

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Monomere und multimere RGD-Peptide für die integrinvermittelte
Zelladhäsion auf Biomaterialien und zur Tumordiagnose**

Ulrich Hersel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. J. Glaser

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler
2. apl. Prof. Dr. L. Moroder

Die Dissertation wurde am 28. 04. 2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05. 06. 2003 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1999 bis April 2003 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Meinem Betreuer Prof. Dr. H. Kessler danke ich für die interessante Aufgabenstellung sowie für das große mir entgegengebrachte Vertrauen. Über die Bereitstellung optimaler materieller Arbeitsbedingungen hinaus ist es vor allem die große wissenschaftliche Freiheit, die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft und das große Interesse an den bearbeiteten Themen, die für das exzellente Arbeitsklima verantwortlich sind und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Jürgen Boer, Doris Kaufmann, Elsa Locardi, Armin Modlinger, Benjamin (Benni) Rossbach und Matthias Stoeckle für das ausgezeichnete Laborklima und ihre stete Hilfsbereitschaft,
- den Kollegen Claudia Dahmen, Martin Kantlehner, Jörg Auernheimer und Doris Kaufmann für die sehr gute Zusammenarbeit im Bereich Biomaterialien und die kurzweiligen Fahrten zu diversen Biomaterial-Tagungen,
- Dr. Brigitte Jeschke, Dr. Anja Enderle und Patrizia Schaffner von Biomet Merck BioMaterials (Merck Biomaterial) für die erfolgreiche Zusammenarbeit, die Beschichtung zahlreicher Oberflächen und die Durchführung zahlreicher Zelladhäsionsversuche,
- Georgette Thumshirn sowie Dr. Frank Wester, Dr. Roland Haubner und Thorsten Poethko (Nuklearmedizin, Klinikum Rechts der Isar) für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die stete Diskussionsbereitschaft auf dem Gebiet der radiomarkierbaren RGD-Peptide,
- Dr. Simon Goodman und Dr. Matthias Wiesner von Merck KGaA für die Bestimmung vieler IC_{50} -Werte in Rezeptor- und Zelladhäsionsassays.
- Michael Hacker, Dr. Jörg Tessmar, Dr. Esther Lieb und Prof. Dr. Achim Göpferich für die Beschichtung der PEG-PLA-Polymere und die Durchführung von Zelladhäsionstests,
- Prof. Dr. Joachim Spatz und Marco Arnold (Universität Heidelberg) für die Beschichtung der mit Goldpunkten nanostrukturierten Oberflächen und die Durchführung von Zelladhäsionstests,

- Dr. Ute Reuning und Anke Benge (Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar) für die Durchführung von Zelladhäsionsstudien auf dem Gebiet der multimeren und heterodimeren RGD-Peptide,
- Sonia Cesana und Dr. Rainer Jordan für die intensive Zusammenarbeit bei der Funktionalisierung der Polyoxazoline,
- Burghard Cordes, der nicht nur zahlreiche Routine-ESI-Massenspektren schnell und zuverlässig aufgenommen hat, sondern auch immer ein offenes Ohr für Sonderwünsche hatte,
- Mona „Dr./2“ Wolff und Johanna Förster für die Durchführung zahlreicher Synthesen,
- Maria Kranawetter für die rasche Durchführung vieler HPLC-Trennungen,
- Dr. Rainer Haeßner, Georg Voll, Monika Goede und Alexander Frenzel für schnelle Hilfe im Kampf gegen die Tücken der Computerwelt,
- Dr. Martin Sukopp und Jörg Auernheimer für das gewissenhafte Korrekturlesen des Manuskripts dieser Arbeit,
- Dr. Niko Schmiedeberg, Dr. Martin Kantlehner, Dr. Dirk Gottschling und Dr. Martin Sukopp für den wissenschaftlichen Austausch und die stete Diskussionsbereitschaft,
- meinen Praktikanten Frank Wiesbrock, Brian Davies, Benjamin Rossbach, Robert Luxenhofer, Janine Eckert, Lucas Doedens und Oliver Schuster für ihre tatkräftige Unterstützung,
- allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern für das hervorragende Arbeitsklima und den Spaß bei diversen Kickerrunden, AK-Bergtouren, Fidel-, Zupf-, Gesangs-, Tanz- und sonstigen Einlagen auf verschiedenen (Weihnachts)-Feiern etc...

Vor allem danke ich meiner Familie und Hans für das entgegengebrachte Verständnis und ihre großartige Unterstützung.

Inhalt

1 Einleitung und Themenstellung	1
2 Integrine und ihre Funktion	4
2.1 Struktur und Familie der Integrine	4
2.2 Liganden und Ligandenbindung.....	8
2.3 Integrinvermittelte Signaltransduktion	16
2.4 Zelladhäsion.....	18
2.5 Integrine und Apoptose	22
2.6 α v-Integrine	24
2.7 Integrine im Knochenstoffwechsel.....	25
3 Biomaterialien.....	28
3.1 Metalle	31
3.2 Calciumphosphat-Materialien	32
3.3 Polymere	35
3.4 Glas.....	38
4 Funktionalisierung von Biomaterialien mit RGD-Peptiden.....	39
4.1 Glas	39
4.2 Proteine	40
4.3 Gold	43
4.4 Calciumphosphat	44
4.5 Titan.....	46
4.6 Polymere	47
4.7 Silicium.....	52
4.8 Design und räumliche Anordnung der RGD-Peptide.....	53
5 Polyvalente Wechselwirkungen.....	60
5.1 Polyvalente Integrinliganden.....	69
6 Synthese und biologische Evaluierung der RGD-Peptide	73
6.1 Allgemeine Aspekte der Peptidsynthese	73
6.2 Synthesestrategie	78
6.2.1 Cyclopeptid.....	79
6.2.2 Gerüstmolekül	80
6.2.3 Anker/weitere Funktionalisierung.....	81
6.3 Bausteine: Cyclopeptid, Spacer und Verzweigungseinheit.....	84
6.3.1 Cyclopeptide.....	84
6.3.2 Spacer	92
6.3.3 Verzweigungseinheit	98
6.4 Monomere RGD-Peptide mit Monothiolanker (Cysteinpeptide).....	102
6.4.1 Synthese.....	102
6.4.2 Evaluierung.....	103

6.5	RGD-Peptide mit saurem Anker (Phosphatpeptide)	105
6.5.1	Synthese.....	107
6.5.2	Evaluierung.....	113
6.6	Monomere RGD-Peptide mit Polythiolanker (Polythiolpeptide).....	119
6.6.1	Synthese.....	120
6.6.2	Evaluierung.....	121
6.7	Multimere RGD-Peptide ohne Anker.....	124
6.7.1	Synthese.....	125
6.7.2	Evaluierung.....	128
6.8	Multimere RGD-Peptide mit Monothiolanker (Cysteamin-Multimere)	132
6.8.1	Synthese.....	132
6.8.2	Evaluierung.....	135
6.9	Multimere RGD-Peptide mit Tricysteinanker (Tricystein-Multimere).....	139
6.9.1	Synthese.....	139
6.9.2	Evaluierung.....	143
6.10	Multimere RGD-Peptide für die Tumordiagnostik (Aminoxy-Peptide) ...	146
6.10.1	Targeting mit (RGD)-Peptiden.....	146
6.10.2	Aufgabenstellung und Syntheseplanung	149
6.10.3	Synthese.....	151
6.10.4	Evaluierung.....	154
6.11	RGD-Heterodimere	160
6.11.1	Synthese.....	163
6.11.2	Evaluierung.....	164
6.12	SNS-Peptide.....	167
6.12.1	Synthese und Evaluierung	168
7	Zusammenfassung	170
8	Experimentalteil.....	173
8.1	Allgemeine experimentelle Bedingungen	173
8.2	Allgemeine Arbeitsvorschriften	175
8.3	Synthese der Bausteine und Aminosäuren	182
8.5	Synthese der monomeren RGD-Peptide mit saurem Anker.....	197
8.6	Synthese der monomeren RGD-Peptide mit Polythiolanker.....	201
8.7	Synthese der multimeren RGD-Peptide ohne Anker.....	202
8.8	Synthese der multimeren RGD-Peptide mit Monothiolanker	206
8.9	Synthese der multimeren RGD-Peptide mit Tricysteinanker.....	208
8.10	Synthese der Aminoxy-RGD-Peptide für die Tumordiagnostik	210
8.11	Synthese der Konjugationsprodukte.....	211
8.12	Synthese der heterodimeren RGD-Peptide mit Thiolanker.....	212
8.13	Synthese der heterodimeren RGD-Peptide ohne Anker.....	214
8.14	Synthese der SNS-Peptide mit Thiolanker	216
9	Anhang.....	218
10	Literatur	228

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Ångström, 10^{-10} m
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abu	α -Aminobuttersäure
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADMET	<i>absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity</i>
Ahx	6-Aminohexansäure
Alloc	Allyloxycarbonyl
All	Allyl
AS	Aminosäure
β -TC	β -Tricalciumphosphat
bs	breites Singulett
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMP	<i>bone morphogenic protein</i>
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
BOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino)-phosphonium-hexafluorophosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bu	<i>n</i> -Butyl
CDHA	Calcium-defizitärer Hydroxylapatit
Col	Collagen
Dpr	2,3-Diaminopropionsäure
d	Dublett oder <i>days</i>
dd	Doppeldublett
δ	chemische Verschiebung
Dab	3,5-Di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure
dest.	destilliert
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamin

DMAc	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorsäureazid
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDCI	<i>N</i> -Ethyl- <i>N,N'</i> -(dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
eq	Äquivalente
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ESI	<i>electro spray ionization</i>
Et	Ethyl
FA	fokaler Adhäsionskomplex
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
Fg	Fibrinogen
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fn	Fibronectin
g	Gramm
G-Protein	GTP bindendes Protein
ges.	gesättigt
GFR	<i>growth factor receptor</i>
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> , -tetramethyluronium-hexafluorophosphat
Hegas	20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
Hmb	2-Hydroxy-4-methoxybenzyl
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazin
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid

Abkürzungen

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTR	<i>hard tissue replacement</i>
HV	Hochvakuum (Ölpumpenvakuum)
Hz	Hertz
IC	<i>inhibitory capacity</i>
Ig	Immunglobulin
IMD	<i>integrin mediated death</i>
J	Kopplungskonstante
K	Kelvin
kat.	katalytisch
kD	Kilodalton
konz.	konzentriert
L	Liter
Ln	Laminin
m	Multipllett
M	Molar
Mab	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIDAS	<i>metal ion dependend adhesion site</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
μM	mikromolar
mmol	Millimol
MAdCAM	<i>mucosal adressing cell adhesion molecule</i>
MMP	Metallomatrixproteinase
MS	Massenspektrometrie
MW	Molgewicht
N	normal
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NMM	N-Methylmorpholin

NMP	N-Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OVA	Ovalbumin
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl-
PCI	Protein C Inhibitor
PEG	Polyethylenglycol
Pen	Penicillamin, 3,3-Dimethylcystein
PET	<i>positron emission tomography</i>
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Polymilchsäure
PLLA	Poly-L-Milchsäure
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i>
PS	Polystyrol
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
q	Quartett
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RP	<i>reversed phase</i>
R_f	Retentionsfaktor
R_t	Retentionszeit
s	Singulett
SAM	<i>self assembled monolayer</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
SPECT	<i>single photon emission computer tomography</i>
SPPS	Festphasen-Peptidsynthese
t	Triplett
<i>t</i> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
<i>t</i> BuOH	<i>tert.</i> -Butanol
TASP	<i>template assembled synthetic protein</i>
TBTU	O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'- tetramethyluronium-hexafluoroborat
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol
TEA	Triethylamin
Teoc	Trimethylsilyloxycarbonyl
TFA	Trifluoressigsäure

TFE	1,1,1-Trifluorethanol
TFFH	Tetramethylfluoroformamidinium-hexafluorophosphat
TGF	<i>transforming growth factor</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
TNF	Tumornekrosefaktor
TMSCl	Trimethylchlorsilan
Trt, Trityl	Triphenylmethyl
uPA	Urokinasetyp Plasminogenaktivator
uPAR	Urokinasetyp Plasminogenaktivator-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
verd.	verdünnt
Vn	Vitronectin
Z	Benzyloxycarbonyl

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, 'Index Guide', 77, 210.) und der *IUPAC-IUB*-Kommission empfohlenen Richtlinien (Eur. J. Biochem. **1984**, 138, 9-37).

Fachausdrücke, die aus anderen Sprachen übernommen wurden, sind *kursiv* geschrieben.

Die Nummerierung der Endverbindungen setzt sich aus Buchstaben und einer fortlaufenden Nummer zusammen. Folgende Buchstaben wurden verwendet: **Z** für Cyclopeptide, **C** für Peptide mit Monocysteinanker, **P** für Peptide mit Phosphatgruppen oder anderen sauren Gruppen im Anker, **M** für Multimere mit Diaminbenzoesäure-Verzweigungseinheit, **MC** für die Verbindungen der M-Serie mit Cysteamin-Anker, **T** für die Multimeren mit Tricysteinanker, **A** für die Peptide mit Aminooxygruppe, **H** für die Heterodimeren mit Cysteinanker, **HL** für die löslichen Heterodimeren ohne Anker und **SNS** für die SNS-Peptide.

Ein Stern „*“ kennzeichnet Peptide mit permanenten Schutzgruppen.

1 Einleitung und Themenstellung

Integrine sind Zelladhäsionsrezeptoren, die in mehrzelligen Organismen die Verankerung von Zellen in der umgebenden Extrazellulären Matrix (ECM) und den Kontakt mit anderen Zellen bewirken. Darüber hinaus sind sie in ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionsprozessen involviert und haben so große Bedeutung für Erhalt und Funktion der verschiedenen Zell- und Gewebetypen. Da integrinvermittelte Zelladhäsion auch in mehrere pathologische Prozesse involviert ist, werden in der Medizin Integrinliganden verwendet, die die Bindung der Integrine an die ECM aufheben sollen. Darüber hinaus kommen Integrinliganden, speziell RGD-Peptide, auch für andere Anwendungen zum Einsatz (Abb. 1):

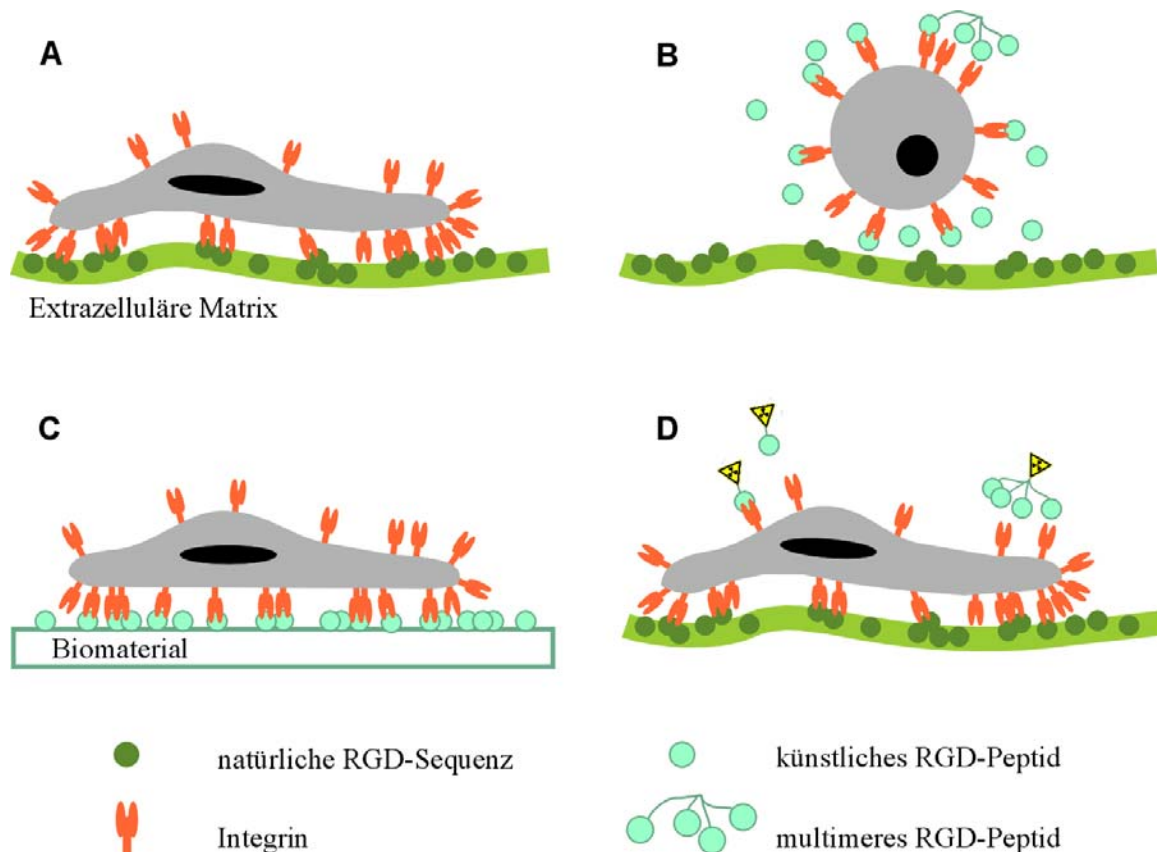


Abb. 1: RGD-Peptide und ihre Verwendungsmöglichkeiten: **A** adhärenzte Zelle in natürlicher Umgebung. **B** RGD-Peptide als Antagonisten der ECM zur Zellablösung, z. B. in der Tumorthherapie. Nach Ablösung gehen viele adhärenz wachsende Zellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) über. **C** RGD-Peptide als Agonisten der ECM zur Stimulierung der Zelladhäsion auf Biomaterialien. **D** RGD-Peptide zum gezielten Transport einer weiteren Funktionalität (Radionuklid, Wirkstoff, DNA) zur Zelle.

In der medizinischen Forschung wurden eine Vielzahl von RGD-Peptiden und RGD-Mimetika synthetisiert, um die Funktion verschiedener Zellen nach **B** gezielt zu unterbinden, z. B. die von angiogenetischen Epithelzellen (Tumorstadium), Osteoclasten (Osteoporose) und Blutplättchen (Thrombosen). So wurde in dieser Arbeitsgruppe das für das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin selektive und hochaffine Cyclopeptid *cyclo(-RGDf[NMe]V-)* entwickelt, welches für den Einsatz in der Tumorthherapie bereits in klinischen Studien getestet wird.^[1] Bei unbestrittener Wirksamkeit solcher Verbindungen ist die Wirkungsweise dieser Medikamente nach neueren Erkenntnissen anders, als sie bisher angenommen wurden. So wird z. B. das Modell der Ablösung von Zellen in der Angiogenese-Inhibition nach **B** in der aktuellen Forschung infrage gestellt.

