Amids führte zu einer bemerkenswerten Abnahme der $\alpha\beta3$ -Bindungsaffinität ($IC_{50} \approx 30\,000$ nM), die $\alpha5\beta1$ -Affinität dagegen blieb erhalten (**M5**, JSM6427). Der Umstand, dass das Integrin $\alpha5\beta1$ eine sterisch anspruchsvollere Bindungstasche aufweist, scheint seine Ka-

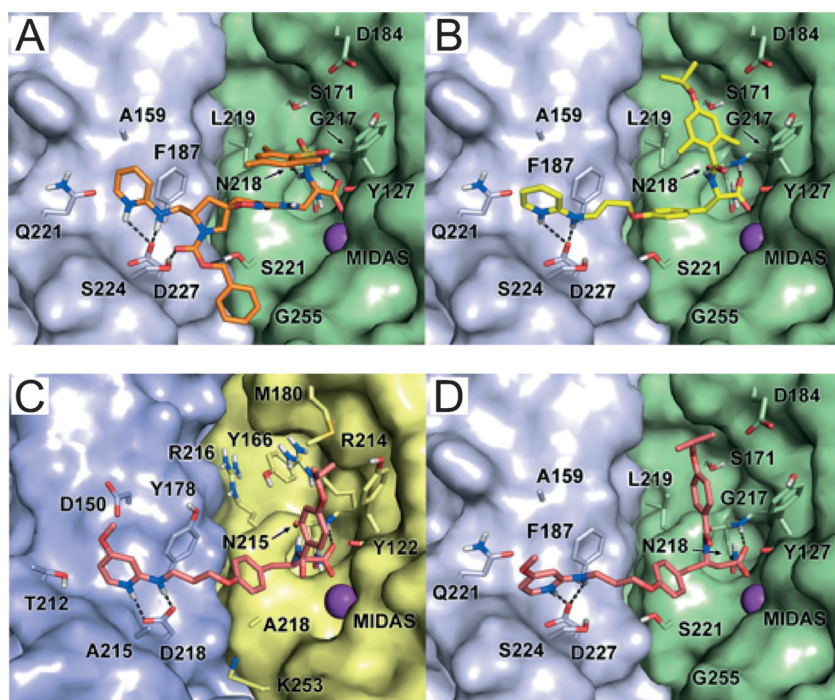


Abbildung 2. Bindungsmodi in der Integrinbindungstasche von exemplarisch ausgewählten Peptidmimetika. Docking von A) S1749 (**M1**; orangefarbenes Stabmodell) und B) **M2** (gelbes Stabmodell) in die $\alpha 5 \beta 1$ -Bindungstasche. Beide Verbindungen zeigen eine optimale Passung in den Rezeptor. Docking von **M11** (tiefrosa Stabmodell) in die $\alpha v \beta 3$ - (C) und $\alpha 5 \beta 1$ -Bindetasche (D). Die bevorzugte Passung in $\alpha v \beta 3$ führt zu einer erhöhten Selektivität für diesen Rezeptor. Die Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$ sind als hellblaue bzw. grüne Oberflächen, die α - und $\beta 3$ -Untereinheiten als blaue bzw. gelbe Oberflächen dargestellt. Die für die Ligandbindung wichtigen Aminosäureseitenketten sind im Stabmodell dargestellt. Das Metallkation im MIDAS ist als violette Kugel symbolisiert.

pazität für die Aufnahme von beiden Liganden zu erklären, dagegen kann in der sterisch stärker eingeschränkten Region in $\alpha v \beta 3$ nur eine Sulfonamid-Konformation gebunden werden, bei der die Substituenten im Vergleich zum planaren Amid um 90° um die SO_2 -N-Bindung verdreht sind.^[99,100]

M5 zeigte eine dosisabhängige Inhibierung der choroidalen Neovaskularisation in Modellsystemen in Affen und Kaninchen^[103] und wurde für die Behandlung von altersbedingter Makuladegeneration (AMD) in klinischer Phase I untersucht. Die therapeutische Verwendung von **M5** scheint mittlerweile jedoch abgebrochen worden zu sein.^[11b] Die Einführung einer 4-Methoxy-Gruppe am 2-Aminopyridin führte zu einer Verbindung mit gesteigerter $\alpha 5 \beta 1$ -Affinität bei Erhalt der guten Selektivität gegenüber $\alpha v \beta 3$ (**M6**, Tabelle 2). Die sehr hohe $\alpha 5 \beta 1$ -Bindungsaffinität dieser Verbindung wurde in einem Zelladhäsionsassay mit HEK2913-Zellen bestätigt.^[100] Weitere Studien, bei denen 2-Aminopyridin mit Fünf- und Sechsringen sowie mit Phenylalanin substituiert wurde, führte zu Verbindungen mit guter $\alpha 5 \beta 1$ -Selektivität.^[104]

Basierend auf der Beobachtung, dass Glycin in linearen RGD-Peptiden unter Erhalt der biologischen Aktivität und Selektivität durch Azaglycin ersetzt werden kann,^[105] und auch bereits erfolgreich in $\alpha v \beta 3$ -aktive Peptidmimetika eingebracht wurde,^[106] wurde dieser Ansatz auch bei der Entwicklung von $\alpha 5 \beta 1$ -Liganden verfolgt. Durch diese Substitu-

tionsstrategie konnten im Vergleich mit Verbindungen, die auf dem Tyrosin-Gerüst beruhen, Liganden mit sehr hoher Affinität für $\alpha 5 \beta 1$ ($\text{IC}_{50} < 1 \text{ nM}$) und außergewöhnlich guter Selektivität gegenüber $\alpha v \beta 3$ erhalten werden (z. B. **M7**, Tabelle 2).^[107] Die optimalen Selektivitätsprofile resultieren aus der im Vergleich mit dem flexibleren Tyrosin relativ hohen Steifheit des Diacylhydrazons. Zusätzlich wurden als basische Einheiten Arylguanidyl- und Alkylguanidylgruppen im Vergleich zum vorher verwendeten 2-Aminopyridin in die Liganden integriert.^[99] Wir konnten jedoch zeigen, dass lediglich die C-terminale Moleküleinheit für die Selektivität dieser Ligandenklasse verantwortlich ist. Die Substitution von Azaglycin (**M7**) durch Glycin in **M8** hatte wenig Auswirkung auf die biologische Aktivität und führte zu einem hochaktiven $\alpha 5 \beta 1$ -Liganden ($\text{IC}_{50} = 0.86 \text{ nM}$) mit bemerkenswerter Selektivität gegenüber $\alpha v \beta 3$ ($\text{IC}_{50} = 9600 \text{ nM}$; Tabelle 2).^[107] Bedingt durch die exzellente Integrinsubtype-selektivität und seine relativ einfache Synthese wurde dieser Ligand später in einer Vielzahl von biologischen Untersuchungen eingesetzt und für verschiedenste Zwecke funktionalisiert.^[32,81a,108] Ein Jahr später berichteten wir erstmalig über die erfolgreiche Substitution der Carbonsäure des Liganden durch eine isostere Gruppe, namentlich

durch eine Hydroxamsäure (**M9** und **M10**, Tabelle 2).^[109] Dabei wurde die Entwicklung von hochaktiven $\alpha v \beta 3$ -Verbindungen (IC_{50} -Werte bis 5 nM) mit guter Selektivität gegenüber $\alpha 5 \beta 1$ (1–2 Größenordnungen) beschrieben, und außerdem wurden tiefe Einblicke in den Bindungsmodus dieser Integrinantagonisten erhalten. Die Verbindungen **M2** und **M9** unterscheiden sich lediglich in der Art der Aminosäure, die das Metallion am MIDAS („metal-ion-dependent adhesion site“) koordiniert, haben aber entgegengesetzte Selektivität für die beiden Subtypen (Tabelle 2). Der Ligand mit der Carbonsäure ist ein hochaktiver $\alpha 5 \beta 1$ -Ligand, bei der Verbindung mit der Hydroxamsäure zeigt sich dagegen eine Änderung der Affinität hin zu $\alpha v \beta 3$ mit stark reduzierter $\alpha 5 \beta 1$ -Aktivität. Dockingmodelle konnten die Gründe für diesen Unterschied aufdecken: der vergrößerte Abstand zwischen dem sauren und basischen Molekülteil sorgt für eine verstärkte Affinität für $\alpha v \beta 3$.^[109] Dieses Prinzip wurde auch für andere Analoga mit der gleichen Gerüststruktur bewiesen. Beispielsweise zeigt **M10** (Tabelle 2) erhöhte Affinität für $\alpha v \beta 3$ und verbesserte Selektivität gegenüber $\alpha 5 \beta 1$.

Um die exakte Rolle der beiden Integrinrezeptoren $\alpha 5 \beta 1$ und $\alpha v \beta 3$ in biologischen Prozessen zu untersuchen, bestand eine hohe Nachfrage nach $\alpha v \beta 3$ -spezifischen Liganden. Das wiederum stimulierte umfassende Forschungen zur Entwicklung von neuen $\alpha v \beta 3$ -spezifischen Liganden, um die beiden Subtypen unterscheiden zu können, insbesondere weil cycli-

sche RGD-Peptide bis dato keine signifikante Selektivität gegenüber $\alpha 5\beta 1$ zeigten. Basierend auf unseren Kenntnissen über die dreidimensionale Struktur der $\alpha \nu \beta 3$ -Bindungstasche und deren pharmakophore Anforderungen durch bereits publizierte Peptidmimetika, gelang es uns, neuartige $\alpha \nu \beta 3$ -subtypspezifische Verbindungen herzustellen. Als Rückgrat dieser RGD-Liganden diente β -Homotyrosin, das vorher als essenziell für die Selektivität der Verbindung gegenüber $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha II\beta 3$ beschrieben wurde.^[99] Durch die sterischen und elektrostatischen Anforderungen der Aminosäureseitenketten in der Bindungsregion der α -Untereinheit wurde 4-Methoxypyridin als basische Einheit (Ersatz für Arginin) in das Rückgrat des Liganden integriert (**M11** und **M12**, Tabelle 2, Abbildung 2 C,D).^[110]

Vorangegangene Studien wiesen auf ein verbessertes Selektivitätsprofil gegenüber $\alpha \nu \beta 3$ durch die Einführung von aromatischen Einheiten über eine Sulfonamidgruppe anstelle eines Carboxamids hin.^[100] Dieser Effekt wurde durch die unterschiedliche relative Orientierung dieser beiden Gruppen und eine dadurch bedingte unterschiedliche Passung in die Bindungstasche des Integrins erreicht. Jedoch zeigten sowohl **M11** als auch **M12** subnanomolare Aktivitäten für $\alpha \nu \beta 3$ (**M11**, $IC_{50} = 0.86$ nM; **M12**, $IC_{50} = 0.65$ nM) und durch eine optimierte Passung in die Rezeptortasche keinen signifikanten Unterschied des Affinitätsprofils (Abbildung 2).^[110] Die Eigenschaften dieser Verbindungen und der funktionalisierten Derivate waren gut genug für einen Einsatz in zahlreichen In-vitro- und In-vivo-Anwendungen.^[32,81a,108] Des Weiteren zeigten die Liganden eine dosisabhängige antiangiogenetische Wirkung auf spontanes bFGF- („basic fibroblast growth factor“) und VEGF-induziertes Kapillarwachstum in einem Ratten-Aortaringsystem sowie Antitumoreffekte in Mäusen mit WEHI-164-Fibrosarkomen.^[108b]

Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben Liganden mit $\alpha \nu \beta 3/\alpha 5\beta 1$ -Selektivität. So beschrieb die Gruppe um DeGrado das Design und die Festphasensynthese einer Substanzbibliothek $\alpha \nu \beta 3$ -selektiver Antagonisten basierend auf einem Diaminopropionsäure-Gerüst.^[111] Die Verbindung mit der höchsten Affinität dieser Serie, **M13**, zeigte eine hohe $\alpha \nu \beta 3$ -Affinität ($IC_{50} = 1.1$ nM) und Selektivität gegenüber $\alpha 5\beta 1$ ($IC_{50} = 660$ nM; Tabelle 2). Zwei hochaktive und selektive $\alpha \nu \beta 3$ -Inhibitoren wurden auch von SmithKline beschrieben.^[112] Diese Benzodiazepin-Derivate zeichnen sich durch ein exzellentes pharmakokinetisches Profil in Ratten aus. Die biologische Evaluierung in einem Assay mit isolierten Rezeptoren ergab für **M14** bzw. **M15** eine $\alpha \nu \beta 3$ -Affinität von $IC_{50} = 1.2$ nM bzw. 0.9 nM (Tabelle 2). Ihr großes Potenzial konnte außerdem in einem Zelladhäsionsassay mit $\alpha \nu \beta 3$ -exprimierenden HEK-Zellen bestätigt werden. Für die $\alpha 5\beta 1$ -Aktivität wurden IC_{50} -Werte von 110 nM bzw. 1000 nM ermittelt. Kürzlich berichteten Galletti et al. über die Entwicklung $\alpha 5\beta 1/\alpha \nu \beta 3$ -aktiver Peptidmimetika mit β -Lactam-Gerüststruktur. Für die aktivste und selektivste Verbindung **M16** wurde $EC_{50} = 11$ nM in einem Assay mit $\alpha \nu \beta 3$ -exprimierenden SK-MEL-24-Zellen bestimmt. Mit $\alpha 5\beta 1$ -exprimierenden K562-Zellen ergab sich dagegen $EC_{50} = 763$ nM, was die Verbindung zu einem relativ selektiven $\alpha \nu \beta 3$ -Inhibitor macht.^[113]

4. Beschichtung von Oberflächen mit $\alpha \nu \beta 3$ - oder $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Liganden

4.1. Generelle Betrachtungen zur Oberflächenbeschichtung

Die Immobilisierung eines biologisch aktiven Moleküls auf der Oberfläche eines Biomaterials ist ein entscheidender Schritt und muss sorgfältig geplant werden. Bei einer nicht optimalen Oberflächenbindung und/oder ungenügender Zugänglichkeit des Liganden für das Integrin kann selbst eine Verbindung mit hoher Bindungsaffinität nicht dazu in der Lage sein, die Zelladhäsion zu unterstützen. Die folgenden Betrachtungen sollten dabei Berücksichtigung finden:

- 1) **Immobilisierungsmethode:** Integrinliganden können auf die Oberfläche von Materialien durch einfache physikalische Oberflächenadsorption aufgebracht werden.^[25b,114] Diese Methode, die auch als Physisorption bezeichnet wird, beruht auf nichtkovalenten Wechselwirkungen (z. B. elektrostatische Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrücken) zwischen Ligand und Substrat. Wenngleich diese Prozedur häufig für die Immobilisierung von Proteinen und großen Biomolekülen genutzt wird, basiert sie nur auf schwachen Wechselwirkungen und garantiert keine stabile Anbindung von kleinen Molekülen. Weiterhin findet die Adsorption der Moleküle unspezifisch statt, was zu einer Konformationsänderung des Biomoleküls führen oder die biologisch aktiven Sequenzen gänzlich blockieren könnte. Aus diesen Gründen ist eine chemische Verankerung des Moleküls am Biomaterial zu bevorzugen.^[25b,114] Eine kovalente Verknüpfung bietet eine stark erhöhte Stabilität, was für eine klinische Verwendung entscheidend ist. Außerdem können Verbindungen zur Beschichtung mit Ankergruppen funktionalisiert werden, die eine chemoselektive Bindung an die Oberfläche ohne Beeinträchtigung der pharmakophoren Eigenschaften des ursprünglichen Moleküls gewährleisten.
- 2) **Verankerungseinheit:** Die Verankerungsgruppe sollte eine starke Bindung an die Oberfläche vermitteln. Zu diesem Zweck kann auch die Oberfläche modifiziert werden (z. B. durch Silanisierung), wodurch eine Vielzahl von funktionellen Gruppen angeboten werden kann, um den Integrinliganden hoch chemoselektiv zu binden. Außerdem kann durch die Verwendung von substratspezifischen Ankergruppen die chemische Natur der Oberfläche ausgenutzt werden. Zum Beispiel binden Thiole bevorzugt an Gold, Phosphonate dagegen mit hoher Affinität an Titanoxid (und andere Metalloxide). Dieses Thema wurde in der Literatur bereits ausführlich erörtert.^[25a,115]
- 3) **Spacer:** Der chemische Spacer ein entscheidendes Element in einem funktionalisierten Liganden. Seine Hauptaufgabe ist es, einen Mindestabstand (z. B. > 3.5 nm) zwischen dem RGD-Motiv und der Oberfläche zu gewährleisten.^[116] Dieser Abstand kann durch chemische Spacer erreicht werden, die eine Zugänglichkeit des Peptids und die Wechselwirkung mit dem Integrinrezeptor ermöglichen.^[116,117] Als Spacer werden typischerweise die Bausteine Polyglycin, Amino-hexansäure und Polyethylenglykol (PEG) verwendet. Die Wahl eines geeig-

neten Spacers ist meist eine schwierige Aufgabe, da dabei nicht nur die optimale Länge, sondern auch die physikochemischen Eigenschaften des Spacers wichtig sind. Beispielsweise spielen auch die Hydrophilie/Hydrophobie des Spacers und dessen Konformation in Lösung eine Rolle. In einer kürzlich erschienenen Studie haben wir gezeigt, dass Polyprolinhelizes ebenfalls als Spacer verwendet werden können.^[118] Die Polyprolinkette bevorzugt in Lösung eine ausgestreckte Konformation, Ketten aus PEG dagegen nehmen eine Knäuel-Konformation ein. Dies macht es schwierig, den exakten Abstand zwischen Biomaterial und dem integrinbindenden Peptid abzuschätzen.

4.2. Beschichtung mit RGD-Peptiden und Proteinen

Die Entdeckung des RGD-Motivs als Zellerkennungssequenz wurde von einer Reihe an frühen Studien begleitet, in denen synthetische Peptide mit dieser Sequenz dazu verwendet wurden, die Anlagerung von Zellen auf Oberflächen zu verbessern.^[118] Seitdem wurde das RGD-Motiv in vielen Studien zur Oberflächenbeschichtung von Biomaterialien eingesetzt, um die biologische Aktivität zu verbessern und eine Möglichkeit zur gezielten Steuerung von Zellen einzuführen. Daher wurden RGD-funktionalisierte Materialien bereits für zahlreiche biomedizinische Zwecke, darunter knochen- und nervenspezifische sowie kardiovaskuläre Anwendungen, eingesetzt.^[25a,119] Zusätzlich zu den RGD-Peptiden wurden im Lauf der letzten Jahre auch viele andere Zellbindungsmotive (integrinabhängig oder nicht) beschrieben. Die Ergebnisse fügten stetig neue molekulare Hilfsmittel für die Oberflächenmodifikation hinzu, und sie steigerten das Potenzial der ursprünglich beschriebenen RGD-Peptide. An dieser Stelle sei der interessierte Leser auf Übersichtsartikel verwiesen, die den aktuellen Stand auf diesem Gebiet umfassend darlegen.^[25b,115,120]

Bei aller Vielseitigkeit von RGD-basierten synthetischen Peptiden ist ihr Gebrauch in Biomaterialien vor allem in drei Punkten begrenzt: 1) Häufig zeigen Peptide im Vergleich zu Vollängenproteinen aus der ECM ein deutlich geringeres Potenzial zur Zelladhäsion. Der Hauptgrund dafür ist das Fehlen von synergistischen oder komplementären Domänen, die im nativen Protein vorhanden sind und die zur optimalen Signalgebung in der Zelle beitragen. 2) Lineare Peptide haben einen hohen Grad an konformativer Freiheit, wodurch diese Liganden keinerlei Rezeptorsubtypselektivität zeigen. 3) Lineare Peptide und große cyclische Peptide sind anfällig für eine enzymatische Spaltung und können dadurch in vivo leicht abgebaut werden. Wegen dieser Nachteile ist die Übersetzung von vielversprechenden In-vitro-Daten in erfolgreiche Ergebnisse in vivo bisher nicht möglich gewesen.^[25b,120a] Um die Komplexität von Zell-Matrix-Wechselwirkungen zu imitieren, erscheint der Gebrauch von ECM-Proteinen als Alternative zu linearen Peptiden zunächst als der intuitivste Ansatz. Jedoch ist deren Verwendung nach wie vor umstritten, da für diese Verbindungsklasse einige Nachteile, z.B. ungewollte Entzündungsreaktionen, Infektionsrisiko, kurze biologische Halbwertszeit und schnelle Blut-

clearance, berichtet wurden.^[25b,120a] Diese Mängel sind das Thema von umfassenden Debatten, und sie drängen auf die Entwicklung neuer Strategien für die Oberflächenfunktionalisierung.^[121] Zudem konnte mit keiner der klassischen Methoden Integrinsubtypselektivität generiert werden. Im Folgenden werden drei Ansätze zur Verbesserung der Aktivität und Selektivität von ECM-basierten Verbindungen für die Oberflächenmodifikation vorgestellt.