Das relativ einfache Konzept der stimulierten Zelladhäsion nach **C** scheint sich dagegen gut umsetzen zu lassen: Durch Immobilisierung von RGD-Peptiden auf *per se* gering zelladhäsiven Oberflächen kann Zelladhäsion effektiv vermittelt werden. Dies wurde nicht nur in zahlreichen Zelladhäsionsstudien *in vitro*, sondern inzwischen auch im Tiermodell *in vivo* bestätigt: PMMA - ein Material, welches aus medizinischer Sicht in vielen Punkten problematisch ist – kann durch einfaches Beschichten mit einem RGD-Peptid in ein Biomaterial umgewandelt werden, welches hervorragend in Knochengewebe integriert.^[2] Das Konzept nach **C** scheint somit ein vielversprechender Beitrag zur Entwicklung klinisch relevanter bioaktiver Implantate zu sein.

In einem relativ jungen Ansatz werden nach **D** RGD-Peptide nicht als Effektoren, sondern zum gezielten Transport verschiedener Funktionalitäten zu Integrin-überexprimierenden Zellen verwendet (*targeting*). Auf diesem Gebiet werden z. B. RGD-Konjugate mit Radiomarkern für bildgebende Verfahren in der Tumordiagnostik oder Konjugate mit DNA-Derivaten zum Gentransfer erforscht.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem Gebiet der Beschichtung von Biomaterialien mit hochaktiven und $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin-selektiven RGD-Cyclopeptiden nach **C**. Basierend auf den Arbeiten von Dr. Martin Kantlehner und Dr. Dirk Finsinger in dieser Arbeitsgruppe sollen Verbindungen entwickelt werden, die eine verbesserte Adhäsion verschiedener Zellen, insbesondere Osteoblasten, auf verschiedenen Biomaterialien wie z. B. Calciumphosphat oder Titan bewirken. Die Verbesserungen sollten durch optimierte Ankergruppen, aber auch durch die Verwendung verzweigter, multimerer

RGD-Peptide erzielt werden. Multimere Integrinliganden können entsprechend den natürlichen ECM-Proteinen mehrere Integrine gleichzeitig binden und so das Clustern von Integrinen auslösen, ein physiologischer Vorgang, der für die Zelladhäsion und Zellproliferation von Bedeutung ist.

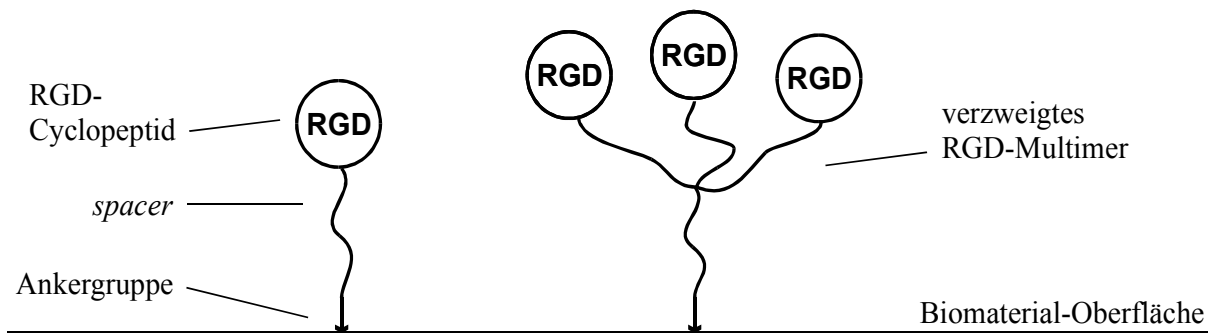


Abb. 2: RGD-Peptide können über Ankergruppen auf Oberflächen immobilisiert werden und so integrinvermittelte Zelladhäsion auf nichtadhäsiven Oberflächen bewirken. Der Abstand zwischen RGD-Peptid und Materialoberfläche lässt sich durch die Länge des spacers variieren. Verzweigte multimere RGD-Peptide sollen mehrere Integrine gleichzeitig binden.

Daneben sollen Verbindungen synthetisiert werden, die neben der RGD-Sequenz noch ein anderes Zelladhäsions-Peptid enthalten. Ähnlich den RGD-Multimeren wird von solchen Verbindungen durch die Bindung anderer Zelladhäsionsrezeptoren eine Verbesserung der Zelladhäsion erwartet.

In einem weiteren Teilprojekt sollen nach **D** (Abb. 1) monomere und multimere RGD-Peptide zum *targeting* von Tumorzellen hergestellt werden. Mit einer radioaktiven Reportergruppe anstelle einer Ankergruppe können diese RGD-Peptide zur Tumordiagnostik, möglicherweise später auch für die Tumorthherapie (Endoradiotherapie) eingesetzt werden. Von multimeren RGD-Peptiden wird hier wiederum eine verbesserte Anbindung an die $\alpha v \beta 3$ -überexprimierenden Tumorzellen und damit eine höhere Anreicherung im Tumorgewebe erwartet.

2 Integrine und ihre Funktion

Adhäsive Kontakte von Zellen – untereinander und zur umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) – sind in mehrzelligen Organismen notwendig für die Entwicklung, Erhalt und die Funktion der verschiedenen Zell- und Gewebetypen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Vorgängen wie z. B. Embryogenese, Hämostase, Homöostase, Wundheilung und Immunantwort.^[3-5] Vermittelt werden die adhäsiven Kontakte durch Zelladhäsionsrezeptoren.

Zelladhäsionsrezeptoren können in mehrere Klassen eingeteilt werden: Integrine, Immunglobulin-Superfamilie, Selectine, Cadherine und sonstige.^[6] Dabei sind die Integrine die wichtigsten Rezeptoren zur physikalischen Verankerung der Zelle; durch die Zellmembran hindurch „integrieren“ sie in fokalen Adhäsionskomplexen das Cytoskelett der Zelle in das Gerüst der ECM.^[7, 8] Inzwischen kennt man auch Integrine, die an Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind.^[6] Über die mechanische Funktion hinaus vermitteln Integrine Signale durch die Zellmembran. Die Signaltransduktion verläuft dabei sowohl von außen nach innen (*outside-in signaling*), als auch von innen nach außen (*inside-out signaling*).^[9]

Integrine sind in viele pathologische Prozesse involviert, z. B. Tumorwachstum,^[10, 11] Thrombosen,^[3, 12] Arthritis,^[13] Retinopathie,^[14] Osteoporose,^[15, 16] akutes Nierenversagen^[17, 18] und chronische Entzündungen.^[19, 20]

Auf einer Zelle gibt es typischerweise etwa 100 000 Integrine.^[21] Sie befinden sich in der Zellwand bevorzugt in cholesterin- und glycosphingolipidreichen Bereichen, den sogenannten *rafts*.^[22, 23]

2.1 Struktur und Familie der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche nichtkovalent miteinander verknüpft sind. Derzeit sind 18 α und 8 β -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Integrine bilden (Abb. 3). Nach den Ergebnissen des Human-Genom-Projekts sind sechs neue α -Untereinheiten und eine neue β -Untereinheit vorhergesagt,^[24] allerdings steht der

Beweis deren funktioneller Expression noch aus. Zur Diversität der Integrine tragen weiterhin verschiedene Splice- und Glycosylierungs-Varianten bei.^[25, 26]

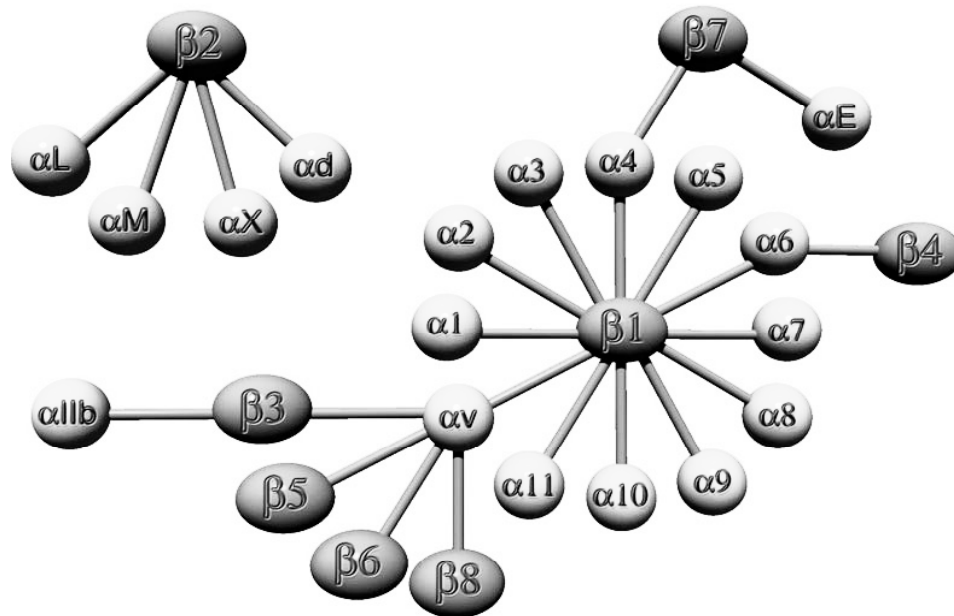


Abb. 3: Die 24 bisher bekannten Integrine, die sich aus Kombinationen der verschiedenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Man kann verschiedene Integrin-Subfamilien unterscheiden, z. B. die $\beta 1$ - oder die $\beta 2$ -Integrine.^[9]

Die extrazelluläre Domäne stellt den größten Teil von α - und β -Untereinheit dar. Sie besteht jeweils aus einer Kopf-Region, aus der eine gestreckte Stelzen-Region hervorgeht. Über die sich jeweils anschließende kurze Transmembranhelix und die cytoplasmatische Domäne kann das Integrin mit Proteinen des Cytosols verknüpft werden (Abb. 4). Die größere α -Untereinheit besitzt ca. 1100 Aminosäuren und ist häufig aus zwei unterschiedliche langen Aminosäureketten aufgebaut, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Der N-terminale Bereich ist durch mehrere Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} -bindende Abschnitte gekennzeichnet.^[27] Die β -Untereinheit besteht aus ca. 800 Aminosäuren (Ausnahme $\beta 4$, ca. 1750 Aminosäuren) und enthält u. a. vier hochkonservierte cysteinreiche Domänen nahe der transmembranen Region.

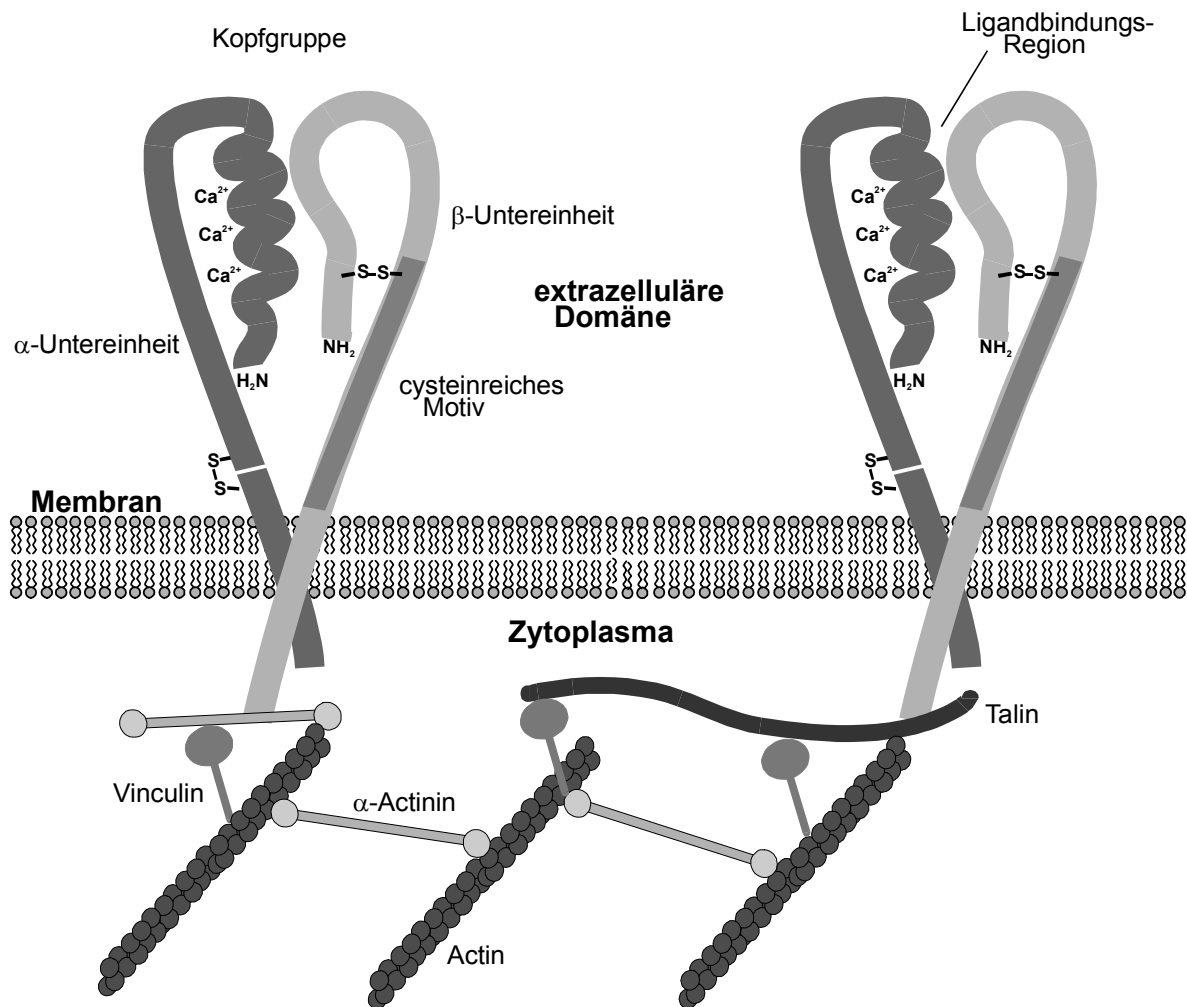


Abb. 4: Schematische Darstellung der Integrine. Die α - und β - Untereinheit sind nichtkovalent über Bereiche der Kopfgruppe und der Transmembrandomänen miteinander verknüpft. Über die C-terminale Domäne der β -Untereinheit sind die Integrine mit den Proteinen des Cytoskeletts verknüpft.

Xiong *et al.* haben 2001 die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des $\alpha\beta_3$ -Integrins aufgeklärt (Abb. 5).^[28] In Übereinstimmung mit früher erhaltenen elektronenmikroskopischen (EM) Bildern^[29] wurde der ovale Kopf (Maße etwa 90x60x45 Å) und zwei Stelzen-Regionen („stalk“-Regionen) gefunden. Im Unterschied zu den EM-Untersuchungen sind die Stelzen-Regionen jedoch nicht linear sondern geknickt. In der aktuellen Forschung wird diskutiert, ob der Knick ein Kristallisationsartefakt ist oder ein konstitutives Element der integrinvermittelten Signaltransduktion darstellt. Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller, die sich anschließende Stelzen-Region aus drei linear angeordneten β -Faltblättern. Die

Kopfgruppe der β -Untereinheit setzt sich zusammen aus der β I-Domäne (auch β A-Domäne), einem von acht Helices umgebenen sechssträngigen Faltblatt („Rossmann-Faltung“), und einer Immunglobulin(Ig)-ähnlichen „Hybrid“-Domäne. Auf der β I-Domäne ist auch die MIDAS(*metal ion dependend adhesion site*)-Region lokalisiert, die zusammen mit Teilen des Propellers der α -Untereinheit die Liganden-Bindungsstelle darstellt. Die Stelzen-Region der β -Untereinheit besteht aus sechs Domänen; vier davon sind EGF(*epidermal growth factor*)-artig und cysteinreich. Das Muster der Disulfidbrücken in den EGF-Domänen konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden.

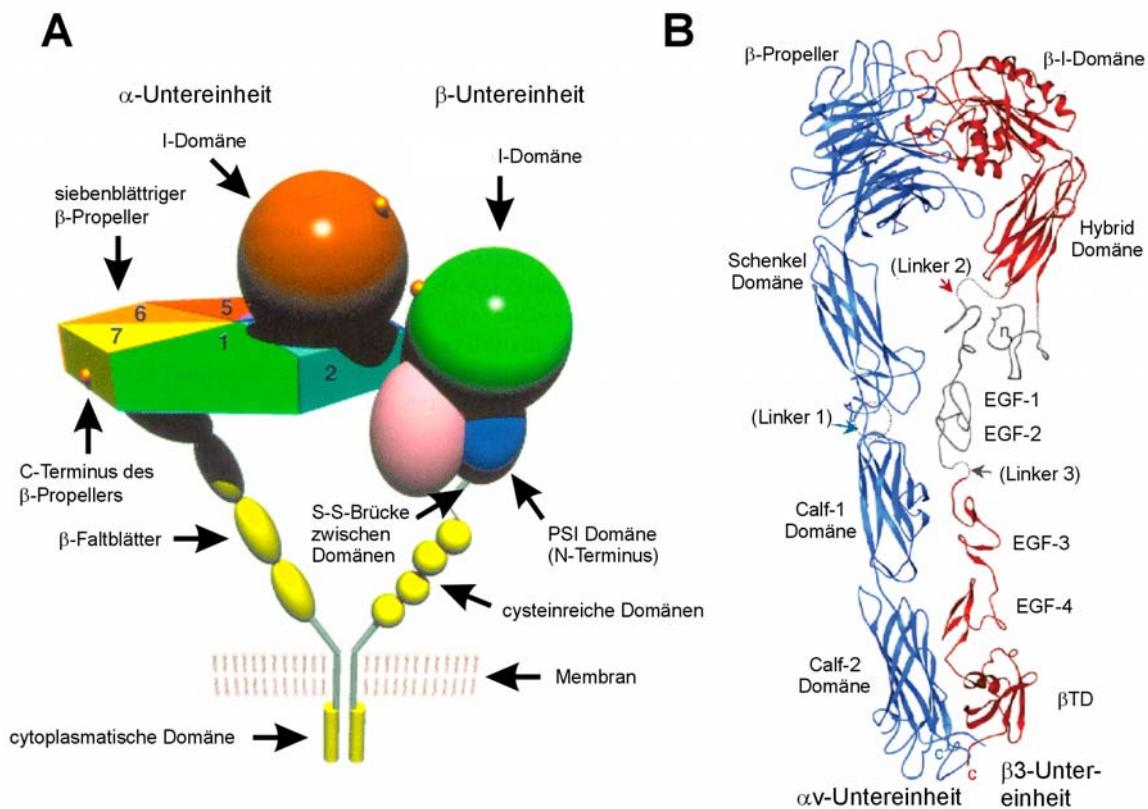


Abb. 5: **A** Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine.^[30] Die Kopfgruppe der α -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen β -Propeller. Einige α -Untereinheiten (z. B. $\alpha 1$, $\alpha 2$, αM , nicht αv !) besitzen zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche eingeschobene Domäne (αI -Domäne). **B** Korrigierte Röntgenkristallstruktur des extrazellulären Teils des $\alpha v \beta 3$ -Integrins mit vier Domänen der α -Untereinheit und acht Domänen der β -Untereinheit.^[28]

Die Kopfgruppen der α - und der β -Untereinheit werden u. a. durch einen Kationen- π -Kontakt zusammengehalten. Dabei ragt die Guanidiniumgruppe eines Arginins der β I-Domäne in den von aromatischen Resten umgebenen zentralen Hohlraum des Propellers der α -Untereinheit.

Die Integrin- α -Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, αD , αE , αL , αM und αX , besitzen in der Kopfgruppe eine zusätzliche eingeschobene sogenannte α I-Domäne (*inserted domain*, auch: A-Domäne). Die Liganden-Bindungsstelle dieser Integrine ist auf der α I-Domäne lokalisiert.^[31] Die α I-Domäne - frei und im Komplex mit einem synthetischen Collagen-Liganden - war das erste röntgenkristallographisch charakterisierte Integrinfragment.^[27]

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit sind mehrfach N-glycosyliert. Zwei-, drei- und vierantennäre Strukturen wurden gefunden.^[32, 33] Durch Veränderung im Glycosylierungsmuster kann die integrinvermittelte Adhäsionsaktivität der Zellen gesteigert und vermindert werden, bis hin zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit.^[34-36] Einige Tumorzelllinien weisen abweichende Glycosylierungsmuster auf.^[33, 37-39]

2.2 Liganden und Ligandenbindung

Durch Kombination der verschiedenen α - und β -Untereinheiten entstehen Integrine mit bestimmter Ligandenspezifität. Während einige Integrine, mit hoher Selektivität nur einen Liganden binden, z. B. $\alpha v \beta 6$ an das ECM-Protein Laminin, sind andere Integrine in ihrem Ligandenbindungsverhalten eher promisk, wie z. B. $\alpha v \beta 3$, welches zwar bevorzugt an Osteopontin und Vitronectin, aber noch mindestens an sieben weitere ECM-Proteine bindet. Die natürlichen Liganden der jeweiligen Integrine aus ECM und Zelloberfläche sind in Tabelle 1 angegeben. Weiterhin gibt es lösliche Integrinliganden, u. a. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), aber auch xenogene wie z. B. Bakterien, Viren und die gerinnungshemmenden Disintegrine aus Schlangengiften und dem Speichel von Blutegel und Zecke.^[24]

Tabelle 1: Natürliche Liganden der verschiedenen Integrine aus ECM und Zelloberflächen.^[40-42] Grau unterlegte Felder bezeichnen Wechselwirkungen, die mit RGD-Peptiden inhibierbar sind.^[43]

Integrin	Ligand	Integrin	Ligand
$\alpha 1\beta 1$	Col, Ln	$\alpha D\beta 2$	VCAM-1, ICAM-3
$\alpha 2\beta 1$	Col, Ln	$\alpha L\beta 2$	ICAM-1, ICAM-2
$\alpha 3\beta 1$	Col, Ln, Fn	$\alpha M\beta 2$	iC3b, Fg, Fn, Faktor X, ICAM-1, ICAM-2
$\alpha 4\beta 1$	Fn, In, Opn, ^[44] VCAM-1	$\alpha X\beta 2$	iC3b, Fg
$\alpha 5\beta 1$	Fn, Fg	$\alpha IIb\beta 3$	Fg, Fn, Vn, vWF, Tsp
$\alpha 6\beta 1$	Ln	$\alpha v\beta 3$	Vn, Ln, Fn, vWF, Tsp, Tn, Opn, Fib, Fbu
$\alpha 7\beta 1$	Ln	$\alpha v\beta 5$	Vn, Fn, Opn, Fg, vWF
$\alpha 8\beta 1$	Fn, Vn, Tn, POEM, ^[45] Neph ^[46]	$\alpha v\beta 6$	Fn, Fg, Tn
$\alpha 9\beta 1$	Col, Ln, Tn, VCAM-1, ^[47] Opn ^[47]	$\alpha v\beta 8$	Vn
$\alpha 10\beta 1$	Col	$\alpha 4\beta 7$	MAdCAM-1, VCAM-1, Fn
$\alpha 11\beta 1$	Col	$\alpha 6\beta 4$	Ln
$\alpha v\beta 1$	Vn, Fn, Opn, Fg ^[48]	$\alpha E\beta 1$	E-Cadherin

Verwendete Abkürzungen der Integrinliganden (alphabetisch): **Col** = Collagen; **Ep** = Epiligrin; **Faktor X** = Blutgerinnungsfaktor X; **Fbu** = Fibulin; **Fib** = Fibrillin; **Fg** = Fibrinogen; **Fn** = Fibronectin; **ICAM** = intercellular adhesion molecule; Isoformen von ICAM sind zusätzlich durch eine Nummer spezifiziert; **iC3b** = inactivate complement factor 3b; **In** = Invasin; **Ln** = Laminin; Isoformen von Laminin sind zusätzlich durch eine Nummer spezifiziert; **MAdCAM** = mucosal adressing cell adhesion molecule; **Neph** = Nephronectin; **Opn** = Osteopontin; **POEM** = preosteoblast epidermal growth factor-like repeat protein with meprin; **Tn** = Tenascin; **Tsp** = Thrombospondin; **VCAM** = vascular cell adhesion molecule; **Vn** = Vitronectin; **vWF** = von Willebrand Faktor.

Das Tripeptid RGD wurde 1984 von *Pierschbacher* und *Ruoslahti* als minimale essenzielle Zelladhäsionssequenz in Fibronectin entdeckt und als Bindungsepitop für Integrine identifiziert.^[49] Es konnte gezeigt werden, dass immobilisierte RGD-Peptide ähnlich wie ECM-Proteine integrinvermittelte Zelladhäsion bewirken, während lösliche RGD-Peptide antagonistisch zur ECM adhärenzte Zellen ablösen.^[49] Die RGD-Sequenz wurde seitdem in vielen anderen ECM-Proteinen nachgewiesen, z. B. in Vitronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Collagen, Laminin, Osteopontin,

Tenascin und Thrombospondin, aber auch in den oben erwähnten xenogenen Integrinliganden. Die verschiedenen Proteine können trotz des gemeinsamen RGD-Motivs eine hohe Integrinselektivität aufweisen. Diese kann mehrere Ursachen haben: Zum einen besitzen ECM-Proteine weitere spezifitäts- (und affinitäts-) steigernde Adhäsionssequenzen für den Kontakt mit anderen Bindungsregionen auf den jeweiligen Integrinen, wie z. B. Fibronectin mit der $\alpha 5\beta 1$ -bindenden PHSRN- und wahrscheinlich zusätzlich mit der kürzlich entdeckten KNEED-Sequenz.^[50, 51] Weiterhin nimmt man an, dass die jeweiligen RGD-Sequenzen, obwohl sie üblicherweise in flexiblen Schleifen (*loops*) präsentiert werden, in einer bevorzugten Konformation vorliegen und so unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Integrinsubtypen aufweisen.^[43] Die Abhängigkeit zwischen Konformation und Integrinselektivität konnte mit konformativ eingeschränkten cyclischen RGD-Penta- und -Hexapeptiden bewiesen werden.^[52-56] Weiterhin tragen die Seitenketten der benachbarten Aminosäuren zur Integrinselektivität bei, z. B. weist das Peptid GRGDS keine Selektivität unter den Integrinen $\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ und $\alpha v\beta 3$ auf, während die verlängerte Sequenz GRGDSP eine erhöhte Affinität für $\alpha 5\beta 1$ besitzt.^[57] Dieser Effekt ist allerdings nur schwer vom konformativen Beitrag zu trennen.

Ungefähr die Hälfte der bekannten Integrine binden ECM-Proteine in einer mit RGD-Peptiden inhibierbaren Weise (grau unterlegte Felder in Tabelle 1).^[43] Dabei haben Integrine wie $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ primär andere Adhäsionssequenzen. Im letzteren Fall ist die RGD-Sequenz des natürlichen Liganden Collagen für das Integrin nicht erreichbar und nur nach Denaturierung oder Proteolyse des Collagens zugänglich!^[43]

Eine Fokussierung auf RGD-abhängige Integrinbindung vor einigen Jahren beruhte, neben ihrer tatsächlichen zentralen Rolle, auf der Hoffnung, mit der RGD-Sequenz ein „universelles Zellerkennungsmotiv“ gefunden zu haben.^[43] Neben der RGD-Sequenz wurden jedoch viele andere integrinbindender Peptidsequenzen gefunden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Die bekannten Adhäsionssequenzen der verschiedenen Integrine.^[6, 29, 58, 59]

Integrin	Adhäsionssequenz (Herkunft)	Integrin	Adhäsionssequenz (Herkunft)
$\alpha 1\beta 1$	GFOGER (Col I)	$\alpha D\beta 2$?
$\alpha 2\beta 1$	DGEA (Col I), RKKH (Dis), ^[60] YYGDALR, IAFQRN(Ln), ^[61] FYFDLR, (Col IV), GFOGER (Col I)	$\alpha L\beta 2$	KELLPGNNRKV (ICAM- 1), LET, IET (?)
$\alpha 3\beta 1$	RGD (Fn), KQNCLSSRASFRGCVRNLRL SR (Ln)	$\alpha M\beta 2$	LYQAKRFKV, ^[62] KQAGDV (Fn), KRLDGS (Fb) ^[62]
$\alpha 4\beta 1$	REDV, LDV, IDAPS (Fn) QIDSP, GNEH, KLEK (VCAM), SVVYGLR (Opn), ^[44] MLDG (Dis) ^[63]	$\alpha X\beta 2$	GPRP (Fg)
$\alpha 5\beta 1$	RGDSP, PHSRN, KNEED (Fn), ^[51] KQAGDV, RGD? (Fg), RYDS (Str), ^[64] CRRETAWAC (Phagendisplay)	$\alpha v\beta 3$	RGD (Vn, Fn, vWF, Tsp, Opn, BSP, Tn, Fib, ^[65] Fg, ^[66]), SNS (Col IV), ^[67] KRLDGS (Fg) ^[68]
$\alpha 6\beta 1$	NPWHSIYITRFG, ^[61] TWYKIAFQRNRH, ^[69] SIYITRF (Ln), ^[69] ECD (Fertilin- β) ^[70]	$\alpha v\beta 5$	RGD (Vn), RKKRRQRRR (Tat) ^[71]
$\alpha 7\beta 1$?	$\alpha v\beta 6$	RGD (Fn), DLXXL (Tn)
$\alpha 8\beta 1$	RGD (Fn, ^[72] Vn, ^[73] Tn ^[74])	$\alpha v\beta 8$?
$\alpha 9\beta 1$	AEIDGIEL (Tn), ^[63] SVVYGLR (Opn), ^[63] MLDG (Dis) ^[63]	$\alpha IIb\beta 3$	KQAGDV, RGD (Fg), RGD (Fn, Vn, vWF, Tsp), KGD (Dis)
$\alpha 10\beta 1$?	$\alpha 6\beta 4$	14mer aus Col XVII ^[75]
$\alpha 11\beta 1$?	$\alpha 4\beta 7$	REDV (Fn), QIDSP, GNEH (VCAM), LDT (MadCAM)
$\alpha v\beta 1$	RGD (Fn, Vn)	$\alpha E\beta 7$	NRDKETKV (E-Cadherin) ^[76]

Abkürzungen der Integrinliganden: **BSP** = *bone sialo protein*; **Col** = Collagen; **Dis** = Disintegrine aus Schlangengiften; **Ep** = Epiligrin; **Faktor X** = Blutgerinnungsfaktor X; **Fbu** = Fibulin; **Fib** = Fibrillin; **Fg** = Fibrinogen; **Fn** = Fibronectin; **ICAM** = *intercellular adhesion molecule*; **iC3b** = *inactivate complement factor 3b*; **In** = Invasin; **Ln** = Laminin; **MAdCAM** = *mucosal adressing cell adhesion molecule*; **Opn** = Osteopontin; **Str** = Streptavidin; **Tat** = HIV-Tat-Protein; **Tn** = Tenascin; **Tsp** = Thrombospondin; **VCAM** = *vascular cell adhesion molecule*; **Vn** = Vitronectin; **vWF** = von Willebrand Faktor.

Die an Integrine bindenden Peptidsequenzen sind divers, enthalten aber meistens ein Aspartat oder ein Glutamat, das essentiell für die Rezeptorbindung ist. Diese Tatsache lässt sich durch die oben erwähnten Kristallstruktur des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrins im Komplex mit einem Liganden – dem cyclischen RGD-Peptid *cyclo*[-RGDf(NMe)V-] (**1**) – leicht erklären.^[77] Über die Seitenketten-Carboxylgruppe des Aspartats komplexiert der Ligand an das zweiwertiges Kation (Ca^{2+} , Mg^{2+} oder Mn^{2+}) der MIDAS-Region der β -Untereinheit (Abb. 6). Eine entsprechende MIDAS-Region findet sich auch in der Ligandenbindungsstelle der Integrine mit αI -Domäne.^[27, 30]

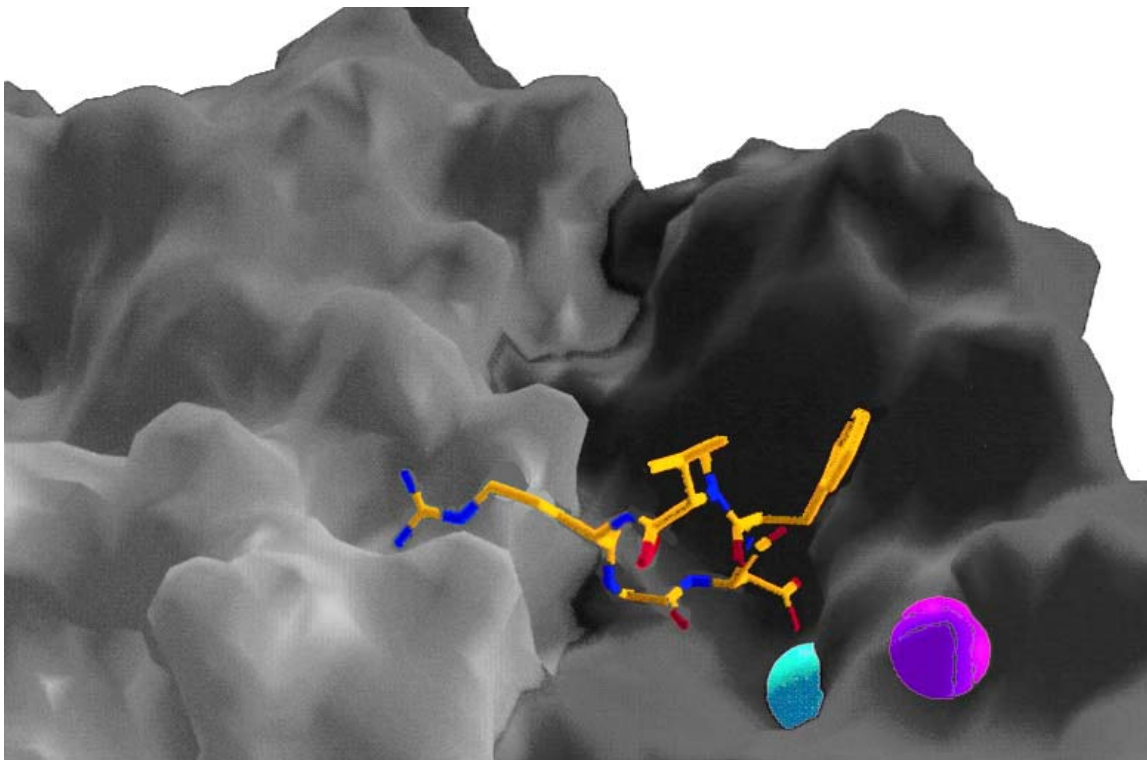


Abb. 6: Oberflächendarstellung der RGD-Bindungsstelle des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrins mit dem Liganden *cyclo*(-RGDf[NMe]V-) **1** und zwei Mn^{2+} -Ionen.^[77] Die Arginin-Bindungsstelle befindet sich auf der α -Untereinheit (grau), die Bindungsstelle des Aspartats auf der β -Untereinheit (dunkelgrau). Die zwei Mn^{2+} -Ionen sind in cyan (MIDAS-Region) und magenta (ADMIDAS-Region) dargestellt.