4.2.1. Beschichtung mit cyclischen RGD-Peptiden

Die stark limitierten Eigenschaften von linearen RGD-Peptiden auf Biomaterialien konnten durch die Verwendung von cyclischen Analoga signifikant verbessert werden.^[68] Kleine cyclische Peptide sind außerdem stabiler gegen enzymatische Spaltung, insbesondere dann wenn die Peptidsequenz D-Aminosäuren und/oder N-methylierte Amidbindungen enthält. In Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung mit dem $\alpha\beta 3$ -Stammpeptid *c*(RGDfV) (Tabelle 1) wurde entdeckt, dass die Aminosäure in Position 5 (hier: Val) wenig Auswirkungen auf die Bindungsaffinität hat.^[72b] Dieses Ergebnis war für die Anwendung bei der Oberflächenfunktionalisierung von hohem Wert. Beispielsweise führt der Ersatz von Valin durch Lysin in *c*(RGDfK) zu einem Erhalt der Integrinbindungsaktivität und bietet parallel dazu eine neue funktionelle Gruppe, über die anschließend weiter funktionalisiert werden kann (Tabelle 1).^[72b] Dadurch konnten cyclische $\alpha\beta 3$ -bindende Peptide mit verschiedenen Spacer-Anker-Kombinationen zur Beschichtung von unterschiedlichsten Oberflächen hergestellt werden. Vor dem Hintergrund der Bedeutung dieses Integrins in der Knochenbiologie wurden diese Peptide häufig zur Beschichtung von Implantatmaterial eingesetzt, wobei sie zu erhöhter Osteoblastenadhäsion in vitro^[116,117a,122] und Knochenbildung in vivo führten.^[116b,123] Wie bereits erwähnt, wurde vor kurzem ein cyclisches RGD-Peptid zusammen mit einer gesteigerten osteogenen Differenzierung von MSCs in Verbindung gebracht.^[46] Jedoch können dadurch, dass in allen cyclischen Peptiden eine Restaffinität für den Subtyp $\alpha 5\beta 1$ vorhanden ist, die diskutierten Effekte nicht eindeutig nur dem Subtyp $\alpha\beta 3$ zugeschrieben werden.

4.2.2. Beschichtung mit synthetischen Proteinfragmenten

Durch rekombinante Synthese von Proteinfragmenten der ECM wurde bereits ebenfalls versucht, Integrinsubtypselektivität zu generieren, wobei sich die meisten Studien mit dem Integrin $\alpha 5\beta 1$ beschäftigten. Die Arbeitsgruppe um Garcia stellte ein rekombinantes Fragment von FN her, dessen Struktur den siebten bis zehnten Typ III der Wiederholungseinheiten dieses Proteins enthielt (FN-III₇₋₁₀). Dieses Fragment, das sowohl die RGD-Sequenz als auch das Synergismotiv PHSRN beinhaltet, führte zu einer $\alpha 5\beta 1$ -abhängigen Adhäsion von Osteoblast-artigen Zellen, zu deren Spreizung und zur Bildung von FAs auf einer funktionalisierten Oberfläche.^[35a] In einer Folgestudie zeigte dieses Fragment höhere Werte bei der Adhäsion von Osteoblasten im Vergleich mit einem linearen RGD-Peptid und dem Oligopeptid RGD-G₁₃-PHSRN. Interessant war außerdem, dass

die Zelladhäsion auf mit FN-III₇₋₁₀ beschichteten Oberflächen durch $\alpha 5\beta 1$ vermittelt wurde, die Bindung von Zellen auf Oberflächen, die mit den linearen Peptiden beschichtet wurden, jedoch $\alpha \nu \beta 3$ -abhängig war.^[35b] Der Mangel des RGD-G₁₃-PHSRN-Konstruktes an $\alpha 5\beta 1$ -Bindungsaktivität ist in der hohen Flexibilität des Polyglycin-Spacers begründet, der nicht den optimalen Abstand zwischen dem RGD- und dem PHSRN-Motiv herstellt. Dieser liegt in dem Proteinfragment vor und ist für die Bindung an das Integrin nötig.^[124] Die Immobilisierung von FN-III₇₋₁₀ auf Titanoberflächen konnte außerdem die Differenzierung von Knochenmarkszellen in Osteoblasten fördern und die Osseointegration von Implantatmaterial in vivo im Vergleich mit Oberflächen, die mit linearen RGD-Peptiden^[42b] oder Vollängen-Fibronektin^[43a] beschichtet wurden, verbessern. Kürzlich wurde dieses Fragment dazu verwendet, die Osseointegration von rostfreien Stahlschrauben in gesunden Ratten und in Ratten, die an Osteoporose erkrankt sind, zu verbessern.^[43b] Auch andere Wissenschaftler konnten eine Verstärkung der osteogenen Differenzierung von humanen MSCs auf Oberflächen, die mit einem rekombinanten Fragment, das vom neunten und zehnten der Typ-III-Wiederholungseinheiten von FN (FN-III₉₋₁₀) abgeleitet wurde, im Vergleich mit einer nur mit dem zehnten Typ-III-Wiederholungseinheit (FN-III₁₀) (die keine Synergiebindungsstelle für $\alpha 5\beta 1$ aufweist) beschichteten Oberfläche, feststellen.^[37] Erwähnenswert ist, dass der Grad der Osteoblasten-Differenzierung für jedes der beiden Fragmente exakt mit deren Selektivität für $\alpha 5\beta 1$ korreliert werden konnte. Diese Studien unterstreichen die bereits erwähnte entscheidende Rolle von $\alpha 5\beta 1$ bei der Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung bei einem gleichzeitig geringen Beitrag des Subtyps $\alpha \nu \beta 3$ an den genannten Prozessen. In diesen Studien wurden lediglich lineare RGD-Peptide als Vergleichssubstanzen verwendet, die eine niedrige $\alpha \nu \beta 3$ -Affinität zeigen. Die positiven biologischen Resultate mit den für $\alpha \nu \beta 3$ hochaktiven cyclischen RGD-Peptiden deuten aber auf eine wichtigere Rolle dieses Integrins hin. Umfassende Studien zur vollständigen Klärung des Sachverhalts stehen allerdings noch aus.

4.2.3. Beschichtung mit mehreren peptidischen Bindungsmotiven

Die gezielte Kombination von verschiedenen peptidischen Bindungsmotiven zur Erreichung einer integrinsubtypselektiven Wirkung ist ein weiterer interessanter Ansatz. Hier werden die im Vergleich zu Proteinen günstigen Eigenschaften von synthetischen Peptiden genutzt und gleichzeitig deren Aktivität und Spezifität verbessert. In diesem Zusammenhang haben wir vor kurzem eine neuartige peptidbasierte Plattform entwickelt, mit der gleichzeitig zwei verschiedene, definierte biologisch aktive Sequenzen auf der Oberfläche von Biomaterialien präsentiert werden können.^[125] In einer Grundsatzstudie gelang es, durch die Kombination eines RGD- und PHSRN-Motivs mithilfe dieser Plattform, eine homogene Ausbreitung von Osteoblasten über die gesamte Oberfläche zu erreichen. Dagegen konnte auf Oberflächen, die mit einer Mischung aus den beiden einzelnen Motiven beschichtet wurden, keine homogene Verteilung beobachtet werden. Vermutlich wurde durch

die zufällige Verteilung des RGD- und PHSRN-Motivs der ideale Abstand und die ideale Orientierung für eine Bindung an $\alpha 5\beta 1$ nicht erreicht.^[124]

4.3. Beschichtung mit RGD-basierten Peptidmimetika

Die vorigen Beispiele zeigen den umfassenden Aufwand, der bei der Beschichtung von Oberflächen mit integrinsubtypspezifischen Liganden bisher betrieben wurde. Die Mehrheit der Experimente, die in der Literatur beschrieben sind, verwendeten jedoch noch immer RGD-enthaltende Peptide und Proteine mit jeweils relativ niedriger Integrinsubtypselektivität. Das stand der Analyse der exakten Rolle des jeweiligen Subtyps beim Verhalten von Zellen im Wege und führte auch zu zahlreichen frustrierenden Ergebnissen bei der präklinischen Evaluierung. Es scheint daher überraschend, dass subtypselektive Peptidmimetika bisher nur selten zur Funktionalisierung von Oberflächen verwendet wurden; neben ihren exzellenten Bindungsaffinitäten und ihrer hohen Selektivität unterliegen nichtpeptidische Liganden auch nicht den intrinsischen pharmakokinetischen Einschränkungen von Peptiden und Proteinen.

Das wahrscheinlich erste Beispiel, bei dem ein RGD-Peptidmimetikum für die Oberflächenbeschichtung verwendet wurde, ist eine Studie von Marchand-Brynaert und Mitarbeitern gegen Ende des letzten Jahrhunderts.^[126] In diesen Untersuchungen wurde ein RGD-Peptidmimetikum mit Tyrosin-Grundgerüst (**C1**, Tabelle 3) auf eine Membran aus Polyethylenterephthalat (PET) aufgebracht. Dort unterstützte es die Adhäsion von Adenokarzinom-Endothelzellen (Caco-2) in ähnlicher Weise wie mit RGDS beschichtete PET-Oberflächen, jedoch weniger stark als auf einer FN-beschichteten Oberfläche. Leider wurde nur die $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -Aktivität dieser Verbindung ermittelt, daher blieb die Affinität gegenüber den anderen Subtypen unbekannt. Obwohl die Autoren zeigen konnten, dass diese Verbindung eine ähnliche Konformation einnimmt wie *c*(RGDfV), was auf eine potenzielle Bindungsaktivität für $\alpha \nu \beta 3$ hindeuten würde,^[126a] konnte diese Verbindung **C1** die Bindung von $\alpha \nu \beta 3$ -exprimierenden Zellen an VN nicht inhibieren.^[126b] Daher wurde eine niedrige Affinität für diesen Rezeptor vermutet, außerdem wurde die hohe Flexibilität dieser Verbindung mit einer geringen Rezeptorsubtypselektivität in Verbindung gebracht. Dennoch konnte diese Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass die Zellbindungseigenschaften von stabilen Peptidmimetika auf die Oberfläche von biologisch relevanten Materialien übertragen werden kann. Um die Affinität für $\alpha \nu \beta 3$ zu verbessern, wurde die Guanidingruppe durch die Verwendung von Iso-nipecotinsäure versteift und der α -Aminosubstituent durch eine sterisch anspruchsvollere hydrophobe Einheit ersetzt. (**C2** und **C3**, Tabelle 3). Diese Modifikationen resultierten in Affinitäten im nanomolaren Bereich, jedoch konnte keine Subtypselektivität gegenüber $\alpha \text{IIb}\beta 3$ erreicht werden.^[127] In Übereinstimmung mit der Verbesserung der $\alpha \nu \beta 3$ -Aktivität konnten diese Verbindungen effektiv die Adhäsion von Caco-2-Zellen auf PET-Oberflächen verbessern und die integrinvermittelte Bindung dieser Zellen auf VN-beschichtete Oberflächen inhibieren. Erwähnenswert ist auch, dass die

Fähigkeit zur Zelladhäsion deutlich höher war als für eine mit RGDS beschichtete Oberfläche.^[128] In Folgestudien führte ein Wechsel der relativen Position des Arg-Ersatzes und des Spacers zu hochaktiven $\alpha\text{v}\beta 3$ -Antagonisten, die als selektiv gegenüber $\alpha\text{IIb}\beta 3$ beschrieben wurden (**C4**, Tabelle 3).^[129] Das Kuppeln dieser Verbindungen auf PET-Oberflächen verbesserte die Adhäsion von humanen Endothelzellen.^[129,130]

In einem weiteren Beispiel wurde das Dipeptid Arg-Lys, in dem der C-Terminus von Arg mit der ϵ -Aminogruppe von Lysin verknüpft ist, als RGD-Mimetikum synthetisiert (**C5**, Tabelle 3).^[131] Diese Verbindung war im Vergleich zum linearen RGD-Peptid gegen enzymatischen Abbau sehr stabil. Nach der Immobilisierung auf Dextran-beschichteten Oberflächen förderte sie die Adhäsion und die Spreizung von BALB/c-3T3-Zellen in ähnlichem Maße wie Oberflächen, die mit GRGDSP modifiziert wurden. Aufgrund der Flexibilität dieses Konstrukts ist jedoch nur eine geringe Integrinbindungsaffinität und keine Rezeptorspezifität zu erwarten.