Im $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin als Integrin ohne αI -Domäne fungiert das RGD-Motiv weiterhin als Klammer zwischen den beiden Untereinheiten, indem die Guanidgruppe des Arginins an eine negativ geladene Region der αv -Untereinheit bindet. Weiterhin gibt es

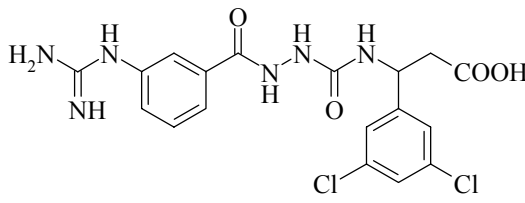
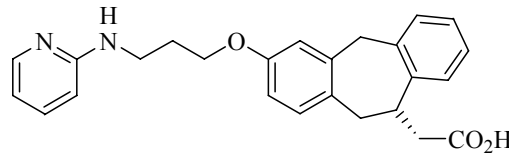
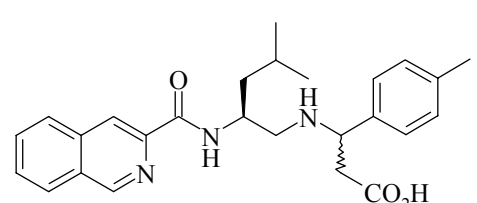
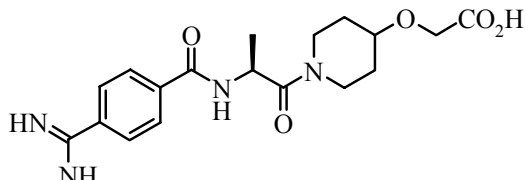
hydrophobe Kontakte des D-Phenylalanins sowie Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats (Asp-NH) und der Aspartat-Seitenkette mit dem Integrin. Das Valin ragt aus der Bindungstasche und nimmt nicht an der Integrinbindung teil.^[77]

Aus der Struktur des Komplexes kann man auch einfach ableiten, warum die ähnlichen Verbindungen RGE, KGD und RAD nur eine geringe Affinität für $\alpha v \beta 3$ aufweisen: Die Glutamat-Seitenkette ist zu lang, bzw. die Lysin-Seitenkette zu kurz, um die entsprechenden Bindungsstellen zu erreichen. Die zusätzliche Methylgruppe des Alanins verursacht einen *clash* des an dieser Stelle dicht auf der Integrin-Oberfläche liegenden Liganden.

Auf der Basis der natürlichen Ligandenbindungssequenzen wurde eine Vielzahl künstlicher Integrinliganden entwickelt, die in Affinität, Selektivität und ADMET-Parametern (*absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity*) den natürlichen Peptiden überlegen sind. Zunächst lassen sich durch Cyclisierung und den wechselnden Einbau von D-Aminosäuren (*spatial screening*) selektive, superaktive und metabolisch stabile Peptide erzeugen.^[52] Das aus diesem Prozess hervorgegangene $\alpha v \beta 3$ -selektive und hochaffine *cyclo*[-RGDf(NMe)V-]^[1] (**1**) (Cilengitide, EMD 121974) wird derzeit von *Merck KGaA* in der Tumorthherapie in der Klinikphase II getestet. Verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften und weitere Affinitätssteigerungen lassen sich mit den peptidomimetischen bzw. nichtpeptidischen RGD-Analoga erreichen.^[78]

Die intensivste Forschung wird derzeit auf dem Gebiet der $\alpha v \beta 3$ -selektiven Verbindungen (Arthritis, Retinopathie, akutes Nierenversagen, Osteoporose, Tumorthherapie),^[78-81] der $\alpha IIb \beta 3$ -selektiven Verbindungen (Blutgerinnung),^[12, 82, 83] und der $\alpha 4 \beta 1$ - und $\alpha 4 \beta 7$ selektiven Verbindungen (Entzündungen, Arthritis, Colitis, Diabetes)^[84-86] betrieben (Tabelle 3). Die inzwischen zugänglichen Strukturen der Integrin-Ligand-Komplexe ermöglichen auf diesem Gebiet nun erstmals *target-gestütztes* rationales Wirkstoffdesign.

Tabelle 3: Auswahl verschiedener hochaffiner, künstlicher Integrinliganden und die jeweilige halbmaximale Inhibierungskonzentration (IC_{50}) gegenüber dem natürlichen Integrinliganden.

Nr.	Verbindung	IC_{50} [nM]	Ref.
2	cyclo(-RGDfV-)	$\alpha v\beta 3$ (Vn): 2.5 $\alpha IIb\beta 3$ (Fg): 1700	[87]
3		$\alpha v\beta 3$ (Vn): 1.0 $\alpha v\beta 5$ (Vn): > 100 $\alpha v\beta 6$ (Fn): 1.4 $\alpha IIb\beta 3$ (Fg): > 1000	[78]
4		$\alpha v\beta 3$ (Vn): 7 ^a $\alpha IIb\beta 3$ (Fg): 9000 ^a	[79]
5	cyclo(-LDTDpF-)	$\alpha 4\beta 7$ (MAdCAM): ^b 7 % $\alpha 4\beta 1$ (VCAM): ^b 109 %	[85]
6		$\alpha 4\beta 7$ (MAdCAM): ^b 10 % (11 %) ^c $\alpha 4\beta 1$ (VCAM): ^b 71 % (19 %) ^c	[84]
7	cyclo[-RGDY(OMe)RE(NH ₂)-]	$\alpha IIb\beta 3$ (Fg): 10 $\alpha 5\beta 1$ (Fn): 400 $\alpha v\beta 5$ (Vn): 10000	[88]
8		$\alpha IIb\beta 3$ (Fg): 1.9	[12]

^a Bindungskonstante K_i , ^b Adhäsion von 38- $\beta 7$ -Zellen bei 2 mg Verbindung/mL Adhäsionspuffer, ^c Isomer

Das Peptid cyclo(-RGDfV-) (2) (Abb. 7) ist die Grundlage der in dieser Arbeit verwendeten RGD-Peptide. Dieses von R. Haubner entwickelte $\alpha v\beta 3$ -Integrin-selektive

und hochaffine Cyclopentapeptid besitzt gemäß NMR-Strukturuntersuchungen eine Vorzugskonformation, bei der die Aminosäuren D-Phe und Val die zentralen Positionen (i+1 und i+2) eines $\beta\text{II}'$ -turns und das Glycin die i+1-Position eines γ -turns einnehmen.^[55] Damit werden die Seitenketten des Aspartats und des Arginins in eine optimale räumliche Anordnung für die Wechselwirkung mit den entsprechenden Bindungsregionen des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrins gebracht.

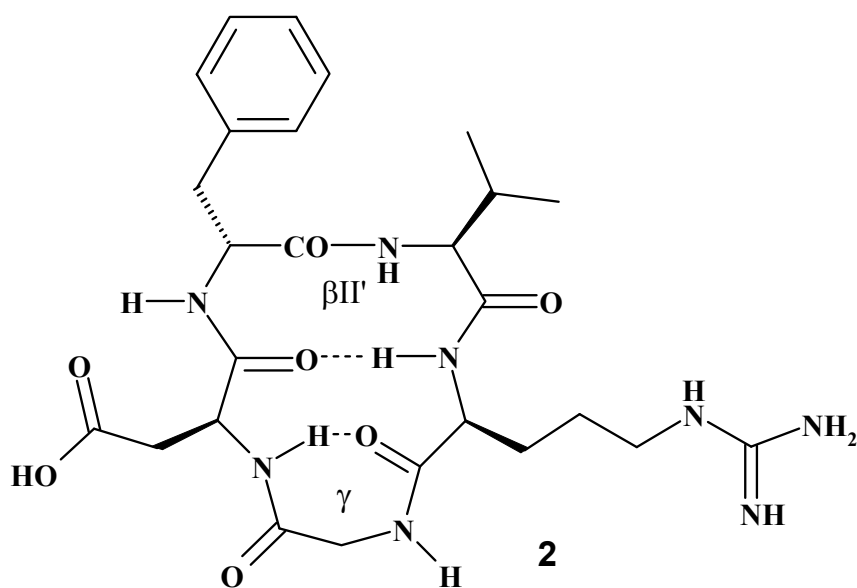


Abb. 7: Das für das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin selektive und hochaffine Peptid cyclo(-RGDfV-) (**2**).

Das Valin in **2** nimmt nicht an der Integrinbindung teil (Abb. 6) und die Position des Valins (Position 5) kann, unter weitgehendem Erhalt der Integrinaffinität, durch andere Aminosäuren eingenommen werden.^[89] Wie von *D. Finsinger* gezeigt wurde, kann das Peptid cyclo(-RGDfK-) (**9**) über die ϵ -Aminogruppe des Lysins an Position 5 unter Erhalt der biologischen Aktivität mit verschiedenen weiteren funktionalen Molekülen, u. a. Ankergruppen zur Immobilisierung auf Oberflächen verknüpft werden.^[90]

2.3 Integrinvermittelte Signaltransduktion

Dass Signaltransduktion keine einfacher linearer Pfad biochemischer Interaktionen darstellt, sondern ein interagierendes Netzwerk, zeigt sich deutlich am Beispiel der Integrine. So kann z. B. eine Aktivierung (Ligandenbindung) des $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrins in Neutrophilen gegensätzliche Folgen haben: Liegen proapoptotische Stimuli vor, wird Apoptose ausgelöst, liegen diese Stimuli nicht vor, wird Apoptose unterdrückt. Weiterhin wird trotz proapoptotischer Stimuli Apoptose unterdrückt, wenn die Integrine im Cluster, aber nicht aktiviert vorliegen.^[91]

Integrine sind in eine enorme Zahl von Signaltransduktionsereignissen involviert.^[101] Mit ihnen kann eine Zelle über viele Einzelereignisse im extrazellulären Bereich und im Zellinneren gleichsam „integrieren“ und dann entsprechende Entscheidungen treffen. Die integrinvermittelte Signaltransduktion findet dabei auf mehreren Ebenen statt: Konformationsänderung, Clustern von Integrinen, Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen, Kraftübertragung und Translokation.

Konformationsänderungen sind bei Integrinen mehrstufig. Für das $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin kennt man z. B. den niedrigaffinen ruhenden Zustand, in dem natürliche Liganden kaum gebunden werden,^[92] einen höheraffinen ligandenbindenden (ligandkompetenten) Status, bewirkt durch verschiedene Stimuli (Mn^{2+} , Regulation durch Proteine des Cytosols, RGD-Liganden),^[93, 94] eine ADP-vermittelte affinitätsneutrale Veränderung, so dass auch weniger exponierte Liganden gebunden werden können,^[95] den ligandengebundenen Zustand und einen geöffneten Zustand nach Ligandenbindung.^[94, 96] Für das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin werden ähnliche Stufen postuliert, hier scheint konstitutiv der ligandkompetente Status vorzuliegen, welcher durch cytosolische Proteine in den ruhenden Zustand überführt wird.^[97] Nach Modellrechnungen von *K. Gottschalk* beruht der Übergang zwischen dem niedrigaffinen und dem ligandkompetenten Status auf einer Verdrehung von α - und β -Untereinheit zueinander. Durch die Bindung eines Liganden wird eine scherenartige Bewegung der Untereinheiten bewirkt, was zu einer Trennung der Kopfgruppen der Untereinheiten führt.^[96, 98] Die Transmembrandomänen haben dabei sowohl bei der Verdrehung als auch bei der Öffnung scharnierartig miteinander Kontakt.^[98] Stimuliert durch die

geknickte Form der $\alpha\beta 3$ -Kristallstruktur wird als Grundlage der Konformationsänderung und Signaltransduktion auch ein sogenanntes „Klappmesser-Modell“ vorgeschlagen.^[93, 99]

Das **Clustern von Integrinen**, also eine lokale Anhäufung, erhöht die Bindungsavidität einer Zelle. Integrincluster sind Vorläufer von Fokalen Adhäsionskomplexen (FAs). Dort werden in besonderem Maß auch Partner für die Signalübertragung rekrutiert.

Die **Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen** erfolgt im Zellinneren, in der Membran und im extrazellulären Bereich. Integrine interagieren mit Tetraspaninen, Pentaspaninen, Proteinen der Ig-Superfamilie, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Insulinrezeptor, uPAR (urokinaseartiger Plasminogenaktivator-Rezeptor), Caveolin, Ionenkanälen, Proteoglycanen und vielen anderen.^[24, 100-102] Dabei haben Integrine Einfluss auf die Funktion der anderen Proteine und umgekehrt. Diese Beiträge zur Signaltransduktion überschneiden sich mit denen von Konformationsänderung und Clustern.

Die integrinvermittelte **Kraftübertragung**, besitzt neben der mechanischen Funktion in Zellverankerung und Migration auch eine signalgebende Komponente. Bereits der Widerstand, den ein ligandengebundenes immobilisiertes Integrin auf die kontraktile Kräfte der Zelle ausübt ist ein sensorischer Beitrag, der in der Bildung von FAs und *stress fibers* resultieren kann.^[103-105] Es werden aber auch komplexere mechanosensorische Funktionen von Integrinen in Geweben unter mechanischer Belastung und Fließkräften beschrieben, z. B. in Knochen, Knorpel und Epithel.^[106-110] Evtl. verändert dabei die Krümmung der Membran die Konformation der Integrine.^[111]

Die **Translokation** von Integrinen aus der Zellmembran vermittelt ebenfalls Signale. So aktivieren die bei der Zellmigration aus der Membran ausgerissenen $\beta 1$ -Integrine Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1).^[112, 113] Endocytisierte Integrine können RGD-funktionalisierte Proteine (z. B. Fibronectin, Antikörper) durch Endocytose ins Zellinnere transportieren.^[114, 115] Endocytisierte nicht-ECM-gebundene Integrine werden im sogenannten *unligation*-Modell für die apoptotische Wirkung von RGD-Peptiden verantwortlich gemacht (Kap. 2.5).

Integrinvermittelte Signaltransduktion und die molekularbiologischen *downstream*-Ereignisse sind seit Jahren Gegenstand der Forschung. In den folgenden Kapiteln

werden die für diese Arbeit wichtigen integrinbasierenden zellulären und physiologischen Ereignisse sowie ihre molekularbiologischen Folgen zusammengefasst: Zelladhäsion, Anoikis und Apoptose, sowie Integrine im Knochenstoffwechsel. Für weitere Informationen über molekularbiologische *downstream*-Ereignisse sei auf zwei Übersichtsartikel verwiesen.^[101, 116] Weitere Informationen zu Zellmigration sowie Integrine im Tumorgeschehen und Angiogenese finden sich im Anhang Kap. 9.2–9.4.

2.4 Zelladhäsion

Integrinvermittelte Zelladhäsion besteht aus den vier Schritten Zellanheftung, Zellspreitung, Organisation des Cytoskeletts und Ausbildung der Fokalen Adhäsionskomplexe (FAs).^[117] Die Ereignisse können sich dabei auch z. T. überschneiden.

Im ersten Schritt kontaktiert die Zelle das zu Grunde liegenden Substrat und bindet zunächst nur schwach, z. B. über Proteoglykane, Selectine und einzelne Integrine.^[118]

Im zweiten Schritt beobachtet man ein Abplatten und Ausbreiten der Zelle über das Substrat. Hier werden Integrine wahrscheinlich aktiviert und geclustert. Dadurch wird im nächsten Schritt das Cytoskelett aktiviert, das Actin organisiert sich in *stress fibers* zwischen den Integrinclustern. Die Zelle ist nun fest mit dem Substrat verankert. Im vierten Schritt bilden sich die Fokalen Adhäsionskomplexe aus. Sie bestehen – in der Zusammensetzung entsprechend Zellsorte, Zellzustand und ECM variabel^[119] – aus über 50 anderen transmembranen, membranassoziierten und cytosolischen Proteinen.^[120]

Das initiale Ereignis zur Bildung der FAs ist das **Clustern von Integrinen**. Es kann durch multivalente Liganden ausgelöst werden, wie am Beispiel von α IIb β 3-Integrinen in Lipiddoppelschichten gezeigt wurde.^[22] Interessanterweise erzeugt der dimere Ligand Fibrinogen neben Integrindimeren noch höhere Homologe. Das spräche für eine Tendenz zur Autooligomerisierung, wie sie, besonders im ligandengebundenen Zustand, in Micellen bei erhöhter Temperatur (40°C) beobachtet wurde.^[121] In Zellen scheint der monovalent-gebundene Zustand nicht ausreichend zu sein, um ein

stabiles Clustering herbeizuführen (vgl. Apoptosekapitel). Man kann sich aber leicht eine Kooperationskette nach folgendem Muster vorstellen: Monovalente Ligandenbindung/Aktivierung - Translokalisierung des Integrins in *rafts*^[23] - weitere Anreicherung von Integrinen in *rafts* - erste Oligomerisierung - Polyvalente Ligandenbindung - Rekrutierung von verbrückenden Proteinen - stabiler Cluster.

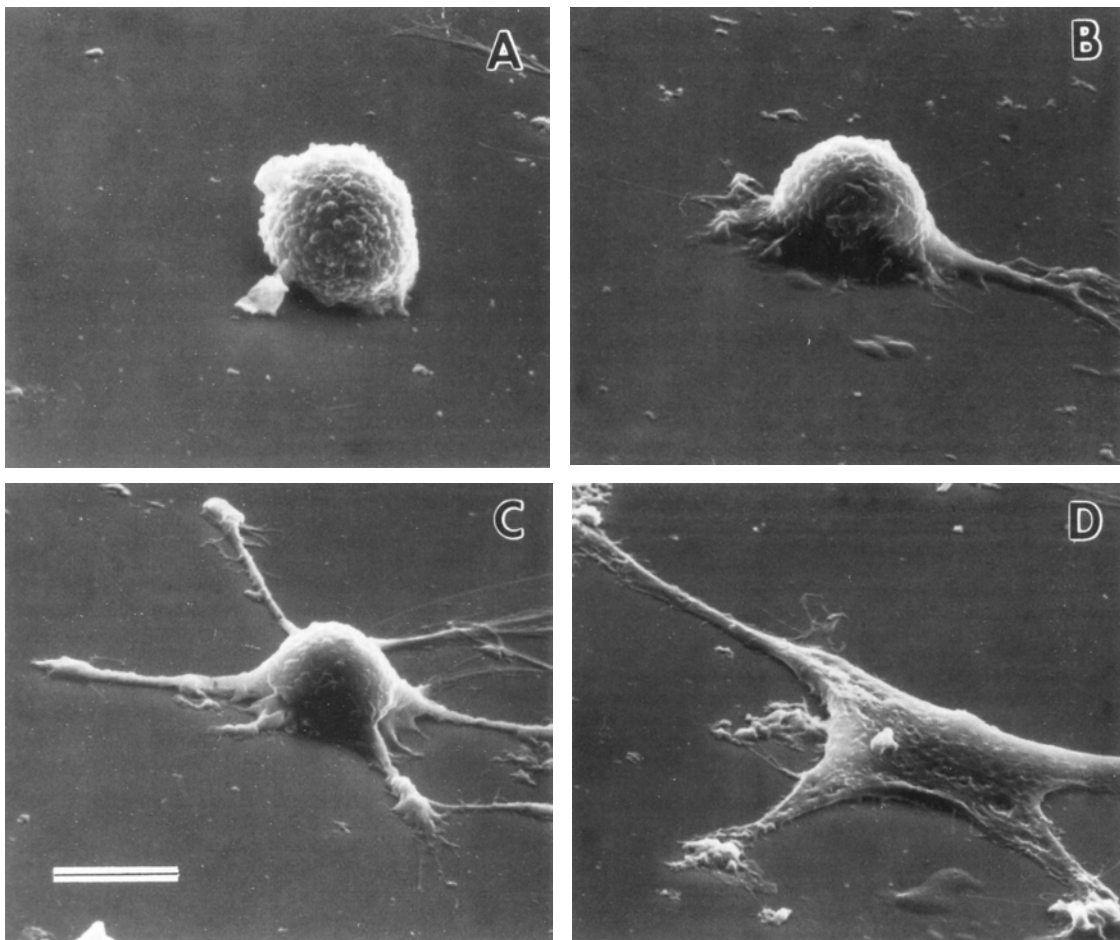


Abb. 8: Während des Adhäsionsvorgangs bildet die Zelle Ausläufer (Filopodien) und spreitet, bis sie flach auf dem Substrat aufliegt. In den Ausläufern finden sich u. a. Fokale Adhäsionskomplexe.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen adhätierender Fibroblasten, Balkenlänge 10 μm .^[122]

Inwieweit in Zellen Integrincluster durch direkten Kontakt der Integrine oder durch indirekten Kontakte (also über Adaptermoleküle in der Zellmembran oder Proteine des Cytoskeletts) gebildet werden ist nicht bekannt. Aus Deletionsstudien weiß man, dass

der cytosolischen Teil der β -Untereinheit zum Clustern benötigt wird.^[123] Chimären aus einer irrelevanten Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen $\beta 1$ -Domäne lokalisieren konstitutiv in FAs.^[123, 124] Mit intakten Integrinen verläuft die Lokalisierung nicht passiv, sondern zielgesteuert. So entscheidet die Phosphorylierung eines Serins darüber, ob sich $\beta 1$ -Integrine in Fokalen Adhäsionskomplexen oder in Podosomen (einer anderen Art von Matrixkontakt) befinden.^[118] Auch vom Zellinnern kann das Clustern von Integrinen ausgelöst werden, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen wenig bekannt sind.^[101, 118] *Inside-out-clustering* zur Erhöhung der Integrin-Avidität kann in Leukozyten in weniger als 0.1 Sekunden erfolgen!^[125] In diesem und in anderen beschriebenen Fällen^[126] wird Zelladhäsion durch geclusterte *nichtaktivierte* Integrine ausgelöst. Entsprechend wird in der aktuellen Forschung die Bedeutung der Bindungsavidität gegenüber der Bindungsaffinität in der Zelladhäsion neu bewertet.^[127, 128]

Der Abstand der Integrine in einem Integrincluster ist nicht bekannt. Man kann jedoch aus indirekten Messmethoden einen Minimalabstand von 6 nm und einen Maximalabstand von ca. 60 nm annehmen (Kap. 4.3)

Die Effekte des Integrinclusters sind: eine Steigerung von Ligandenbindungstärke und -geschwindigkeit,^[129, 130] Übertragung von Signalen, die von der monovalenten Ligandenbindung verschieden sind^[91] und Bildung von Fokalen Adhäsionskomplexen.^[131]

Fokale Adhäsionskomplexe (FA, auch *focal contacts* und *adhesion plaques*) sind eine spezielle Form der organisierten Zell-Matrixkontakte. Daneben kennt man noch Filopodien, Podosomen, Hemidesmosomen, Lamellen, *spikes*, *microspikes*, *ruffles*, *point contacts* und *fibrillar adhesions* (auch *focal complexes*).^[120, 131, 132]

Grundlage für FAs sind Cluster von Integrinen. In den Clustern finden sich verstärkt die „klassischen“ Integrine $\alpha 5\beta 1$, $\alpha IIb\beta 3$ und $\alpha v\beta 3$, aber auch die meisten anderen außer $\alpha 4\beta 1$.^[131, 133] Infolge der Clusterbildung werden die Integrine mit dem Cytoskelett der Zelle, den Actin-Fasern, über die Strukturproteine α -Actinin, Talin und Vinculin mit Hilfe von Paxillin, Vinculin und Tensin verknüpft (Abb.4).^[101] Dies wird über die kleinen Rho(Ras homologe)-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 organisiert, welche

heute als essenziell für die Bildung von Integrinclustern, *stress fibers* und FAs sowie Zellspreitung und Migration angesehen werden.^[101, 105, 116, 118, 134, 135]

Über Integrine in einem Cluster, aber auch über die Wechselwirkung der Integrine mit anderen Zellrezeptoren in FAs werden eine Vielzahl von *downstream*-Signalwegen aktiviert, z. B. Grb2/Ras/Raf/Mek/MAPK(=Erk), PI3K/Akt und Crk/Rac/MAPK (siehe auch im Anhang Kap. 9.1). Die von FAs ausgelösten Signalkaskaden sind u. a. wichtig für Zellproliferation (Fortschreiten im Zellzyklus) und Zellüberleben (Rast in der G1-Phase).^[116] Das Ausbleiben dieser Signale kann zur Apoptose führen (siehe folgendes Kapitel).

FAs brauchen zu Ausbildung des ausgereiften Phänotyps Zeit (ca. sechs Stunden), beständigen Nachschub von weiteren Integrinen (wahrscheinlich über einen Exocytose Mechanismus)^[136] und mechanische Krafteinwirkung, entweder internen Ursprungs durch Myosin oder von außen.^[105, 137] Unterbleibt diese Krafteinwirkung durch ein flexibles Substrat oder Inhibierung der Actin-Myosin-Kontraktilität, bilden sich z. B. auf Fibronectin kleinere Matrixkontakte, die *fibrillar adhesions*, die reich an $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinen und Tensin sind, aber weniger Phosphorylierung und kein Paxillin, Vinculin und keine *stress fibers* aufweisen.^[105, 137, 138]

Die *fibrillar adhesions*, also kleinere $\alpha 5 \beta 1$ -Cluster, können nach initialen Adhäsionsvorgängen aus den reifenden FAs (auf der Grundlage von $\alpha \nu \beta 3$ -Clustern) herausgezogen werden und gehorchen den zentripetalen Kräften der Zelle.^[120, 139] Wahrscheinlich ergibt sich daraus die Beobachtung, dass mit $\beta 1$ -GFP-Chimären angefärbte FAs in ruhenden Fibroblasten in Richtung Zellmitte wandern,^[139] während die $\alpha \nu \beta 3$ -basierenden FAs stationär bleiben.^[114, 120, 136]

In jüngerer Zeit wurde die Liste der Zell-Matrix-Kontakte um die sogenannten 3D-FAs erweitert. Diese wurden in Zellen in flexiblen dreidimensionalen ECM-Matrizes beobachtet. Sie unterscheiden sich deutlich von den FAs, die in Zellen auf starren zweidimensionalen Substraten gebildet werden, und zwar in Größe, Zusammensetzung und *downstream*-Ereignissen.^[101, 140, 141] Die 3D-FAs scheinen eine Zwischenstellung zwischen den *fibrillar adhesions* und den auf starren Substraten beobachteten „klassischen“ FAs einzunehmen: Der Phosphorylierungsgrad ist eher gering und $\beta 3$ -Integrine und FAK sind nur zu einem geringen Teil involviert, trotzdem

sind die üblichen Strukturproteine (Tensin, Paxillin, Vinculin und Actin) enthalten.^[140, 141]

Seit der Entdeckung der 3D-FAs wird die Relevanz der bisherigen Erkenntnisse über FAs auf starren, künstlichen Oberflächen grundsätzlich in Zweifel gezogen.^[140, 141] Man sollte dabei aber im Auge behalten, dass die 3D-FAs mit Fibroblasten, also Zellen ohne natürliche Polarität, in einer eher weichen Fibronectinmatrix untersucht wurden. Inwieweit diese Ergebnisse auf polarisierte Zellen, also Epithelzellen, Osteoblasten und verklumpte Blutplättchen in den entsprechenden Matrices übertragen werden können ist nicht bekannt.

In der jüngsten Zeit wird in der Literatur darauf hingewiesen, dass auch das Auflösen von FAs ein physiologisch wichtiger Vorgang ist.^[123, 142] Dies wurde stimuliert durch die Beobachtung, dass bestimmte ECM-Proteine die Auflösung von FAs und *stress fibers* bewirken: Tenascin-C über den Rezeptor Annexin II, Thrombospondin über Calreticulin und SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*) über einen unbekanntes Rezeptor.^[123, 142] Die gespreitete Zellform und ein gewisses Maß an Integrinclustern kann dabei erhalten bleiben.^[142] Diesem sogenannten *intermediate cell adhesion state* wird eine große Bedeutung für Morphogenese, Wundheilung und Migration zugemessen. Er wird weiterhin als Übergang in den nicht-adhären, Apoptose induzierenden Zustand interpretiert.^[142]

2.5 Integrine und Apoptose

Schon relativ früh war bekannt, dass Zellen, die normalerweise verankert wachsen, in Suspension in Apoptose übergehen, also den programmierten Zelltod erleiden.^[101, 143] Für diesen Vorgang wurde der Begriff Anoikis (griechisch ανοικος, heimatlos) geprägt. In Zellablösungsexperimenten und weiteren Studien konnten die zellverankernde Integrinbindung als Ursache für das Überleben bzw. deren Fehlen für das Absterben der Zelle identifiziert werden.

Das schlichte Anoikis-Modell muss heute allerdings erweitert werden, weil man Beispiele dafür kennt, dass adhärenente gespreitete Zellen absterben, weil nicht das richtige Integrin gebunden wird,^[144, 145] dass Zellen in Suspension durch multivalente

Integrinliganden überleben^[146] und dass adhärenzte Zellen trotz multivalenter Liganden wegen zu geringer Substratkontaktfläche in Apoptose übergehen.^[147]

Entsprechend den vielfältigen Möglichkeiten der Signalübertragung scheinen auch hier Integrine in unterschiedliche Mechanismen des Überlebens bzw. der Apoptose zell-spezifisch^[101] involviert zu sein. Ein zusammenhängendes Bild davon steht noch aus.

Grundsätzlich werden in adhärenzten Zellen über Integrine massiv Überlebenssignale übermittelt, welche die Zellen sogar vor cytotoxischen und sonstigen Apoptose-auslösenden Todes-Stimuli retten können.^[101, 148, 149, 150, 151] Dies erfolgt über die im

Zusammenhang mit FAs erwähnte Aktivierung verschiedener Signalwege, was u. a. die Inhibierung proapoptotischer Proteine und die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Flip und der Bcl-2- und IAP (*inhibitor of apoptosis*)-Familien zur Folge hat.^[152-154] Werden im Gegensatz dazu durch Integrine keine Überlebenssignale

übermittelt, fällt die Expression der antiapoptotischen Proteine weg und es werden pro-apoptotische Proteine aktiviert, z. B. Bax, Caspasen und Todesliganden.^[152, 154] In

jüngerer Zeit wurde für zwei apoptotische Signale spezielle Mechanismen vorgestellt: Das Bmf-Protein aus der Bcl-2-Familie assoziiert normalerweise mit dem Cytoskelett. Inhibierung der Aktinpolymerisation setzt Bmf frei und es überträgt gleichsam als Sensor der Zelladhäsion proapoptotische Signale in die Mitochondrien.^[101] Weiterhin

wurde gezeigt, dass β 1- und β 3-Integrine, die nicht an einen ECM-Liganden gebunden sind, direkt über eine cytoplasmatische Peptidsequenz Caspase-8 aktivieren und so Apoptose einleiten können (*unligation*-Theorie). Dieser *integrin-mediated death* (IMD) ist nicht an Anoikis gebunden und tritt auch in gespreiteten Zellen auf.^[145, 155]

Die Autoren machen allerdings keine Angaben, welche Eigenschaft des ungebundenen Integrins für den IMD verantwortlich ist. Denkbar wären fehlende Zugkräfte (von den Autoren angedeutet), strukturelle Effekte (z. B. durch Verbergen der Caspase-Aktivierungssequenz durch Konformationsänderung, Integrinclustern oder Rekrutierung weiterer Bindungspartner) oder fehlende andere integrinvermittelte Überlebenssignale (Phosphorylierung von FAK, Aktivierung von Akt, Rekrutierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Nutzung der antiapoptotischen Stimuli durch die im Adhäsionsmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren). Weiterhin werden endocytisierte Integrine im Zusammenhang mit dem IMD nicht erwähnt. Diese wären *per se* eine große Quelle von Integrinen ohne Kontakt zur ECM. Es gibt allerdings

Hinweise darauf, dass dabei Fibronectin und Vitronectin integrinvermittelt endocytiert werden können,^[114, 115] wodurch auch auf diese Weise Integrine einen gewissen Kontakt zu ECM-Liganden hätten.

Der *intermediate cell adhesion state* wird, auch wenn es hier nicht zur Ausbildung von *stress fibers* und der FA-Signalmaschinerie kommt, als antiapoptotischer Zustand angesehen. Anscheinend reichen die Stimuli der gespreiteten Zellform und eines mäßigen Integrinclustern aus, um das Überleben der Zelle zu gewährleisten. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Clustern von Integrinen, unabhängig von Aktivierung durch Ligandenbindung und Zellspreitung, FAK phosphoryliert und PI3-K/Akt und MAPK aktiviert wird.^[130, 156]

2.6 αv -Integrine

Die Integrine $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ sind für diese Arbeit von besonderem Interesse und werden im Folgenden näher beschrieben.

$\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrine zeigen wie die anderen αv -Integrine ein RGD-abhängiges Bindungsverhalten (vgl. Tabelle 1). Die $\beta 3$ - und die $\beta 5$ -Untereinheit weisen eine hohe Homologie zueinander auf und binden viele peptidische Liganden wie z. B. *cyclo(-RGDf[NMe]V-)* mit ähnlicher Affinität.^[78] In jüngerer Zeit wurden allerdings auch selektive nichtpeptidische Liganden für den jeweiligen Subtyp entwickelt.^[83] Unter den ECM-Liganden dieser Integrine bindet $\alpha v\beta 3$ bevorzugt an Osteopontin und $\alpha v\beta 5$ bevorzugt an Vitronectin, obwohl $\alpha v\beta 3$ historisch als Vitronectinrezeptor bezeichnet wird.

$\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrine werden von sehr vielen Zelltypen exprimiert: Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMCs), Osteoclasten, Osteoblasten, Chondrocyten, Blutplättchen, Macrophagen, Schwann-Zellen Oligodendrocyten und andere.^[6, 42, 157] Besonders hohe Level von $\alpha v\beta 3$ finden sich auf angiogenetischen Endothelzellen, aktivierten SMCs und Osteoclasten. $\alpha v\beta 5$ -Integrine können ebenfalls auf angiogenetischen Endothelzellen hochexprimiert sein und sind auch in Osteoblasten verstärkt zu finden.^[2, 158] Darüberhinaus wurden beide

Integrine auf zahlreichen Tumorzelllinien nachgewiesen.^[42] Besonders $\alpha v \beta 3$ ist vielfältig an physiologischen und pathologischen Adhäsions-, Migrations- und Apoptosevorgängen beteiligt und deshalb ein lohnendes *target* für die Pharmaindustrie, z. B. in den Bereichen Tumorwachstum,^[10, 11, 159] Thrombosen,^[3, 12] Arthritis,^[13] Retinopathie,^[14] akutem Nierenversagen^[17, 18] und Osteoporose.^[15, 16]

Die Rolle der αv Integrine in Zellmigration und Tumorgeschehen ist ausführlicher in Kap. 9.2 – 9.4 beschrieben.

2.7 Integrine im Knochenstoffwechsel

Knochen ist ein heterogenes Gewebe aus organischen und anorganischen Komponenten, hauptsächlich Collagen I und Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit (HA). Der HA im Organismus entspricht jedoch nicht der idealen Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, sondern ist eher ein Calcium-defizitärerer Hydroxylapatit (CDHA) mit Beimischung weiterer Kationen und Anionen: $(\text{Ca}, \text{X})_{10}(\text{PO}_4, \text{HPO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{Y})_2$, mit $\text{X} = \text{Mg}, \text{Sr}, \text{K}, \text{Na}$ und $\text{Y} = \text{Cl}, \text{F}$.^[160, 161] Kleinste Plättchen (ca. $50 \times 25 \times 4 \text{ nm}^3$) aus CDHA sind geordnet in ca. $20 \mu\text{m}$ lange Collagenfasern eingebettet, die ihrerseits zu noch größeren Strukturen versponnen sind.^[161-163] Dies erklärt die hohe mechanische Stabilität des Knochens bei gleichzeitiger Elastizität; man spricht auch von einem „Verbundwerkstoff“.^[164]

Vitaler Knochen unterliegt einem permanenten Umbau durch knochenaufbauende Osteoblasten und knochenabbauende Osteoclasten. Osteoclasten degradieren dabei die organischen und anorganischen Knochenbestandteile durch Sekretion von proteolytischen Enzymen und Salzsäure. Der Mechanismus des Knochenaufbaus durch Osteoblasten, insbesondere der Bildung der CDHA-Plättchen ist noch nicht geklärt.^[161] Das menschliche Skelett wird durch diesen Umbau alle 20 - 30 Jahre komplett erneuert. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und abbau kann zum Knochenschwund (Osteoporose) führen, bedingt z. B. durch Bewegungsmangel, Calciummangel oder durch einen verringerten Östrogenspiegel nach dem Klimakterium.^[165-167]

Integrinbasierende Zelladhäsion spielt beim Knochenumbau eine wichtige Rolle. Osteoclasten exprimieren hauptsächlich die Integrine $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$ und in hohem Maße $\alpha \nu\beta 3$.^[168-170] Zelladhäsion über das Integrin $\alpha \nu\beta 3$ an RGD-haltige Knochenmatrixproteine, wie Osteopontin (Bone Sialo Protein I) oder Bone Sialo Protein (Bone Sialo Protein II),^[171] ist notwendig für die katabolische Aktivität der Osteoblasten.^[152, 172] *In vitro* konnte durch RGD-haltige synthetische Peptide und $\alpha \nu\beta 3$ -selektive Antikörper der Knochenabbau erfolgreich inhibiert werden.^[173] Mit dem $\beta 3$ -selektiven Disintegrin Echistatin^[174] und einem von der Firma *Smith Kline Beecham Pharmaceuticals* entwickelten nichtpeptidischen $\alpha \nu\beta 3$ - und $\alpha \nu\beta 5$ -selektiven Integrinantagonisten^[80] konnte auch *in vivo* in einem Rattenmodell die Knochenresorption unterdrückt werden.^[79, 175]

In einem dazu konträren Ansatz werden RGD-Peptide auf Oberflächen immobilisiert und als Agonisten der ECM genutzt, um eine verbesserte Knochenbildung und einen besseren Kontakt von Knochenimplantaten mit dem umgebenden Gewebe zu erreichen (Abb. 9).