Außerdem wurden auch auf Squaramid basierende RGD-Mimetika beschrieben. Die Beschichtung von **C6** zu selbstorganisierten Monolagen auf Goldsubstraten vermittelte im Vergleich mit dem linearen Kontrollpeptid eine Verstärkung der Zelladhäsion, eine größere Zahl an fertig ausgereiften Stressfasern sowie eine größere Zahl an fokalen Adhäsionspunkten. Diese biologischen Effekte wurden der verbesserten Steifigkeit von Squaramid zugeschrieben, die zu einer Steigerung der Affinität des Liganden für $\alpha\text{v}\beta 3$ führt. Jedoch überprüften die Autoren dieser Studie die Bindungsaffinitäten ihrer Liganden nicht.^[132]

Parallel zu diesen Studien berichteten wir 2004 über den ersten hochaffinen nichtpeptidischen $\alpha\text{v}\beta 3$ -Liganden mit guter Selektivität gegenüber $\alpha\text{IIb}\beta 3$ für die Oberflächenfunktionalisierung (**C7**, Tabelle 3).^[133] Mit diesem Konstrukt konnte die Adhäsion von Osteoblasten auf Titan in ähnlicher Weise wie mit dem cyclischen Peptid $c(\text{RGDFK})$ stimuliert werden. Gleichzeitig war dies auch der erste Bericht, der die Funktionalisierung eines metallischen Implantatmaterials mit nichtpeptidischen Liganden beschrieb. In dieser Studie ist auch nochmals die Wichtigkeit der Wahl eines geeigneten Spacers hervorgehoben; bei Verwendung eines kürzeren Linkers wurde nämlich eine signifikante reduzierte Osteoblastenadhäsion auf die Oberfläche beobachtet. Zum Zeitpunkt dieser Studie war noch kein $\alpha 5\beta 1$ -selektiver Ligand bekannt, die Affinität für diesen Rezeptor wurde im Rahmen dieser Studie nicht bestimmt.

Das erste Beispiel einer Oberflächenfunktionalisierung mit nichtpeptidischen Liganden, die zwischen den Subtypen $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ unterscheiden können, wurde dann

von unserer Arbeitsgruppe rund zehn Jahre später veröffentlicht.^[108a] Dieser Erfolg war das Ergebnis umfassender Arbeiten zur Entwicklung von subtypeselektiven Peptidmimetika (siehe Abschnitt 3). In dieser Studie wurden $\alpha\text{v}\beta 3$ -(**C8**) oder $\alpha 5\beta 1$ -spezifische (**C9**) Liganden (abgeleitet von der Stammverbindung **M11** bzw. **M8**, Tabelle 2) auf nanostrukturierte Goldoberflächen aufgebracht, und ihre Fähigkeit bei der integrinabhängigen Zelladhäsion mit genetisch veränderten Fibroblasten, die entweder $\alpha\text{v}\beta 3$ oder $\alpha 5\beta 1$ exprimieren, wurde analysiert. Dabei adhärten $\alpha\text{v}\beta 3$ -exprimierende Fibroblasten ausschließlich auf Oberflächen, die mit **C8** beschichtet waren, während mit **C9** beschichtete Oberflächen nur die Adhäsion und Spreizung von $\alpha 5\beta 1$ -exprimierenden Fibroblasten unterstützten (Abbildung 3 und Abbildung 4 A). Dadurch konnte der Beweis erbracht werden, dass von derartig modifizierten Oberflächen eine hohe Integrinsubtypselektivität ausgeht. Die integrinvermittelte Zelladhäsion wurde also spezifisch durch ein Integrin ausgelöst. Dies öffnete neue Möglichkeiten, die Rolle dieser beiden Subtypen bei der Zelladhäsion und bei anderen biologischen Prozessen besser verstehen zu können (Abbildung 4)

Dieselben Verbindungen wurden in einer Folgestudie auch auf PEG-basierte Mikrostiften, die an ihrer Oberfläche mit Goldnanopunkten dotiert waren, aufgebracht, um den jeweiligen relativen Beitrag der Integrine $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ bei der Zugkraft der Zellen (Abbildung 4 B) zu ermitteln.^[32] Zugkraftmessungen nach dem Ansiedeln von Rattenembryo-Fibroblasten auf diesen Stiften zeigte, dass Zellen, die über $\alpha 5\beta 1$ an die Stiften gebunden waren, eine größere Kraft entwickeln konnten als Zellen, die über $\alpha\text{v}\beta 3$ gebunden waren. Diese Ergebnisse stimmen gut mit vorher bereits bekannten Resultaten überein.^[31] Auf Titanoberflächen, die mit denselben Liganden, jedoch mit einem Phosphonat als Ankergruppe, funktionalisiert wurden, konnte ebenfalls eine integrinvermittelte Zelladhäsion beobachtet werden.^[117b] Dazu wurde ein auf Klick-Chemie beruhender molekularer Baukasten eingeführt, mit dem eine große Zahl an Modifi-

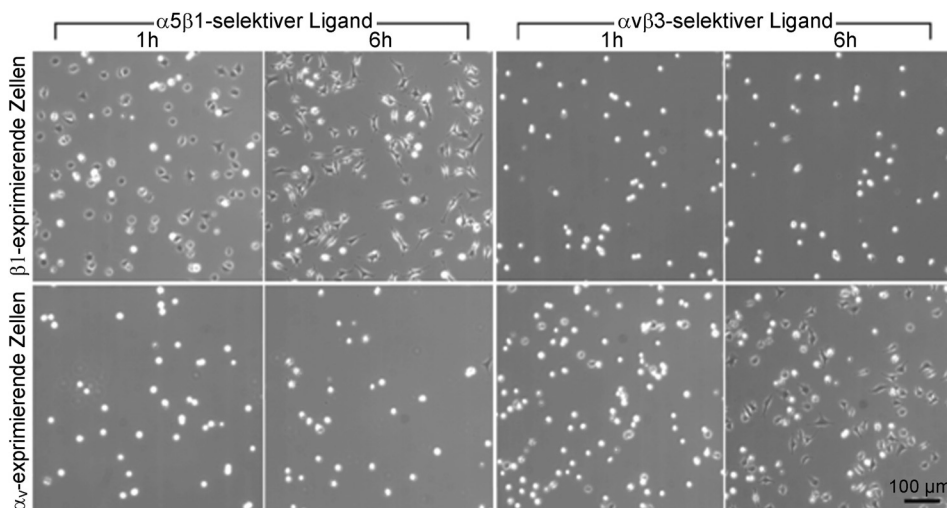


Abbildung 3. Zelladhäsionsassay: $\alpha\text{v}\beta 3$ -exprimierende Fibroblasten adhären und verteilen sich auf der Oberfläche, die mit **C8** ($\alpha\text{v}\beta 3$ -selektiv) beschichtet wurde, jedoch nicht auf einer mit **C9** ($\alpha 5\beta 1$ -selektiv) beschichteten Oberfläche. Das gegenteilige Adhäsionsverhalten kann für die $\alpha 5\beta 1$ -exprimierenden Zellen beobachtet werden. Aus Lit. [108a].

Tabelle 3: Strukturen von RGD-basierten Peptidmimetika mit einer Bindungsaffinität für $\alpha\text{v}\beta 3$ und/oder $\alpha 5\beta 1$.

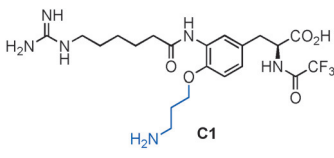
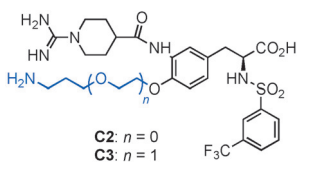
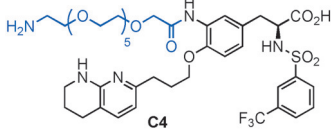
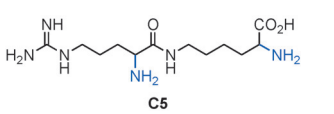
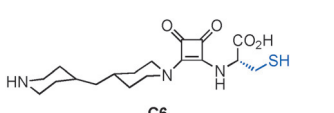
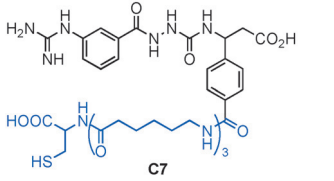
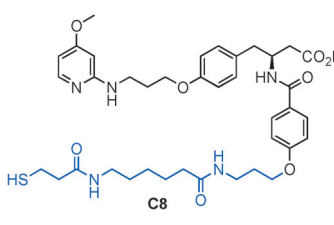
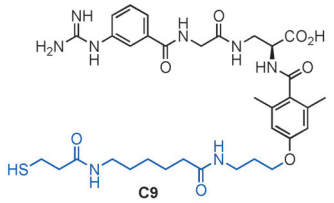
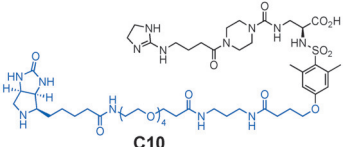
Verbindung ^[a]	IC ₅₀ [nM]	Oberfläche	Art der Beschichtung	Biologische Ergebnisse	Lit.
 C1	$\alpha\text{v}\beta 3$: n.r. $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 32 0000	Poly(ethylen-terephthalat) (PET)	i) Oxidation der Hydroxygruppen von PET zu Carbonsäuregruppen ii) Knüpfung einer Amidbindung durch Carbodiimid-Chemie	Erhöhte Werte der Oberflächenbeladung von Caco-2-Zellen \approx RGD < FN	[126]
 C2: n = 0 C3: n = 1	C2: $\alpha\text{v}\beta 3$: 63 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 11 C3: $\alpha\text{v}\beta 3$: 765 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 5	PET	i) Tosylierung der Hydroxygruppen von PET ii) Nukleophile Substitution	Erhöhte Werte der Oberflächenbeladung von Caco-2-Zellen > RGD < VN	[127, 128]
 C4	$\alpha\text{v}\beta 3$: 0.7 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 51	PET	i) Aktivierung der Hydroxy- und Carboxylgruppen von PET mit Trifluortriazin ii) Aromatische nucleophile Substitution	Verbesserte Adhäsion von humanen Endothelzellen > RGD	[129, 130]
 C5	$\alpha\text{v}\beta 3$: n.m. $\alpha\text{IIb}\beta 3$: n.m.	Dextran-beschichtetes TCPS	i) Oxidation der Hydroxygruppen von Dextran zu Aldehyden ii) Nukleophile Addition iii) Reduzierung einer Schiff-Base	Erhöhte Adhäsion und Spreizung von BALB/c-3T3 \approx RGD	[131]
 C6	$\alpha\text{v}\beta 3$: n.m. $\alpha\text{IIb}\beta 3$: n.m.	SAMs von PEGylierten Alkanthiolen auf Gold	Addition von Thiol an eine Squaramat-reaktive Moleküleinheit	Schnellere und stärkere Anlagerung von Zellen, ausgereifte Stressfasern und mehr fokale Adhäsionen. > RGD \approx c(RGDfK)	[132]
 C7	$\alpha\text{v}\beta 3$: 0.72 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 3150	Ti6Al4V	Bindung eines Thiols an ein Metalloxid	Erhöhte Adhäsion von MC3T3 Mausosteoblasten	[133]
 C8	$\alpha\text{v}\beta 3$: 1.8 $\alpha 5\beta 1$: 130	a) Gold b) Ti6Al4V / Metalloxid c) TiO ₂	a) Bindung von Thiol an Gold b) Thiol wird durch einen Phosphonatanker ersetzt c) Binding über Michael-Addition an eine Maleinimid-enthaltende Silanschicht	Verschiedene Effekte (siehe Abbildung 4)	[32, 108a, 117b, 137]
 C9	$\alpha\text{v}\beta 3$: 229 $\alpha 5\beta 1$: 1.5	Gleich mit C8	Gleich mit C8	Gleich mit C8	[32, 108a, 117b, 137]