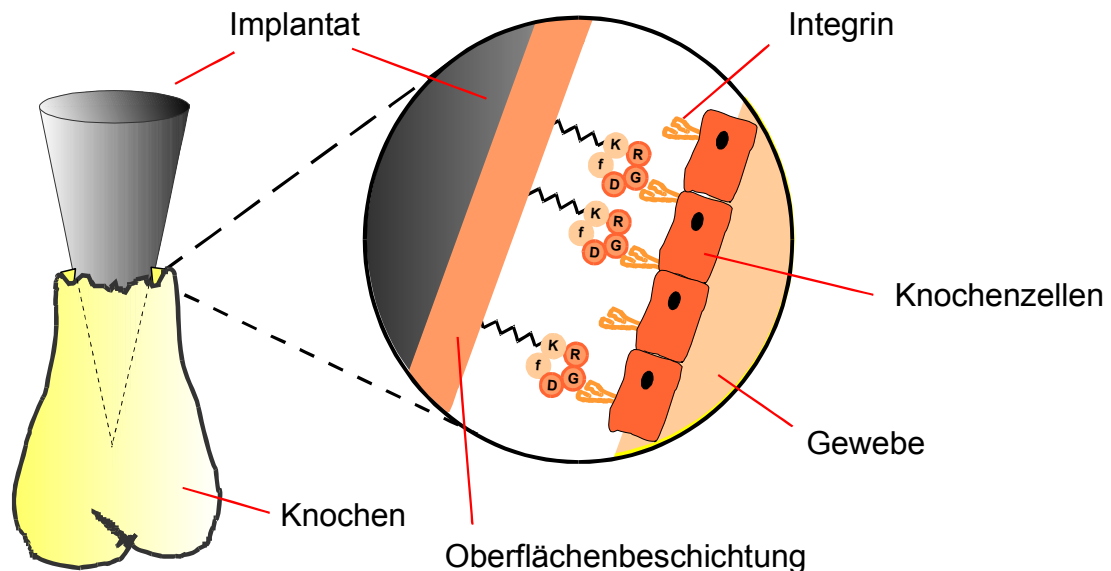


Abb. 9: Auf Implantatoberflächen immobilisierte RGD-Peptide stimulieren als Agonisten der ECM Zelladhäsion und stellen so einen engen Kontakt zwischen Implantat und Knochengewebe her.

Primäre Osteoblasten exprimieren hauptsächlich hohe Level von $\alpha 3\beta 1$ -, $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha v\beta 5$ Integrinen und veränderliche Level von $\alpha v\beta 3$ und anderen Integrinen.^[2, 176-178] Mithilfe dieser Integrine und anderer Zelloberflächenproteoglykane adhäreren sie bevorzugt an die natürlichen Knochenproteine Fibronectin, Osteopontin und BSP und in geringerem Maße an Collagen I.^[179, 180]

In vitro konnte die Adhäsion von Osteoblasten an künstliche Oberflächen durch eine Oberflächenfunktionalisierung mit RGD-Peptiden in zahlreichen Fällen erzielt werden.^[2, 57] Über welche Integrine die Osteoblastenadhäsion an künstliche Oberflächen stattfindet ist noch wenig untersucht; in einigen Fällen wurde von einer dominanten Rolle des $\alpha v\beta 3$ -Integrins berichtet.^[180, 181] Auf einer RGD-beschichteten PMMA-Oberfläche konnte über eine erfolgreichen Stimulierung der Zelladhäsion hinaus noch die Proliferation der Osteoblasten angeregt werden (Produktion von Alkaline Phosphatase und Collagen I).^[2]

Inzwischen konnte auch *in vivo* eine erfolgreiche Knochenintegration eines PMMA-Formkörpers durch RGD-Beschichtung nachgewiesen werden (Kap. 4.6).^[2] Der der verbesserten Integration zu Grunde liegende Mechanismus ist noch nicht geklärt und wahrscheinlich komplizierter als die relativ einfache Situation der *in vitro*-Adhäsionsstudien. Durch die RGD-Peptide der PMMA-Oberfläche sind, neben einer verbesserten Zelladhäsion von Osteoblasten, veränderte Zelladhäsions-, Zellmigrations und Oberflächenenerkennungsprozesse unterschiedlicher Zellen – Osteoblasten, Osteoclasten, Macrophagen, Epithelzellen, Lymphocyten, Fibroblasten sowie deren Progenitorzellen bis hin zu mesenchymalen und hämatopoietischen Stammzellen – denkbar.^[182-185]

3 Biomaterialien

In der Chirurgie steht man häufig vor dem Problem, körpereigenes Gewebe mit Hilfe von Prothesen und Implantaten aus körperfremden Materialien mechanisch verstärken oder ersetzen zu müssen. Diese Materialien können natürlichen oder künstlichen Ursprungs sein und werden allgemein als Biomaterialien bezeichnet. Sie sind definiert als Materialien für eine Anwendung in einem biologischen System. In großem Maßstab kommen heute künstliche Hüftgelenke, Kniegelenke, Knochenschienen, Schrauben, Nahtmaterial, Zähne, Zahnfüllungen, Linsen, Stents und Herzklappen zum Einsatz. Weiterhin werden körperfremde Materialien in der plastischen Chirurgie, als Trägersysteme für Wirkstoffe und in ersten Fällen bereits als Organersatz (z. B. künstliche Haut) verwendet.^[162]

Idealerweise heilt dabei das Biomaterial ohne Fremdkörperreaktion gut ein, übernimmt zunächst die mechanische Funktion des geschädigten Gewebes, unterstützt den Regenerationsprozess des Körpers und löst sich schließlich in dem Maße auf, wie körpereigenes Gewebe die Funktion wieder übernehmen kann. Ähnlich hohe Ansprüche an Materialien werden beim *Tissue Engineering* gestellt. Hier soll zunächst außerhalb des Körpers körpereigenes Gewebe in einer künstlichen Matrix herangezüchtet werden, welches anschließend in der Körper implantiert wird. Die Matrix soll dabei Struktur und mechanischen Halt geben, weiterhin die Funktion und Regeneration des Ersatzgewebes stimulieren und sich im Körper allmählich abbauen.^[186]

Bis vor wenigen Jahrzehnten war die medizinische Verwendung von Materialien, die ursprünglich einem anderen Zweck dienten, noch die Regel, z. B. die Entwicklung eines künstlichen Herzen aus einem Polyurethan, das ursprünglich in Damenwäsche eingesetzt wurde.^[187] Heute stehen für die Chirurgie zwar speziell entwickelte Biomaterialien zur Verfügung, das ideale Biomaterial ist allerdings auch heute noch eine Idee, die lediglich in Ansätzen verwirklicht ist. Grund dafür ist, dass die künstlichen Materialien dabei je nach Anwendung komplexen maßgeschneiderten mechanischen, physikochemischen, chemischen und biologischen Anforderungen gerecht werden müssen.

Das Material für eine künstliche Hüfte (Femurschaft) sollte beispielsweise eine hohe mechanische Belastbarkeit und Steifigkeit aufweisen und sich in der Hüftpfanne möglichst abriebarm bewegen. Materialien für Stents dagegen müssen eine hohe Rückstellkraft besitzen, um das Offenhalten von Adern zu gewährleisten, gleichzeitig aber auch elastisch genug sein, um Verformungen des Gefäßes zu tolerieren.^[162]

In den chemischen Eigenschaften sollten die permanenten Implantate möglichst inert sein und keine toxischen Inhaltsstoffe freisetzen. Hier tritt im Bereich der Hüftprothesen ein Dilemma auf, weil das mechanisch günstigste Material, eine Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierung potenziell toxische und allergieauslösende Ionen freisetzt.^[188] Andere Biomaterialien sollen im Körper abbaubar sein, z. B. bei kleineren Knochendefekten, chirurgischem Nahtmaterial und Schrauben. Der Abbau sollte dabei einer Kinetik gehorchen, dass z. B. Schrauben in dem Maße resorbiert werden, wie die mechanische Belastbarkeit eines geschienten Knochens wieder zunimmt. Die Abbauprodukte sollten dabei wiederum nicht toxisch sein und evtl. sogar eine definierte Konzentration von Wirkstoffen freisetzen.

Die wichtigste biologische Anforderung an Biomaterialien besteht zunächst darin, an der Grenzfläche zum natürlichen Gewebe eine geringe Fremdkörperreaktion hervorzurufen und einen engen Kontakt zum Gewebe herzustellen. Eine Fremdkörperreaktion kann Thrombosen, Entzündungen und Einkapselung des Implantats bewirken. Eine bindegewebige Kapsel wiederum geht mit dem Risiko des schlechten Gewebekontakts, lokalen Gewebeverlusts, der aseptischen Lockerung und einer erhöhten Infektionsgefahr einher, weil das Immunsystem an dieser Stelle nur eingeschränkt wirken kann.

Je nach Art des Gewebekontakts kann man Biomaterialien in drei Klassen einteilen: **Bioinerte Materialien**, die nicht toxisch sind, aber mit dem umgebenden Gewebe nur schwach wechselwirken, **biokompatible Materialien**, bei denen eine gewisse stabilisierende Wechselwirkung mit dem Gewebe eintritt und **bioaktive Materialien**, die den Gewebekontakt und die Heilung aktiv fördern.^[162] In welche Kategorie ein Biomaterial fällt wird in der wenige nm dicken Grenzschicht des Biomaterial/Gewebe-Interface entschieden.^[189, 190] Die Prozesse im Interface sind noch nicht vollständig verstanden; folgende Komponenten sind dabei von Bedeutung:^[191, 192]

- Adsorption von Proteinen an die Biomaterialoberfläche sowie deren Struktur (geringe oder starke Denaturierung, Fragmentierung)^[160, 193-195]
- Redoxprozesse an der Oberfläche^[196]
- Elution von Molekülen oder Ionen des Biomaterials
- Anheftung von Zellen der Immunantwort, des Bindegewebes und des ortsspezifischen Gewebes, welche wiederum Signalstoffe, Matrixproteine und gewebespezifisches Material sekretieren
- Mikromechanischer Kontakt zwischen Biomaterial und Gewebe

Es gibt intensive Bemühungen, bioinerten Materialien durch Oberflächenmodifikation in biokompatible bzw. bioaktiven Materialien umzuwandeln. Dazu gibt es prinzipiell drei Methoden: physikochemische, morphologische und biochemische.^[197] Im Bereich der **physikochemischen Methoden** werden z. B. Oberflächenladung, Oberflächenenergie und Oberflächenzusammensetzung verändert um Proteinadsorption und Zelladhäsion zu verbessern.^[160, 191, 198, 199] Die **Oberflächenmorphologie** beeinflusst insbesondere im Bereich der Knochenimplantate die Zelladhäsion und Zellproliferation^[160] und kann auch eine mechanische Verzahnung mit dem Knochengewebe bewirken.^[160, 191] **Biochemische Modifikation** ist die Funktionalisierung der Oberfläche mit bioaktiven Molekülen und nutzt die Kenntnisse der biochemischen Forschung, um mit einer Biomaterialoberfläche eine zell- und gewebespezifische Reaktion zu erzielen. Dies kann z. B. durch Modifikation der Oberflächen mit Hormonen oder Wachstumsfaktoren geschehen.^[191, 200-206] Eine weitere attraktive Methode ist die Beschichtung der Oberflächen mit zelladhäsiven Proteinen und Peptiden. Dadurch kann ein direkter funktionaler Material-Gewebekontakt hergestellt werden. Entzündungsreaktionen, fibröse Einkapselung sowie deren negative Folgen können dadurch vermieden werden.^[2]

Zelladhäsive Peptide haben gegenüber den zelladhäsiven Proteinen verschiedene Vorteile aufzuweisen: Sie besitzen ein geringeres immunogenes Potenzial,^[57] lassen sich einfacher und kostengünstiger herstellen, charakterisieren, sterilisieren und lagern und sie tolerieren einen größeren Temperatur- und pH-Bereich.^[207] Für länger andauernde Anwendungen lässt sich der enzymatische Abbau von Peptiden durch die

Verwendung von D-Aminosäuren, cyclischen Peptiden und Peptidomimetika verringern.^[2, 195]

Von den kleinen peptidischen Zelladhäsionssequenzen ist die RGD-Sequenz die wichtigste und am häufigsten eingesetzte.^[57] Das spiegelt ihre weite Verbreitung im Organismus, ihre Fähigkeit mehrere Integrine anzusprechen und ihre Effektivität, *in vitro* Zelladhäsion und -überleben zu stimulieren wider. Daneben kommen in letzter Zeit auch andere Zelladhäsionssequenzen zum Einsatz.^[57]

In den folgenden Kapiteln werden zunächst verschiedene relevante Biomaterialien vorgestellt und anschließend ihre Funktionalisierung mit zelladhäsiven RGD-Peptiden beschrieben.

3.1 Metalle

Wegen ihrer hohen mechanischen Stabilität und Belastbarkeit werden Metalle vor allem als lasttragender Knochenersatz bei Endoprothesen eingesetzt. Der Femurteil der ersten künstliche Hüfte – 1938 von *Philipp Wiles* implantiert – bestand aus rostfreiem Stahl.^[208] Dieses Material wird heute allerdings wegen seiner schlechten Korrosionseigenschaften im Körper nur noch für temporäre Implantate verwendet.^[209] Als nicht-korrodierendes Metall mit den günstigsten mechanischen Eigenschaften kommt heute eine Kobalt-Chrom-Molybdän(CoCrMo)-Legierung für Femurimplantate zum Einsatz.^[188] Da aus der passivierenden Oberflächen-Oxidschicht langsam Metallionen diffundieren, die Allergie- und Immunreaktionen auslösen können, wird die CoCrMo-Legierung immer häufiger durch Titan ersetzt.^[209] Titan gilt heute als verträglichstes Metall mit dem geringsten Allergiepotezial und der höchsten Biokompatibilität.^[196, 209, 210] Daher, und auch aufgrund seines leichten Gewichts (etwa die Hälfte von Stahl) bei gleichzeitig relativ guter Beständigkeit, ist es eines der am meisten verwendeten Implantatmaterialien.^[193, 210] Die biologische Verträglichkeit beruht auf einer passivierenden TiO₂-Schicht auf der Implantatoberfläche, welche sich bei einer Zerstörung sehr schnell wieder erneuert.^[210] Die Wechselwirkung des Gewebes mit der

Titanoxidschicht findet nicht direkt, sondern über Proteine statt, welche daran adsorbieren.^[211, 212] Die Menge der an Titan adsorbierten Proteine scheint dabei höher zu sein als auf andere Metalloberflächen und nur einen geringen Denaturierungsgrad aufzuweisen.^[213, 214] Über diese Proteinschicht kommt es zu einem engen Knochenkontakt mit Abständen bis zu 30 Å und zu einer mechanisch stabilen Osteointegration.^[196, 215] Durch Aufrauung und damit Vergrößerung der Oberfläche des Titanimplantats (z. B. durch Sandstrahlen, Säureätzen oder Aufsintern von Titanpulver)^[216-219] soll die Menge der adsorbierten Proteine und der adhärenierten Zellen erhöht und auch eine mechanische Verzahnung mit dem Knochen erreicht werden.^[188, 220] Weitere Verbesserungen in der Gewebeintegration lassen sich durch Beschichten mit Calciumphosphat erzielen.^[221, 222] Letzteres wird inzwischen in der Medizin als Standard bei Zahnimplantaten und nichtzementierten Hüften eingesetzt.^[161, 162] Weitere Modifikationen von Titan wie z. B. verschiedene Legierungen und ihre Verwendungen als Biomaterial sind im Anhang, Kap. 9.6 beschrieben. Gold hat außer als Zahnfüllung keine Bedeutung als Implantatmaterial. Wichtig ist Gold als Modelloberfläche, die sich leicht strukturieren und mit Biomolekülen funktionalisieren lässt.

3.2 Calciumphosphat-Materialien

Knochendefekte, wie sie z. B. bei Knochentumoren und -cysten oder komplizierten Brüchen entstehen, müssen mit einem geeignetem Material aufgefüllt werden, da sich im Defekt sonst nur ein bindegewebiger Ersatz mit ungenügender Stabilität bildet. Goldener Standard ist z. Zt. autologer spongiöser Knochen aus dem Beckenkamm, welcher gut einheilt und im allgemeinen Knochenstoffwechsel umgebaut wird.^[223] Autologer Knochen steht allerdings oft nicht im ausreichenden Maß zur Verfügung. Als geeignetstes synthetisches Material gelten derzeit Keramiken aus Calciumphosphat.^[161, 223, 224] Das liegt auch vom chemischen Standpunkt nahe, da dieses der anorganischen Komponente im Knochen ähnlich ist. Besonders Materialien auf der Grundlage der Modifikationen Hydroxylapatit (HA) und β -Tricalciumphosphat (β -TC)

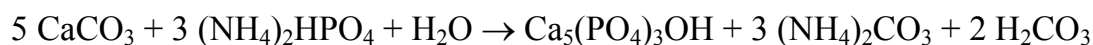
mit einem Ca/P-Verhältnis von 1.5-1.67 werden ohne Ausbildung einer fibrösen Kapsel gut in den Knochen integriert und gelten als biokompatibel und bioaktiv.^[223] Sie wirken im Knochen als Schiene, an der er entlang wachsen kann (Osteokonduktivität); eine Stimulierung des Knochenwachstums (Osteoinduktivität) findet nicht statt.

Von der Medizin werden folgende Anforderungen an die ideale Calciumphosphat-Keramik gestellt:^[161]

- interkonnektierende Poren von einigen 100 µm zum Einwachsen der Knochenzellen
- schnelles und zuverlässiges Einwachsen des Knochens
- Abbaubarkeit zwischen einigen Monaten bis 2 Jahren
- mechanische Stabilität
- gute Verarbeitbarkeit und operationstechnische Handhabung

Bisher existiert noch keine Keramik, die diesen Ansprüchen genügt, es gibt aber bereits eine Vielzahl interessanter Ansätze und Materialien, welche z. T. auch bereits kommerziell erhältlich sind.

Die erwünschte Porosität besitzen einige Materialien auf natürlicher Basis, z. B. calcinierter Rinderknochen (*Endobon*®, *Pyrost*®) oder das durch Thermalbehandlung in HA überführte CaCO₃-Gerüst von Korallen oder Kalkalgen (*Biocoral*®, *Interpore*®):^[162]



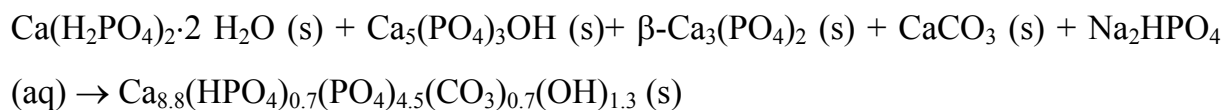
Beide Materialien erhaltenen Systeme interkonnektierender Poren, welche das sichere Einwachsen dieser Materialien in den Knochen auch *in vivo* bewirken.^[225]

Der Nachteil dieser Keramiken liegt in ihrem hohen Gehalt von HA, welches im Körper sehr langsam resorbiert wird und deshalb als biologisch nicht abbaubar gilt.^[223, 226] Der Umbau der Ersatzmaterialien in aktiven Knochen ist aber notwendig, damit der Knochen die benötigte entsprechende Belastungsstabilität aufbauen kann.^[227]

Die andere zur Verfügung stehende Calciumphosphat-Modifikation β-TC wird ebensogut wie HA in den Knochen eingebaut, allerdings ist die mechanische Stabilität von β-TC zu gering und dessen Resorption verläuft sehr schnell, was evtl. zu einer entzündlichen und in der Folge nur bindegewebigen Reaktion bei der Knochen-

neubildung führen kann.^[223] Als Alternative gelten Mischphasen aus HA und β -TC. Vielversprechende Ergebnisse zeigt z. B. eine nach einem Sol-Gel-Verfahren hergestellte nanoporöse Keramik aus Calciumphosphat mit einer HA/ β -TC-Verhältnis von 1.5. Durch die niedrigen Temperaturen im Herstellungsprozess tritt bei diesem Material keine Sinterung und Umwandlung des β -TC in HA ein. Es wächst gut in den Knochen ein und sein Abbau ist nach acht Monaten weit fortgeschritten.^[228]

Andere Materialien sind Knochenzemente auf Calciumphosphat-Basis (*Norian SRS*®, *Biocement D*®). Diese können als Paste eingebracht werden und härten dann angepasst an die Struktur des Defekts aus. Sie bestehen üblicherweise aus einer Mischung fester Calciumphosphate, die mit einer Natriumphosphatlösung angerührt werden müssen, um die Ausfällung einer CDHA-Phase zu erreichen (stöchiometrisch nicht ausgeglichen).^[162]



Die Resorption der heute verfügbaren Knochenzemente verläuft allerdings aufgrund der fehlenden Porosität meist zu langsam.^[229, 230]

Seit einigen Jahren gibt es Versuche zur Entwicklung von Knochenersatzmaterialien, welche der Compositstruktur des natürlichen Knochens nachempfunden sind. Vorgeschlagen wurden natürliche Proteine wie Kollagenfasern, Osteonectin oder modifizierte Stärke, auf denen Hydroxylapatit abgeschieden wird oder die mit Calciumphosphaten vermischt werden,^[231, 232] künstliche Polymere mit HA- und TC-Füllung,^[233, 234] Calciumphosphate mit eingelagerten Polylactid-Kügelchen^[235] sowie mineralisierte Nanofasern aus selbstorganisierten Tensidmolekülen.^[236, 237]

Der biologische Grundlage der guten Osteointegration der Calciumphosphat-Materialien *in vivo* ist noch nicht bekannt, wahrscheinlich spielen wiederum Oberflächenprozesse wie die Adsorption von Proteinen eine entscheidende Rolle. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass auf HA-Oberflächen größere Menge von Proteinen adsorbiert werden als auf Metalloberflächen wie z. B. Titan.^[238, 239] Eine Denaturierung der Proteine findet wahrscheinlich nur in geringem Maße statt, so dass diese

Materialien als körperlähnlich erkannt werden und ohne entzündliche Reaktionen einwachsen können (siehe auch Anhang Kap. 9.7).^[214, 238]

Die positiven Effekte des HA-Gewebekontakts werden inzwischen in großem Maßstab auch für Metallimplantate nutzbar gemacht, indem diese mit Calciumphosphat beschichtet werden.^[161]

In manchen Fällen werden auch Knochenersatzmaterialien aus natürlicher Koralle verwendet. Das Kalkgerüst der Koralle (CaCO_3) ist biokompatibel und osteokunduktiv, wird aber nicht resorbiert.^[240] Bekannt wurde ein Fall, in dem ein Formteil aus Koralle, welches *in vitro* mit autologen Knochenzellen besiedelt wurde, als Ersatz für einen zerstörten Daumenknochen verwendet wurde.^[241] Diese Verfahren wurde allerdings als medizinisch unsinnig kritisiert.^[242]

3.3 Polymere

Aufgrund ihrer guten mechanischen Eigenschaften (Biege- und Druckbelastbarkeit, Form- und Verarbeitbarkeit) wird heute eine große Zahl unterschiedlicher Polymere als Implantatmaterial verwendet.^[187] Die mechanischen Eigenschaften lassen sich dabei durch die Wahl von Monomer, Polymerisationsgrad, Vernetzungsgrad, Taktizität, Massenverteilung, Additiven und Copolymeren weitgehend maßschneidern. Man kann Polymere in zwei Klassen einteilen, nämlich die biostabilen und die bioabbaubaren. Biostabile Polymere sind z. B. ultrahochmolekulares Polyethylen (UHMWPE) für künstliche Hüftgelenkspfannen^[162] sowie Polyethylenterphthalat (PET), Polytetrafluoethylen (PTFE), Polyurethan (PU) und Polyvinylchlorid (PVC) welche als Gefäß- und Bänder-Ersatz und z. T. auch in künstlichen Herzklappen verwendet werden.^[162, 243, 244] Weiterhin zählen zu den biostabilen Polymeren Polyamide, welche als Nahtmaterialien, künstliche Sehnen und Bänder verwendet werden^[208] sowie verschiedene Silicone mit einem Einsatzspektrum von Gefäßersatz über künstliche Haut und Linsen bis hin zu ästhetischen Chirurgie.^[245, 246] Polymethylmethacrylat (PMMA) kommt besonders als Knochenzement bei Gelenkimplantaten und als sogenanntem HTR(*hard tissue replacement*)-Material in der ästhetischen Chirurgie zur

Anwendung.^[247] Die Biostabilität der Polymeren im Körper ist nicht als absolut zu betrachten, da viele dieser Materialien auf längere Sicht zumindest an der Oberfläche angegriffen werden. Polyethersegmente können dabei in α -Position zum Ether-sauerstoff oxidiert werden.^[248, 249] Polyamide, PU und PET werden langsam hydrolysiert.^[208, 250]

Im Gegensatz dazu gibt es die bioabbaubaren Polymere, welche im Körper kontrolliert (meist hydrolytisch) abgebaut und verstoffwechselt werden sollen. Der Vorteil von bioabbaubaren chirurgischen Nahtmaterialien, Netzen, Klemmen und Schrauben besteht darin, dass man auf die Folgeoperation zur Entfernung dieser Hilfsmittel verzichten kann. Außerdem wird das sich neu bildende Gewebe in dem Maß, wie das Biomaterial abgebaut wird, mit mechanischer Belastung trainiert. Polymere, die im Körper unter physiologischen Bedingungen hydrolysiert werden können, sind: **Polyester, Polyaminosäuren, Polyanhydride und Polyphosphazene.**^[223]

Der wichtigste bioabbaubare Polymertyp sind die Polyester aus den Hydroxycarbonsäuren Polymilchsäure (PLA, auch Polylactid) und Polyglycolsäure (PGA, auch Polyglycolid). Sie lassen sich durch ringöffnende Polymerisation von cyclischem Dilactid bzw. Diglycolid^[251] und durch Festkörperreaktion^[186] darstellen (Abb. 10).

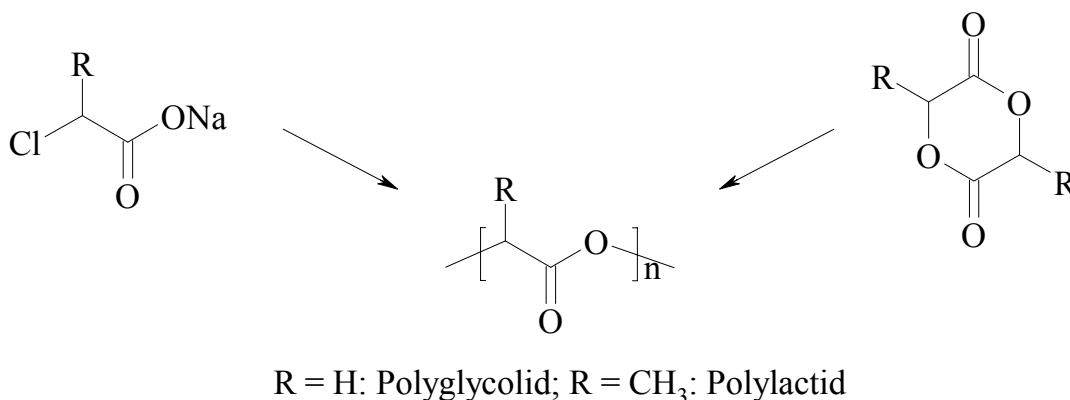


Abb. 10: Darstellung von PGA und PLA durch Festkörperreaktion (links) oder ringöffnende Polymerisation (rechts).

Durch den gezielten Einsatz der Milchsäure-Enantiomere lassen sich die physikalischen Eigenschaften des Polymers beeinflussen: Poly-L-lactid (PLLA) liegt teilweise kristallin vor und ist relativ hart und spröde, Poly DL-lactid ist amorph und

biegsam.^[208] Durch die Wahl enantiomerenreiner, racemischer oder meso-Dilactide bzw. deren Mischungsverhältnisse lassen sich (Co-)Polymere mit unterschiedlicher mechanischer Stabilität und Abbaubarkeit herstellen.

Resorbierbares Nahtmaterial wurde erstmals 1970 von *American Cyanamid Co.* auf den Markt gebracht. Sie bestanden aus PGA und halten ihre Festigkeit 7-11 Tage, also für einfache Wundverschlüsse gerade ausreichend lange.^[187] Die chirurgischen Nahtmaterialien bestehen heute meist aus Copolymeren unterschiedlicher Hydroxycarbonsäuren und Carbonate, z. B. PGA, PLLA, PLA, ϵ -Caprolacton und Trimethylencarbonat.^[208]

Beim hydrolytischen Abbau der Polyester nimmt das Material zunächst Wasser auf, anschließend werden Oligomere freigesetzt, welche dann enzymatisch oder hydrolytisch in die monomeren Hydroxycarbonsäuren zerlegt werden.^[252] Werden diese nicht schnell genug abgeführt, sinkt der lokalen pH-Wert, was zu einer unkontrollierten autokatalytische verstärkten Hydrolyse der Polymere und zu entzündlichen Reaktionen führen kann. Bei Bruchoperationen werden z. B. keine abbaubaren Fäden verwendet, da wegen der freigesetzten Säuren weniger stabiles Narbengewebe gebildet wird. Im Falle von Knochenimplantaten besteht sogar die Gefahr der Osteolyse, also des säureinduzierten Abbaus des Knochen-HAs. Diese unerwünschten Effekte treten zwar nur bei einer geringen Zahl von Fällen auf, haben aber einem breiten Einsatz dieser Materialien bisher entgegengestanden.^[162] Durch die Verwendung anderer, bisher noch nicht verwendeter Hydroxycarbonsäuren versucht man den Abbau dieser Polyester besser kontrollieren zu können.^[253]

Die Bedeutung der resorbierbare Polyamide, Polyanhydride und Polyphosphazene, ist in der Medizin (noch) gering.^[187]

Außer als Stützmaterial werden abbaubare Polymere noch als bioaktive Gerüstsubstanz im *Tissue Engineering*^[186] und als Wirkstoffträger eingesetzt. Letztere können in den Organismus implantiert werden und setzen lokal einen in das Polymer eingebrachten Wirkstoff frei.^[254] Die Geschwindigkeit der Freisetzung lässt sich durch die Hydrolyserate des Polymers einstellen.^[186]

Polymere stellen bestenfalls bioinerte Materialien dar und ihre Gewebeintegration ist allgemein schlecht. Meist kommt es im Organismus zunächst zur Ausbildung einer Schicht denaturierter adsorbierter Proteine an der Polymeroberfläche.^[254, 255] Die

dadurch angelockten Macrophagen können diese Situation durch Phagozytose nicht klären und reagieren darauf, indem sie in einer entzündlichen Reaktion den Fremdkörper mit einer fibrösen Kapsel umgeben, womit die Grundlage für aseptische Lockerung, lokalen Gewebeverlust und Infektionen gelegt wird.^[2, 187, 256, 257] Das Risiko einer Infektion an einem PMMA-Implantat ist demzufolge z. B. gegenüber einer Titanoberfläche wesentlich erhöht.^[258] Eine verbesserte Gewebeintegration der Polymere kann nur durch die Verringerung der unerwünschten Wechselwirkungen („*non-fouling*“-Oberflächen) und die Förderung erwünschter Wechselwirkungen erreicht werden. Oberflächen mit verringerter Proteinadsorption können u. a. durch eine Beschichtung oder Copolymerisation mit PEG erzeugt werden.^[180, 259-261] Warum PEG-Moleküle Protein-abweisend sind, ist noch nicht geklärt, diskutiert wird die Ausbildung einer fest gebundenen oder strukturierte Wassergrenzschicht an helikal oder unstrukturiert angeordneten PEG-Ketten.^[254, 261]

Für die Fälle, in denen Gewebeintegration erwünscht ist, kann die Polymeroberfläche mit zelladhäsiven Komponenten funktionalisiert werden (Kap.4.6).

3.4 Glas

Glas als Biomaterial („Bioglas“) ist in den letzten Jahren wieder verstärkt in den wissenschaftlichen Fokus gerückt.^[262] Es wird als Füllmaterial für Knochendefekte^[263] und in der plastischen Chirurgie eingesetzt.^[264] Im letzteren Fall ist die fehlende biologische Abbaubarkeit ein gewünschtes Merkmal, da z. B. Konturierungsoperationen im Nasenbereich einen dauerhaften Effekt erzielen sollen, der bei bioabbaubaren Implantatmaterialien oft nicht gegeben ist.^[264] Der *in vitro* erzielte Zellkontakt von Endothelzellen an glasartigen Keramiken ist schlechter als z. B. an Titan.^[265] Jedoch zeigen insbesondere neuere Glaskeramiken („bioaktive Gläser“) verbesserte Proteinadsorptionseigenschaften.^[266, 267]

4 Funktionalisierung von Biomaterialien mit RGD-Peptiden

Über die Oberflächenfunktionalisierung mit RGD-Peptiden gibt es eine nahezu unüberschaubare Zahl von Veröffentlichungen. Verschiedenste Materialien wurden mit verschiedenen RGD-Peptiden für unterschiedliche Zwecke funktionalisiert um die Gewebeintegration von Implantaten zu verbessern, Matrices zum *Tissue Engineering* zu erhalten, Sensorchips und Zellkulturträger zu entwickeln, Mechanismen der Zelladhäsion auf Modelloberflächen zu studieren sowie um allgemein zu zeigen, dass sich bestimmte Materialien als Biomaterialien eignen.^[57]

Im Folgenden wird auf die RGD-Funktionalisierung wichtiger (Bio-)Materialien näher eingegangen.

4.1 Glas

Glas wird zur Funktionalisierung üblicherweise zunächst mit Alkyltrialkoxysilanen beschichtet. Die Alkoxygruppen des Silans werden durch die Hydroxylgruppen der Glasoberfläche substituiert, wodurch das Silan fest auf der Glasoberfläche haftet (Abb. 11).

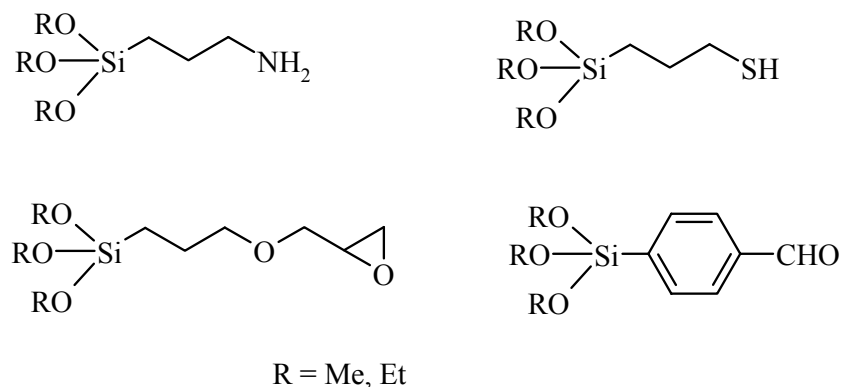


Abb. 11: *Verschiedene Trialkoxyalkylsilane zur Funktionalisierung von Glasoberflächen. Die Alkoxygruppen werden durch Hydroxylgruppen der Glasoberfläche substituiert; über die funktionelle Gruppe des Alkylrests können RGD-Peptide angeknüpft werden.*

Über eine funktionelle Gruppe im Alkylrest können dann Peptide chemisch angeknüpft werden. Durch die große Verbreitung der auf Glas basierenden DNA-Chiptechnologie stehen heute Alkyltrialkoxysilane mit nahezu jeder beliebigen funktionellen Gruppe zur Verfügung.^[268]

In einer Pionierarbeit beschrieben *Massia et al.* 1991 die Funktionalisierung einer Glasoberfläche mit GRGDY und die dadurch stimulierte Adhäsion von Fibroblasten.^[122] Gemäß Abb. 11 wurde zunächst auf die Glasoberfläche ein Alkylsilan mit einer Abgangsgruppe aufgebracht, welche dann durch den Aminoterminus des Peptids substituiert wurde. Durch die Variation der Peptidmenge wurden Oberflächen mit unterschiedlichem Peptidgehalt und damit einem bestimmten durchschnittlichen Peptidabstand generiert. Die Fibroblasten spreiten je nach Peptidmenge unterschiedlich stark und bilden entsprechend mehr oder weniger ausgebildete *stress-fibers* und FAs, welche durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht wurden. Durch Verwendung von Integrin-Antikörpern wurde nachgewiesen, dass hier die Adhäsion durch das Integrin $\alpha\beta3$ vermittelt wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ab einem durchschnittlichen Peptid-Peptid-Abstand von < 440 nm (1 fmol/cm²) Zellspreitung stattfindet, während zur Bildung von FAs der durchschnittliche Abstand nicht größer als 140 nm (10 fmol/cm²) sein darf. Diese Werte werden in der Literatur stets als Referenzwerte angegeben, wobei sie auf einem angenommenen gleichförmigen Verteilung der RGD-Peptide beruhen, welche nicht nachgewiesen wurde.