Tabelle 3: (Fortsetzung)

Verbindung ^[a]	IC ₅₀ [nM]	Oberfläche	Art der Beschichtung	Biologische Ergebnisse	Lit.
 C10	$\alpha\text{v}\beta 3$: 0.47 ^[b]	Streptavidin-beschichtetes Polystyrol	Biotin-Streptavidin-Bindung	Erhöhte Adhäsion von M21-Melanomzellen, Aktivierung des Integrins $\alpha\text{v}\beta 3$ ≈ cRGD > VN, FN (Integrinspezifität)	[135]

[a] Der biologisch aktive Molekülteil ist in Schwarz dargestellt, die Einheit aus Spacer und Anker in Blau. [b] Die Bindungsaffinität in Lit. [135] ist als K_d -Wert angegeben. Die Bindung von $\alpha\text{v}\beta 5$ oder $\alpha 5\beta 1$ wurde nicht detektiert.

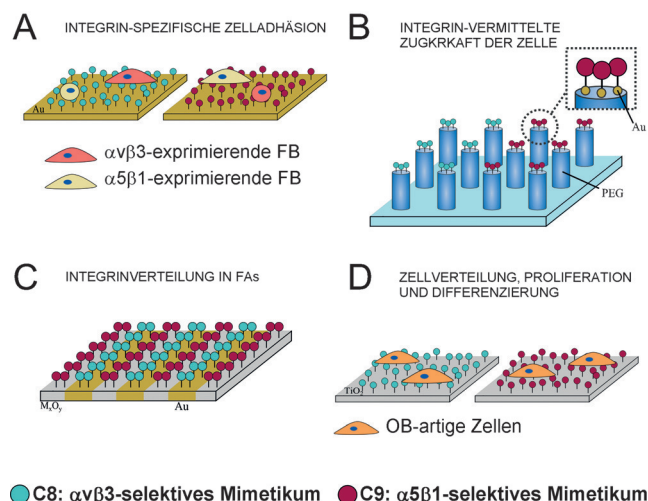


Abbildung 4. Anwendung von $\alpha\text{v}\beta 3$ -selektiven (**C8**) und $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Liganden (**C9**). Diese Peptidmimetika können für biophysikalische Studien von integrinvermittelter Zelladhäsion verwendet werden (A), für Experimente zu den Zugkräften der Zelle (B) und zur Untersuchung der Integrinverteilung (Trennung oder Colokalisation) in fokalen Adhäsionspunkten (C). Außerdem können selektive integrinbindende Peptidmimetika dazu verwendet werden, osteointegrative Eigenschaften auf die Oberfläche von Implantatmaterialien zu übertragen (D).

kationen auf vielen verschiedenen Oberflächen relativ einfach durchgeführt werden kann. Die Möglichkeit, verschiedene Anker zur Funktionalisierung abhängig von der chemischen Beschaffenheit der Oberfläche zu verwenden, wurde vor kurzem bei der Konstruktion von binären mikrostrukturierten Anordnungen mit orthogonaler Oberflächenmodifikation genutzt (Abbildung 4C).^[134] Dabei wurden Oberflächen, bei denen abwechselnd Streifen von Gold und einem Metalloxid (z. B. Fe₂O₃ oder TiO₂) nebeneinander angeordnet waren, jeweils mit $\alpha\text{v}\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -selektiven Mimetika beschichtet.^[134a] Um eine orthogonale Funktionalisierung zu gewährleisten, enthielt der funktionalisierte $\alpha\text{v}\beta 3$ -Ligand eine Thiolgruppe, wohingegen der $\alpha 5\beta 1$ -Ligand mit einem Phosphonatanker konjugiert war. Diese Strategie ermöglichte weiterhin die Inkubation und Segregation von Integrinen auf der Oberfläche: Auf den Goldstreifen wurde $\alpha\text{v}\beta 3$ gebunden, auf den Fe₂O₃/TiO₂-Streifen das Integrin $\alpha 5\beta 1$. Mithilfe dieses binären Systems kann die Integrinverteilung

während der fokalen Adhäsion untersucht werden. Interessant ist, dass Osteosarkomzellen (U2OS) auf der Goldoberfläche ($\alpha\text{v}\beta 3$ -selektiv) Cluster des Integrins $\alpha\text{v}\beta 3$ zeigten, während auf der Metalloxidoberfläche ($\alpha 5\beta 1$ -selektiv) eine Colokalisation von $\alpha\text{v}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ in den Clustern beobachtet werden konnte.^[134a] Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die $\alpha 5\beta 1$ -Aktivierung die „Inside-out“-Signalgebung die Diffusion und die Rekrutierung von $\alpha\text{v}\beta 3$ gefördert wird. Der enge Rezeptor-„Crosstalk“ dieser beiden Integrinvarianten bedarf in jedem Fall weiterer Untersuchungen.

Die Arbeitsgruppe um Kiessling verwendete kürzlich Peptidmimetika, um integrinspezifisches Verhalten von Zellen auf einer Oberfläche näher zu betrachten.^[135] In dieser Studie wurde ein $\alpha\text{v}\beta 3$ -Inhibitor^[111] biotinyliert (**C10**, Tabelle 3) und auf Streptavidin-beschichteten Oberflächen immobilisiert. Die Oberflächen hatten eine hohe Affinität für $\alpha\text{v}\beta 3$ (es war keine Bindung der Integrine $\alpha\text{v}\beta 5$ oder $\alpha 5\beta 1$ detektierbar), verstärkten die Adhäsion von M21-Melanomzellen und aktivierten die Signalgebung über $\alpha\text{v}\beta 3$. Insgesamt zeigen die Beobachtungen, dass mit integrinspezifischen Oberflächen, die mit hochaffinen und selektiven Peptidmimetika beschichtet sind, das Rätsel um die Rollen der einzelnen Integrinvarianten bei verschiedenen Prozessen der Zelladhäsion zukünftig aufgeklärt werden kann. Außerdem kann diese Strategie dazu genutzt werden, das Verhalten von Zellen auf der Oberfläche von Biomaterialien zu bestimmen. In diesem Zusammenhang beschichteten wir kürzlich über Titanoberflächen mit den Verbindungen **C8** bzw. **C9** und beobachteten das Verhalten von Osteoblast-artigen Zellen.^[137] Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass integrinbindende Peptidmimetika alle biologischen Schritte unterstützen, die für eine zuverlässige Osseointegration von Implantatmaterialien nötig sind: Die Immobilisierung dieser Moleküle auf Titan förderte die Anlagerung, Spreizung, Proliferation, ALP-Produktion und Mineralisierung von Osteoblast-ähnlichen Zellen (Abbildung 4D). Bemerkenswerterweise war die biologische Aktivität dieser Verbindungen vergleichbar mit der von Oberflächen, die mit den nativen Proteinen aus der extrazellulären Matrix beschichtet wurden. Diese Ergebnisse sind deshalb herausragend, weil sie eine vorher nicht erreichbare biologische Aktivität von niedermolekularen Verbindungen aufzeigten und bewiesen, dass die Aktivität von komplexen ECM-Proteinen durch synthetische Integrinliganden auf der Oberfläche ersetzt werden kann.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung von selektiven Integrinliganden für die Oberflächenbeschichtung war ein langer und herausfordernder Weg. Die Verwendung der Liganden zur Beschichtung entwickelte sich über die letzten dreißig Jahre stetig weiter (Abbildung 5). In frühen Studien wurden vor allem RGD-enthaltende Peptide und Proteine mit relativ niedriger bio-

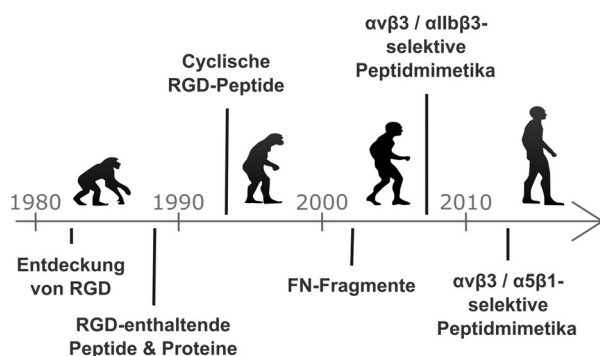


Abbildung 5. Die wichtigsten Meilensteine bei der Entwicklung von Strategien zur Beschichtung von Oberflächen seit 1980.

logischer Aktivität und Subtypselektivität für Integrinrezeptoren eingesetzt. Das biologische Profil von Liganden wurde seitdem mit verschiedenen Ansätzen, einschließlich der Verwendung von cyclischen RGD-Peptiden und Fragmenten aus FN, verbessert. Im Jahre 2004 publizierten wir erstmals eine Studie, bei der ein hochaktives $\alpha v \beta 3$ -Peptidmimetikum mit guter Selektivität gegenüber $\alpha IIb \beta 3$ auf eine Oberfläche aufgebracht wurde.^[133] Selektivität zwischen den Subtypen $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ auf einer Oberfläche wurde bis zum Jahre 2013 dagegen nicht erreicht.^[108a]

Mit der Verwendung von Peptidmimetika ist es möglich, die Mehrheit der Einschränkungen von Peptiden und Proteinen zu überwinden. Sie haben sehr potente Bindungseigenschaften (mit IC_{50} -Werten im subnano- bis nanomolaren Bereich) und eine exzellente Selektivität. Zusätzlich ist diese Molekülklasse sehr stabil gegen enzymatischen Abbau, pH-Änderungen und Temperatur. Sie lösen keine Immunreaktionen aus, können in hoher Dichte auf eine Oberfläche immobilisiert werden und sind außerdem leicht in großer Menge synthetisierbar. Es ist daher verwunderlich, dass ihr Gebrauch bisher nur selten in der Literatur beschrieben wurde. Teilweise kann das dadurch erklärt werden, dass für die präparative Herstellung Expertise in organischer Synthesechemie nötig ist. Außerdem setzt ihre Entwicklung meist ein umfassendes Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen voraus, die Generierung von Subtypselektivität ist nicht trivial. Ein letzter entscheidender Punkt ist, die Funktionalisierung des jeweiligen Liganden zur Beschichtung von Oberflächen ohne Verlust der biologischen Aktivität zu realisieren.

Dieser Aufsatz beleuchtet all diese Aspekte und nennt exemplarische Beispiele für das Design von Peptidmimetika und deren Verwendung für die Oberflächenbeschichtung.

Aus diesen Studien gewonnene Einblicke sollen dabei helfen, zukünftig neue Arten von Mimetika mit verbesserten Selektivitätsprofilen und höherer Bindungsaffinität für andere Integrine herzustellen. Die vorgestellten Untersuchungen, welche Thema dieses Aufsatzes sind, konnten zusammengefasst Folgendes zeigen:

1. Oberflächen, die mit selektiven Peptidmimetika beschichtet sind (z.B. solchen, die zwischen den Subtypen $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ unterscheiden) sind nützlich, um die Rolle der Integrine in der Zellbiologie aufzuklären. Die Möglichkeit, einen Integrinsubtyp selektiv anzusprechen, öffnet neue Perspektiven für die Untersuchung der integrinvermittelten Signalgebung. Dies betrifft beispielsweise die Differenzierung von Stammzellen, bei der die spezifische Rolle der Integrinsubtypen bislang unbekannt ist.
2. Die Fähigkeit zur Aktivierung eines Integrins kann dazu verwendet werden, zellspezifische Reaktionen gezielt zu beeinflussen und das Verhalten von Zellen auf Biomaterialien, beispielsweise zur Regenerierung von Gewebe, zu modulieren. So zeigten sich Peptidmimetika als vielversprechende Verbindungen, um die Osseointegration von Implantatmaterialien zu verbessern. Ihre Anwendung im Regenerationsprozess von anderen Organen und Geweben muss noch erforscht werden.

Weitere Studien mit dieser Molekülklasse sind aus diesem Grunde garantiert. Vor dem Hintergrund der Bedeutung von $\alpha v \beta 3$ und $\alpha 5 \beta 1$ bei der osteogenen Differenzierung von MSCs könnten integrinselektive Oberflächen dazu verwendet werden, die Differenzierung dieser Zellen in die Osteoblastenlinie zu steuern. Außerdem ist bisher noch kein Beweis für die Wirksamkeit von oberflächenbeschichteten Biomaterialien bei der Förderung des Knochenwachstums in vivo erbracht worden. Zu beiden Strategien laufen derzeit Untersuchungen in unseren Laboratorien.

Danksagung

Wir danken F. Di Leva und L. Marinelli für das Erstellen von Abbildung 2. C.M.M. und R.F. danken für die Unterstützung durch die Regierung von Katalonien (2011-BP-B-00042). C.M.M. dankt außerdem dem „People Programme (Marie Curie Actions)“ des Siebten Rahmenprogramms der Europäischen Union (FP7-PEOPLE-2012-CIG, REA grant agreement 321985).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 7048–7067
Angew. Chem. **2016**, 128, 7162–7183

- [1] R. O. Hynes, *Cell* **2002**, 110, 673–687.
- [2] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, 48, 549–550.
- [3] a) M. J. Humphries, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 311–339; b) X. C. Dong, L. Z. Mi, J. H. Zhu, W. Wang, P. Hu, B. H. Luo, T. A. Springer, *Biochemistry* **2012**, 51, 8814–8828; c) J.-P. Xiong, B. Mahalingham, J. L. Alonso, L. A. Borrelli, X. Rui, S. Anand, B. T. Hyman, T. Rysiok, D. Muller-Pompalla, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *J. Cell Biol.* **2009**, 186, 589–600.

- [4] a) S. J. Shattil, C. Kim, M. H. Ginsberg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 288–300; b) T. A. Springer, M. L. Dustin, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2012**, *24*, 107–115.
- [5] a) P. E. Hughes, F. Diaz-Gonzalez, L. Leong, C. Wu, J. A. McDonald, S. J. Shattil, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6571–6574; b) M. A. Müller, L. Brunie, A.-S. Bächer, H. Kessler, K.-E. Gottschalk, U. Reuning, *Cell. Signalling* **2014**, *26*, 2493–2503.
- [6] K. R. Legate, S. A. Wickstrom, R. Fässler, *Genes Dev.* **2009**, *23*, 397–418.
- [7] a) K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3767–3774; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3919–3927; b) K.-E. Gottschalk, H. Kessler, *Structure* **2004**, *12*, 1109–1116; c) M. A. Müller, J. Opfer, L. A. Volkhardt, L. Brunie, E.-K. Sinner, D. Boettiger, A. Bochen, H. Kessler, K.-E. Gottschalk, U. Reuning, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 2988–3006.
- [8] B. Geiger, J. P. Spatz, A. D. Bershadsky, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 21–33.
- [9] a) R. Silva, G. D'Amico, K. M. Hodivala-Dilke, L. E. Reynolds, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 1703–1713; b) C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, J. Varner, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 604–617; c) J. E. Smith-Garvin, G. A. Koretzky, M. S. Jordan, *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 591–619.
- [10] a) S. E. Winograd-Katz, R. Fässler, B. Geiger, K. R. Legate, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 273–288; b) J. S. Desgrosellier, D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 9–22.
- [11] a) D. Cox, M. Brennan, N. Moran, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 804–820; b) S. L. Goodman, M. Picard, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 405–412.
- [12] M. P. Bonaca, P. G. Steg, L. J. Feldman, J. F. Canales, J. J. Ferguson, L. Wallentin, R. M. Califf, R. A. Harrington, R. P. Giugliano, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2009**, *54*, 969–984.
- [13] G. P. A. Rice, H. P. Hartung, P. A. Calabresi, *Neurology* **2005**, *64*, 1336–1342.
- [14] S. R. Targan, B. G. Feagan, R. N. Fedorak, B. A. Lashner, R. Panaccione, D. H. Present, M. E. Spehlmann, P. J. Rutgeerts, Z. Tulassay, M. Volfova, D. C. Wolf, C. Hernandez, J. Bornstein, W. J. Sandborn, *Gastroenterology* **2007**, *132*, 1672–1683.
- [15] J. E. Frampton, G. L. Plosker, *Am. J. Clin. Dermatol.* **2009**, *10*, 51–72.
- [16] 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.
- [17] a) D. Cox, *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1587–1596; b) C. Warnke, T. Menge, H. P. Hartung, M. K. Racke, P. D. Cravens, J. L. Bennett, E. M. Frohman, B. M. Greenberg, S. S. Zamvil, R. Gold, B. Hemmer, B. C. Kieseier, O. Stüve, *Arch. Neurol.* **2010**, *67*, 923–930; c) L. Kappos, D. Bates, G. Edan, M. Eraksoy, A. Garcia-Merino, N. Grigoriadis, H. P. Hartung, E. Havrdová, J. Hillert, R. Hohlfeld, M. Kremenutzky, O. Lyon-Caen, A. Miller, C. Pozzilli, M. Ravnborg, T. Saida, C. Sindic, K. Vass, D. B. Clifford, S. Hauser, E. O. Major, P. W. O'Connor, H. L. Weiner, M. Clanet, R. Gold, H. H. Hirsch, E. W. Radü, P. S. Sørensen, J. King, *Lancet Neurol.* **2011**, *10*, 745–758; d) E. O. Major, *Annu. Rev. Med.* **2010**, *61*, 35–47.
- [18] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30–33.
- [19] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Cell* **1986**, *44*, 517–518.
- [20] a) M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50–54; b) M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911–921; c) R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374–1389; *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1440–1456; d) T. G. Kapp, F. Rechenmacher, S. Neubauer, O. V. Maltsev, C. Mas-Moruno, A. E. Cavalcanti-Adam, J. Spatz, B. Geiger, H. Kessler, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [21] a) 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; b) 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] 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.
- [23] L. Marinelli, A. Meyer, D. Heckmann, A. Lavecchia, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4204–4207.
- [24] M. Nagae, S. Re, E. Mihara, T. Nogi, Y. Sugita, J. Takagi, *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 131–140.
- [25] a) U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385–4415; b) C. Mas-Moruno, M. Espanol, E. B. Montufar, G. Mestres, C. Aparicio, F. J. Gil, M. P. Ginebra in *Biomaterials Surface Science* (Hrsg.: A. Taubert, J. F. Mano, J. C. Rodríguez-Cabello), Wiley-VCH, Weinheim, **2013**, S. 337–374.
- [26] a) R. Pytela, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Cell* **1985**, *40*, 191–198; b) R. Pytela, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5766–5770.
- [27] a) J. D. Humphries, A. Byron, M. J. Humphries, *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3901–3903; b) E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788; c) S. Gronthos, P. J. Simmons, S. E. Graves, P. G. Robey, *Bone* **2001**, *28*, 174–181.
- [28] S. Aota, M. Nomizu, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24756–24761.
- [29] a) E. Zamir, M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K. M. Yamada, B. Z. Katz, S. Lin, D. C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, B. Geiger, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 191–196; b) R. Zaidel-Bar, C. Ballestrem, Z. Kam, B. Geiger, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4605–4613.
- [30] M. R. Morgan, A. Byron, M. J. Humphries, M. D. Bass, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 731–738.
- [31] P. Roca-Cusachs, N. C. Gauthier, A. Del Rio, M. P. Sheetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 16245–16250.
- [32] S. Rahmouni, A. Lindner, F. Rechenmacher, S. Neubauer, T. R. A. Sobahi, H. Kessler, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 5869–5874.
- [33] O. Rossier, V. Octeau, J. B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albiges-Rizo, R. Tampe, L. Cognet, D. Choquet, B. Lounis, G. Giannone, *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 1057–1067.
- [34] H. B. Schiller, M. R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C. C. Friedel, Z. Q. Sun, A. Raducanu, K. E. Gottschalk, M. Thery, M. Mann, R. Fässler, *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 625–636.
- [35] a) S. M. Cutler, A. J. Garcia, *Biomaterials* **2003**, *24*, 1759–1770; b) T. A. Petrie, J. R. Capadona, C. D. Reyes, A. J. Garcia, *Biomaterials* **2006**, *27*, 5459–5470; c) E. A. Cowles, L. L. Brailey, G. A. Gronowicz, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 725–737; d) B. Keselowsky, L. Wang, Z. Schwartz, A. J. Garcia, B. D. Boyan, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2007**, *80*, 700–710.
- [36] O. Fromigüé, J. Brun, C. Marty, S. Da Nascimento, P. Sonnet, P. J. Marie, *J. Cell. Biochem.* **2012**, *113*, 3029–3038.
- [37] M. M. Martino, M. Mochizuki, D. A. Rothenfluh, S. A. Rempel, J. A. Hubbell, T. H. Barker, *Biomaterials* **2009**, *30*, 1089–1097.
- [38] S. L. Cheng, C. F. Lai, S. D. Blystone, L. V. Avioli, *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 277–288.

- [39] R. J. McMurray, N. Gadegaard, P. M. Tsimbouri, K. V. Burgess, L. E. McNamara, R. Tare, K. Murawski, E. Kingham, R. O. C. Oreffo, M. J. Dalby, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 637–644.
- [40] J. E. Frith, R. J. Mills, J. E. Hudson, J. J. Cooper-White, *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 2442–2456.
- [41] a) F. Guilak, D. M. Cohen, B. T. Estes, J. M. Gimble, W. Liedtke, C. S. Chen, *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 17–26; b) W. P. Daley, S. B. Peters, M. Larsen, *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 255–264; c) S. Cosson, E. A. Otte, H. Hezaveh, J. J. Cooper-White, *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 156–164.
- [42] a) Z. Hamidouche, O. Fromiguet, J. Ringe, T. Häupl, P. Vaudin, J.-C. Pagès, S. Srouji, E. Livne, P. J. Marie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18587–18591; b) T. A. Petrie, J. E. Raynor, C. D. Reyes, K. L. Burns, D. M. Collard, A. J. Garcia, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2849–2857.
- [43] a) T. A. Petrie, C. D. Reyes, K. L. Burns, A. J. Garcia, *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 2602–2612; b) R. Agarwal, C. Gonzalez-Garcia, B. Torstrick, R. E. Guldberg, M. Salmeron-Sanchez, A. J. Garcia, *Biomaterials* **2015**, *63*, 137–145.
- [44] C. Dufour, X. Holy, P. J. Marie, *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 394–403.
- [45] a) G. B. Schneider, R. Zaharias, C. Stanford, *J. Dent. Res.* **2001**, *80*, 1540–1544; b) C. F. Lai, S. L. Cheng, *J. Bone Miner. Res.* **2005**, *20*, 330–340.
- [46] K. A. Kilian, M. Mrksich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4891–4895; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4975–4979.
- [47] L. T. Duong, G. A. Rodan, *Front. Biosci.* **1998**, *3*, 757–768.
- [48] C. P. Carron, D. M. Meyer, V. W. Engleman, J. G. Rico, P. G. Ruminski, R. L. Ornberg, W. F. Westlin, G. A. Nickols, *J. Endocrinol.* **2000**, *165*, 587–598.
- [49] K. P. McHugh, K. Hodivala-Dilke, M. H. Zheng, N. Namba, L. Jonathan, D. Novack, X. Feng, F. P. Ross, R. O. Hynes, S. L. Teitelbaum, *J. Clin. Invest.* **2000**, *105*, 433–440.
- [50] S. Stefansson, D. A. Lawrence, *Nature* **1996**, *383*, 441–443.
- [51] D. I. Leavesley, M. A. Schwartz, M. Rosenfeld, D. A. Cheresch, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 163–170.
- [52] S. D. Robinson, K. M. Hodivala-Dilke, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2011**, *23*, 630–637.
- [53] G. Bergers, L. E. Benjamin, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 401–410.
- [54] S. M. Weis, D. A. Cheresch, *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1359–1370.
- [55] a) P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresch, *Science* **1994**, *264*, 569–571; b) P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. H. Hu, G. Klier, D. A. Cheresch, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.
- [56] B. L. Bader, H. Rayburn, D. Crowley, R. O. Hynes, *Cell* **1998**, *95*, 507–519.
- [57] L. E. Reynolds, L. Wyder, J. C. Lively, D. Taverna, S. D. Robinson, X. Z. Huang, D. Sheppard, R. O. Hynes, K. M. Hodivala-Dilke, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 27–34.
- [58] A. R. Ramjaun, K. Hodivala-Dilke, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 521–530.
- [59] P. T. Caswell, M. Chan, A. J. Lindsay, M. W. McCaffrey, D. Boettiger, J. C. Norman, *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 143–155.
- [60] a) S. Kim, K. Bell, S. A. Mousa, J. A. Varner, *Am. J. Pathol.* **2000**, *156*, 1345–1362; b) P. Parsons-Wingerter, I. M. Kasman, S. Norberg, A. Magnussen, S. Zanivan, A. Rissone, P. Baluk, C. J. Favre, U. Jeffry, R. Murray, D. M. McDonald, *Am. J. Pathol.* **2005**, *167*, 193–211.
- [61] A. van der Flier, K. Badu-Nkansah, C. A. Whittaker, D. Crowley, R. T. Bronson, A. Lacy-Hulbert, R. O. Hynes, *Development* **2010**, *137*, 2439–2449.
- [62] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 5985–5988.
- [63] S. Suzuki, A. Oldberg, E. G. Hayman, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *EMBO J.* **1985**, *4*, 2519–2524.
- [64] E. F. Plow, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. A. Marguerie, M. H. Ginsberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 8057–8061.
- [65] A. Oldberg, A. Franzen, D. Heinegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 8819–8823.
- [66] D. S. Grant, K. I. Tashiro, B. Segui-Real, Y. Yamada, G. R. Martin, H. K. Kleinman, *Cell* **1989**, *58*, 933–943.
- [67] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491–497.
- [68] a) H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512–523; *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509–520; b) V. J. Hruby, *Life Sci.* **1982**, *31*, 189–199.
- [69] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17924–17928.
- [70] J. J. Calvete, W. Schafer, T. Soszka, W. Lu, J. J. Cook, B. A. Jameson, S. Niewiarowski, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5225–5229.
- [71] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [72] a) M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233–20238; b) R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [73] A. Geyer, G. Müller, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7735–7743.
- [74] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881–7891.
- [75] E. Lohof, E. Planker, C. Mang, F. Burkhart, M. A. Dechantsreiter, R. Haubner, H. J. Wester, M. Schwaiger, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2761–2764; *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2868–2871.
- [76] J. Wermuth, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328–1335.
- [77] C. Mas-Moruno, J. G. Beck, L. Doedens, A. O. Frank, L. Marinelli, S. Cosconati, E. Novellino, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9496–9500; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 9668–9672.
- [78] J. Chatterjee, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 254–269; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 268–283.
- [79] R. Stupp, M. E. Hegi, T. Gorlia, S. C. Erridge, J. Perry, Y. K. Hong, K. D. Aldape, B. Lhermitte, T. Pietsch, D. Grujicic, J. P. Steinbach, W. Wick, R. Tarnawski, D. H. Nam, P. Hau, A. Weyerbrock, M. J. Taphoorn, C. C. Shen, N. Rao, L. Thurzo, U. Herrlinger, T. Gupta, R. D. Kortmann, K. Adamska, C. McBain, A. A. Brandes, J. C. Tonn, O. Schnell, T. Wiegand, C. Y. Kim, L. B. Nabors, D. A. Reardon, M. J. van den Bent, C. Hicking, A. Markivsky, M. Picard, M. Weller, *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1100–1108.
- [80] a) L. B. Nabors, K. L. Fink, T. Mikkelsen, D. Grujicic, R. Tarnawski, D. H. Nam, M. Mazurkiewicz, M. Salacz, L. Ashby, V. Zagonel, R. Depenni, J. R. Perry, C. Hicking, M. Picard, M. E. Hegi, B. Lhermitte, D. A. Reardon, *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 708–717; b) W. P. Mason, *Neuro-Oncology* **2015**, *17*, 634–635.
- [81] a) A. M. Ray, F. Schaffner, H. Janouskova, F. Noulet, D. Rognan, I. Lelong-Rebel, L. Choulier, A. F. Blandin, M. Lehmann, S. Martin, T. Kapp, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, M. Dontenwill, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2014**, *1840*, 2978–2987; b) G. Renner, H. Janouskova, F. Noulet, E. Guerin, S. Bär, J. Nuesch, F. Rechenmacher, S. Neubauer, H. Kessler, L. Choulier, N. Etienne-Selloum, M. Lehmann, I. Lelong-Rebel, S. Martin, M. Dontenwill, *Cell Death Differ.* **2015**, DOI: doi:10.1038/cdd.2015.131.
- [82] A. R. Reynolds, I. R. Hart, A. R. Watson, J. C. Welti, R. G. Silva, S. D. Robinson, G. Da Violante, M. Gourlaouen, M. Salih, M. C. Jones, D. T. Jones, G. Saunders, V. Kostourou, F. Perron-Sierra, J. C. Norman, G. C. Tucker, K. M. Hodivala-Dilke, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 392–400.

- [83] E. Koivunen, D. A. Gay, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 20205–20210.
- [84] D. L. Livant, R. K. Brabec, K. J. Pienta, D. L. Allen, K. Kurachi, S. Markwart, A. Upadhyaya, *Cancer Res.* **2000**, 60, 309–320.
- [85] P. Khalili, A. Arakelian, G. Chen, M. L. Plunkett, I. Beck, G. C. Parry, F. Doñate, D. E. Shaw, A. P. Mazar, S. A. Rabbani, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5, 2271–2280.
- [86] A. Müller, F. Schumann, M. Koksche, N. Sewald, *Lett. Pept. Sci.* **1997**, 4, 275–281.
- [87] F. Schumann, A. Müller, M. Koksche, G. Müller, N. Sewald, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12009–12010.
- [88] D. Zimmermann, E. W. Guthohrlein, M. Malesevic, K. Sewald, L. Wobbe, C. Heggemann, N. Sewald, *ChemBioChem* **2005**, 6, 272–276.
- [89] S. Urman, K. Gaus, Y. Yang, U. Strijowski, N. Sewald, S. De Pol, O. Reiser, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 3976–3978; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 4050–4053.
- [90] D. Pramanik, B. K. Majeti, G. Mondal, P. P. Karmali, R. Sistla, O. G. Ramprasad, G. Srinivas, G. Pande, A. Chaudhuri, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7298–7302.
- [91] a) F. Curnis, R. Longhi, L. Crippa, A. Cattaneo, E. Donossola, A. Bachi, A. Corti, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 36466–36476; b) S. Takahashi, M. Leiss, M. Moser, T. Ohashi, T. Kitao, D. Heckmann, A. Pfeifer, H. Kessler, J. Takagi, H. P. Erickson, R. Fässler, *J. Cell Biol.* **2007**, 178, 167–178.
- [92] T. Kapp, M. Fottner, O. V. Maltsev, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1540–1543; *Angew. Chem.* **2016**, 128, 1550–1563.
- [93] R. M. Keenan, W. H. Miller, C. Kwon, F. E. Ali, J. F. Callahan, R. R. Calvo, S. M. Hwang, K. D. Kopple, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, A. S. Wong, C. K. Yuan, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2289–2292.
- [94] a) M. Paolillo, M. A. Russo, M. Serra, L. Colombo, S. Schinelli, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2009**, 9, 1439–1446; b) A. Perdihi, M. S. Dolenc, *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 2371–2392; c) T. G. Kapp, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, H. Kessler, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, 23, 1273–1295; d) U. K. Marelli, F. Rechenmacher, T. R. A. Sobahi, C. Mas-Moruno, H. Kessler, *Front. Oncol.* **2013**, 3, 222; e) H. M. Sheldrake, L. H. Patterson, *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 6301–6315.
- [95] J. M. Smallheer, C. A. Weigelt, F. J. Woerner, J. S. Wells, W. F. Daneker, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 383–387.
- [96] S. A. Mousa, S. Mohamed, J. M. Smallheer, P. K. Jadhav, J. A. Varner, *Blood* **1999**, 94, 620A–620A.
- [97] A. Maglott, P. Bartik, S. Cosgun, P. Klotz, P. Ronde, G. Fuhrmann, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, *Cancer Res.* **2006**, 66, 6002–6007.
- [98] E. Martinkova, A. Maglott, D. Y. Leger, D. Bonnet, M. Stiborova, K. Takeda, S. Martin, M. Dontenwill, *Int. J. Cancer* **2010**, 127, 1240–1248.
- [99] 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.
- [100] R. Stragies, F. Osterkamp, G. Zischinsky, D. Vossmeier, H. Kalkhof, U. Reimer, G. Zahn, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3786–3794.
- [101] L. Marinelli, A. Lavecchia, K.-E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4393–4404.
- [102] G. P. Curley, H. Blum, M. J. Humphries, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 56, 427–441.
- [103] a) G. Zahn, D. Vossmeier, R. Stragies, M. Wills, C. G. Wong, K. U. Löffler, A. P. Adamis, J. Knolle, *Arch. Ophthalmol.* **2009**, 127, 1329–1335; b) G. Zahn, K. Volk, G. P. Lewis, D. Vossmeier, D. Stragies, J. S. Heier, P. E. Daniel, Jr., A. P. Adamis, E. A. Chapin, S. K. Fisher, F. G. Holz, K. U. Löffler, J. Knolle, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2010**, 51, 1028–1035.
- [104] a) G. Zischinsky, F. Osterkamp, D. Vossmeier, G. Zahn, D. Scharn, A. Zwintscher, R. Stragies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 65–68; b) G. Zischinsky, F. Osterkamp, D. Vossmeier, G. Zahn, D. Scharn, A. Zwintscher, R. Stragies, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 380–382.
- [105] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, H. Kessler, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7388–7394.
- [106] a) C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 165–169; *Angew. Chem.* **2001**, 113, 169–173; b) G. A. G. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1938–1950.
- [107] D. Heckmann, A. Meyer, B. Laufer, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *ChemBioChem* **2008**, 9, 1397–1407.
- [108] a) F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. Polleux, C. Mas-Moruno, M. De Simone, E. A. Cavalcanti-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.
- [109] D. Heckmann, B. Laufer, L. Marinelli, V. Limongelli, E. Novellino, G. Zahn, R. Stragies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4436–4440; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4501–4506.
- [110] S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Brimioulle, 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.
- [111] J. W. Corbett, N. R. Graciani, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 1371–1376.
- [112] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heering, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venskavsky, C. C.-K. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S.-M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 22–26.
- [113] P. Galletti, R. Soldati, M. Pori, M. Durso, A. Tolomelli, L. Gentilucci, S. D. Dattoli, M. Baiula, S. Spampinato, D. Giacomini, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 284–293.
- [114] Y. Hirano, D. J. Mooney, *Adv. Mater.* **2004**, 16, 17–25.
- [115] a) S. Bauer, P. Schmuki, K. von der Mark, J. Park, *Prog. Mater. Sci.* **2013**, 58, 261–326; b) A. E. Rodda, L. Meagher, D. R. Nisbet, J. S. Forsythe, *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39, 1312–1347.
- [116] a) M. Kantelehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 560–562; *Angew. Chem.* **1999**, 111, 587–590; b) M. Kantelehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, 1, 107–114.
- [117] a) C. Mas-Moruno, P. M. Dorfner, F. Manzenrieder, S. Neubauer, U. Reuning, R. Burgkart, H. Kessler, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, 101, 87–97; b) F. Rechenmacher, S. Neubauer, C. Mas-Moruno, P. M. Dorfner, J. Polleux, J. Guasch, B. Conings, H. G. Boyen, A. Bochen, T. R. Sobahi, R. Burgkart, J. P. Spatz, R. Fässler, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 9218–9223; c) J. Auernheimer, C. Dahmen, U. Hersel, A. Bausch, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16107–16110.
- [118] D. Pallarola, A. Bochen, H. Boehm, F. Rechenmacher, T. R. Sobahi, J. P. Spatz, H. Kessler, *Adv. Funct. Mater.* **2014**, 24, 943–956.
- [119] H. Shin, S. Jo, A. G. Mikos, *Biomaterials* **2003**, 24, 4353–4364.

- [120] a) A. Shekaran, A. J. Garcia, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, 96, 261–272; b) K. G. Sreejalekshmi, P. D. Nair, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, 96, 477–491.
- [121] D. F. Williams, *Biomaterials* **2011**, 32, 4195–4197.
- [122] a) J. Auernheimer, D. Zukowski, C. Dahmen, M. Kantelehner, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2005**, 6, 2034–2040; b) U. Magdolen, J. Auernheimer, C. Dahmen, J. Schauwecker, H. Gollwitzer, J. Tübel, R. Gradinger, H. Kessler, M. Schmitt, P. Diehl, *Int. J. Mol. Med.* **2006**, 17, 1017–1021.
- [123] a) B. Elmengaard, J. E. Bechtold, K. Soballe, *Biomaterials* **2005**, 26, 3521–3526; b) B. Elmengaard, J. E. Bechtold, K. Søballe, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2005**, 75, 249–255; c) H. C. Kroese-Deutman, J. Van den Dolder, P. H. M. Spauwen, J. A. Jansen, *Tissue Eng.* **2005**, 11, 1867–1875; d) S. Rammelt, T. Illert, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Zipp, W. Schneiders, *Biomaterials* **2006**, 27, 5561–5571.
- [124] a) D. J. Leahy, I. Aukhil, H. P. Erickson, *Cell* **1996**, 84, 155–164; b) S. Johansson, G. Svineng, K. Wennerberg, A. Armulik, L. Lohikangas, *Front. Sci. Ser.* **1997**, 2, d126–146.
- [125] C. Mas-Moruno, R. Fraioli, F. Albericio, J. M. Manero, F. J. Gil, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 6525–6536.
- [126] a) T. Boxus, R. Touillaux, G. Dive, J. Marchand-Brynaert, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1577–1595; b) J. Marchand-Brynaert, E. Detrait, O. Noiset, T. Boxus, Y.-J. Schneider, C. Remacle, *Biomaterials* **1999**, 20, 1773–1782.
- [127] S. Biltresse, M. Attolini, G. Dive, A. Cordi, G. C. Tucker, J. Marchand-Brynaert, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5379–5393.
- [128] S. Biltresse, M. Attolini, J. Marchand-Brynaert, *Biomaterials* **2005**, 26, 4576–4587.
- [129] V. Rerat, G. Dive, A. A. Cordi, G. C. Tucker, R. Bareille, J. Amedee, L. Bordenave, J. Marchand-Brynaert, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7029–7043.
- [130] M. Rémy, R. Bareille, V. Rerat, C. Bourget, J. Marchand-Brynaert, L. Bordenave, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, 24, 269–286.
- [131] G. Ehteshami, D. C. Brune, J. C. Lopez, S. P. Massia, *Acta Biomater.* **2005**, 1, 85–91.
- [132] S. K. Narasimhan, P. Sejwal, S. Zhu, Y.-Y. Luk, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 2210–2216.
- [133] C. Dahmen, J. Auernheimer, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6649–6652; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6818–6821.
- [134] a) J. Guasch, B. Conings, S. Neubauer, F. Rechenmacher, K. Ende, C. G. Rolli, C. Kappel, V. Schaufler, A. Micoulet, H. Kessler, H.-G. Boyen, E. A. Cavalcanti-Adam, J. P. Spatz, *Adv. Mater.* **2015**, 27, 3737–3747; b) J. Guasch, J. Diemer, H. Riahinzezhad, S. Neubauer, H. Kessler, J. P. Spatz, *Chem. Mater.* **2016**, 28, 1806–1815.
- [135] J. R. Klim, A. J. Fowler, A. H. Courtney, P. J. Wrighton, R. T. C. Sheridan, M. L. Wong, L. L. Kiessling, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 518–525.
- [136] a) V. Schaufler, H. Czichos-Medda, V. Hirschfeld-Warnecken, S. Neubauer, F. Rechenmacher, R. Medda, H. Kessler, B. Geiger, J. P. Spatz, E. A. Cavalcanti-Adam, *Cell Adh. Migr.* DOI: 10.1080/19336918.2016.1163453; b) D. Missirlis, T. Harszti, C. v. C. Scheele, T. Wiegand, C. Diaz, S. Neubauer, F. Rechenmacher, H. Kessler, J. P. Spatz, *Nat. Sci. Rep.* **2016**, 6, 23258–23258.
- [137] R. Fraioli, F. Rechenmacher, S. Neubauer, J. M. Manero, J. Gil, H. Kessler, C. Mas-Moruno, *Colloids Surf. B* **2015**, 128, 191–200.

Eingegangen am 19. Oktober 2015