Auch andere Zellen, z. B. Endothelzellen, Blutplättchen und Osteoblasten konnten nach ähnlichen Verfahren an Glas adhärirt werden.^[269, 270] Glas wird hauptsächlich als Modelloberfläche eingesetzt, die einfach zu funktionalisieren und mit dem Mikroskop zu analysieren ist.

4.2 Proteine

Ähnlich wie Glas dienen Proteinoberflächen antiadhäsiver Proteine, z. B. BSA (*bovine serum albumin*) oder OVA (Ovalbumin) als Modelloberflächen. Die Proteine können einfach an verschiedene Oberflächen, z. B. Glas oder Polystyrol (Petrischalen, *well*

plates) adsorbiert werden und nach einem gängigen Verfahren über einen heterobifunktionellen Linker mit einem RGD-Peptid mit Thiolgruppe funktionalisiert werden (Abb. 12).

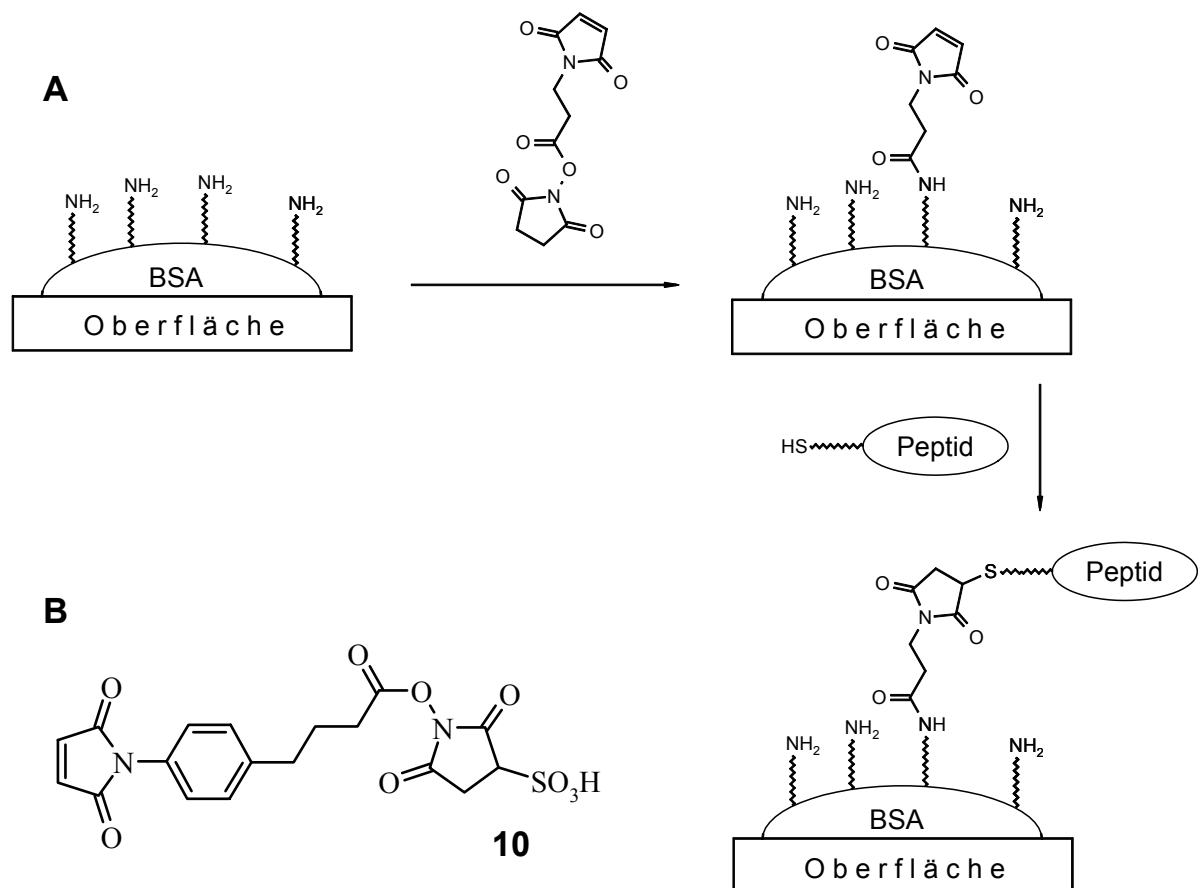


Abb. 12: **A** Verfahren zur Funktionalisierung von Proteinen z. B. BSA mit Peptiden. Die Proteine werden zuerst mit einem heterobifunktionellen linker, einem Maleinimidocarbonsäure-NHS(N-Hydroxysuccinimid)-Aktivester derivatisiert. An die immobilisierten Maleinimidofunktionen können thiofunktionalisierte Peptide durch Michaeladdition kovalent binden. **B** Der häufig eingesetzte wasserlösliche Linker Sulfo-SMPB® (Sulfosuccinimidyl-4-[p-maleinimidophenyl]-butyrat, Pierce) (**10**).

Mit dem $\alpha\beta 3$ -Integrin-selektiven *cyclo*(-RGDfK-) (**9**), das mit 3-Mercaptopropionsäure zum 3-Mercaptopropionyl-*cyclo*(-RGDfK-) (**11**), derivatisiert wurde, konnten so hohe Zelladhäsionsraten verschiedener Osteoblastenlinien an BSA erzielt werden (Abb. 13).^[2]

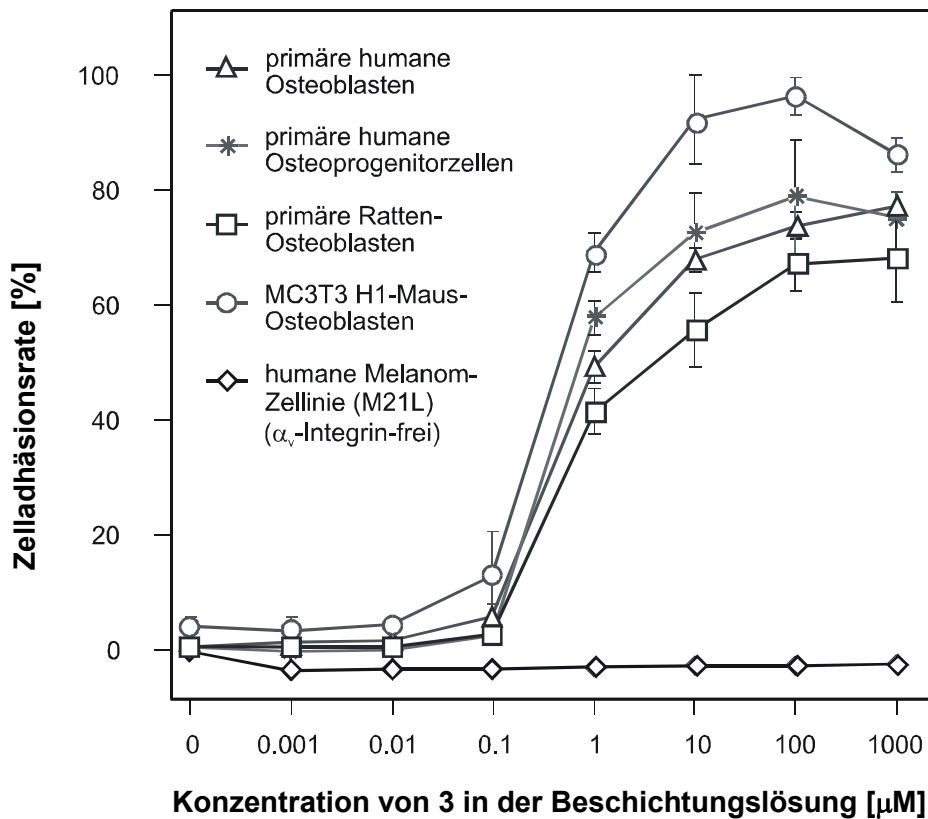


Abb. 13: Konzentrationsabhängige Adhäsion verschiedener Osteoblasten- und einer Kontrollzelllinie an BSA-Oberflächen. Das BSA wurde über den Linker **10** mit 3-Mercaptopropionyl-cyclo(-RGDfK-) (**11**) funktionalisiert. Die Zelladhäsionsrate beschreibt den Anteil der adhärenierten Zellen im Verhältnis zur Menge der eingesetzten Zellen. Die Zelllinie M21L exprimiert die α_v -Untereinheit nur schwach und kann somit nicht über α_v -Integrine an die RGD-funktionalisierte Oberfläche adhären. Diese Negativkontrolle beweist die dominante Rolle der α_v -Integrine bei der Zelladhäsion in diesem System.

An zelladhäsiven Biomaterialien auf der Grundlage von Proteinen und natürlichen Polymeren auf Kohlenhydrat-Basis besteht wegen deren biologischer Abbaubarkeit ein gewisses kommerzielles Interesse. So werden z. B. RGD-beschichtetes Collagen^[271] oder RGD-funktionalisierte Seide^[272] als Knochenersatzmaterial untersucht. Hyaluronsäure, welche mit einem RGD-Peptid mit Polyargininanker über elektrostatische Wechselwirkungen funktionalisiert ist, ist als Komponente einer kommerziell erhältlichen künstlichen Haut im klinischen Einsatz.^[273]

4.3 Gold

Gold wird üblicherweise mit Molekülen, die eine Thiolankergruppe tragen beschichtet. Der Mechanismus der Anbindung des Thiols an die Goldoberfläche ist noch nicht geklärt,^[274] die Gold-Schwefel-Anbindung ist jedoch ausreichend stabil für eine Beschichtung.^[275] So konnte z. B. das Peptid GRGDS über einen *Thiolinker* auf Oligoethylenglycolbasis auf einer Goldoberfläche immobilisiert werden und die Adhäsion von Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren.^[276, 277] Durch die Beschichtung einer Goldoberfläche mit Molekülen, die sich in einer monomolekularen Schicht organisieren (*self assembled monolayer*, SAM) lassen sich Oberflächenbeschichtungen mit definierten zelladhäsiven Eigenschaften erzeugen: In der Arbeitsgruppe um *Whitesides* wurden zunächst SAMs mit antiadhäsiven PEG-Alkylthiolen hergestellt. Durch die Zugabe von GRGDS-PEG-Alkylthiolen konnte mit steigender Konzentration von RGD-Verbindung ein Übergang von schwach angehefteten bis hin zu gespreiteten Zellen beobachtet werden.^[277] Sind die GRGDS-PEG-Alkylthiole kürzer als die umgebenden PEG-Alkylthiole, ist die RGD-Sequenz für die Zelle nicht erreichbar und es findet keine Adhäsion mehr statt.^[278]

Exakte Erkenntnisse über den Einfluss der lateralen Verteilung von RGD-Peptiden auf die Zelladhäsion lieferten vor kurzem nanostrukturierte Oberflächen, wie sie z. B. an der Universität Heidelberg in der Arbeitsgruppe von *Prof. Spatz* (Universität Heidelberg) hergestellt werden.^[279] Dort konnte – nach vorläufigen Ergebnissen – gezeigt werden, dass die Adhäsion von Osteoblasten und die Ausbildung von FAs bei einem RGD-Abstand von 58 nm noch möglich ist, bei einem Abstand von 85 nm dagegen kaum noch realisiert werden kann (Abb. 14).^[280] Der hier bestimmte kritische Abstand von ca. 60 nm ist viel kleiner als der von *Massia* bestimmte Abstand von 140 nm.^[122] Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Abstand von 140 nm lediglich ein statistisches Mittel über eine Oberfläche darstellt, die wahrscheinlich auch Bereiche enthält, in denen die RGD-Abstände kleiner sind.

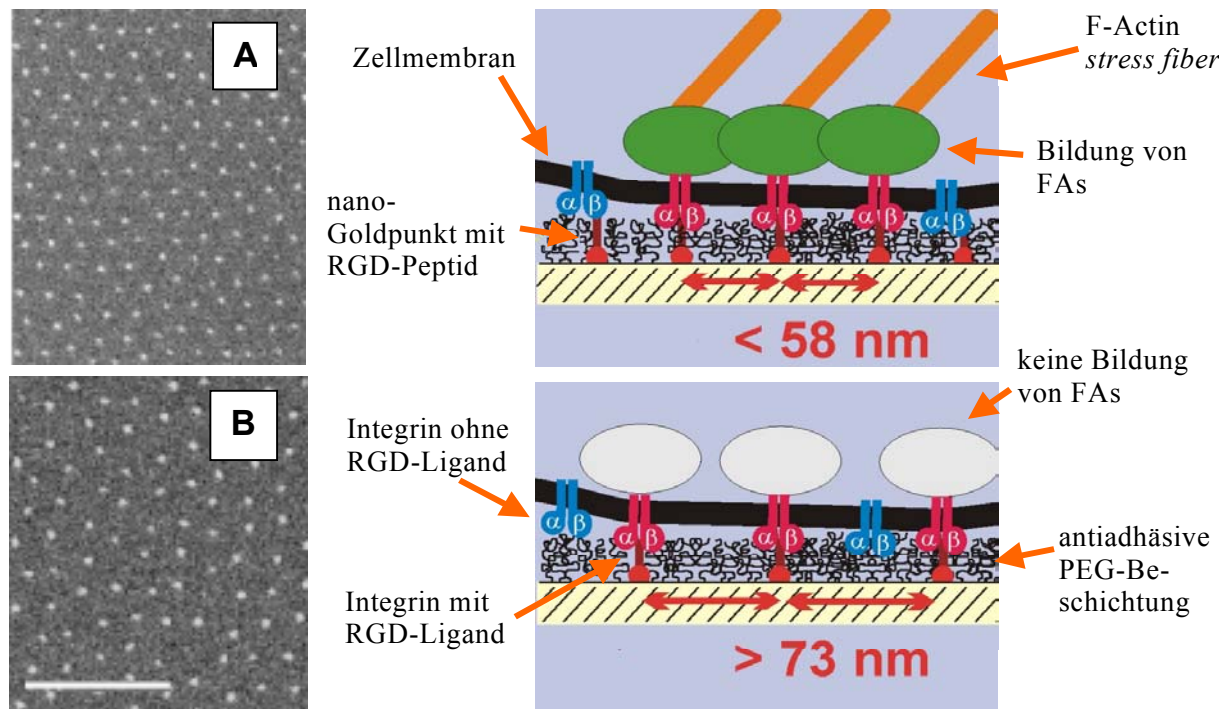
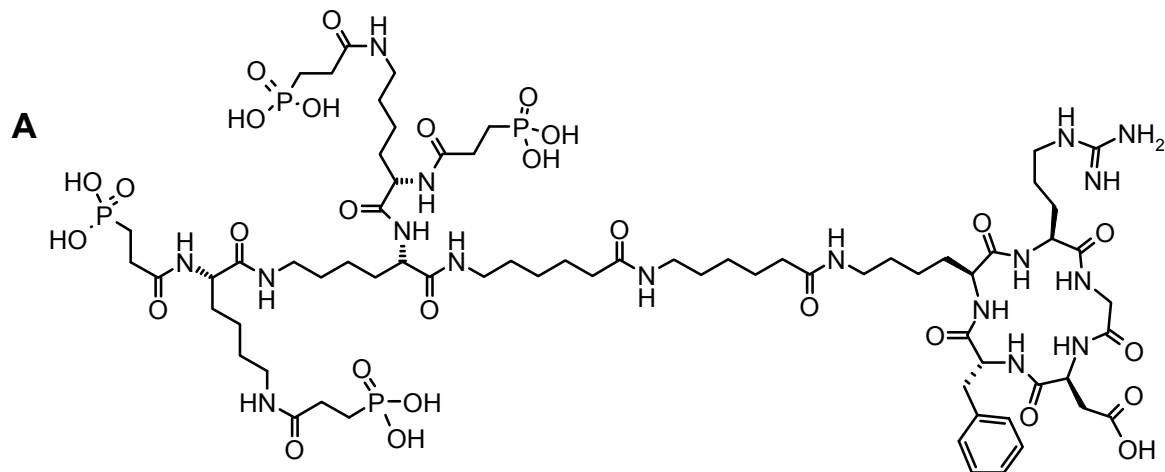


Abb. 14: Nanostrukturierte Glasoberflächen mit gleichförmig verteilten ca. 5-6 nm großen Goldpunkten. Die Goldpunkte können mit RGD-Peptiden beschichtet werden. Wegen der geringen Größe der Goldpunkte bindet wahrscheinlich nur ein Integrin pro Goldpunkt. **A** Laterale Abstände der Goldpunkte ≤ 58 nm. Der Abstand der Integrine untereinander erlaubt die Ausbildung von FAs und Zelladhäsion. **B** Laterale Abstände der Goldpunkte ≥ 73 nm. Der Abstand der Integrine untereinander ist zu groß für die Ausbildung von FAs und Zelladhäsion. Balkenlänge 300 nm.

4.4 Calciumphosphat

Die Anbindung von RGD-Peptiden an Calciumphosphate kann, analog zur Anbindung von natürlichen Proteinen im Organismus, über Cluster von sauren Aminosäureseitenketten erfolgen, also Glutamat, Aspartat, γ -Carboxyglutamat, Phosphoserin und Phosphothreonin.^[281, 282] Fujisawa *et al.* erzielten eine verstärkte Adhäsion von Osteoblasten an HA-Pulver und -Plättchen durch eine Beschichtung mit E₇PRGDT.^[224, 282] Dieses Peptid wird von den Autoren als eine „Chimäre“ aus einer Hexaglutamat-

sequenz und EPRGDT, jeweils aus BSP, bezeichnet. In einem analogen Ansatz wurde aus Calciumphosphat-bindendem Statherin und zelladhäsivem Osteopontin eine Chimäre mit folgender Sequenz synthetisiert: D \oplus S \oplus SEEKFLRRIGRFG(Statherin)-LPGRGDS(Osteopontin) (\oplus S = Phosphoserin). Dieses Fusionspeptid induziert die Adhäsion von Mo α_v Melanomzellen an HA.^[283]



Phosphonatpeptid [(Ppr)₂-Lys]₂-Lys-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) **12**

Ppr = 3-Phosphonopropionsäure

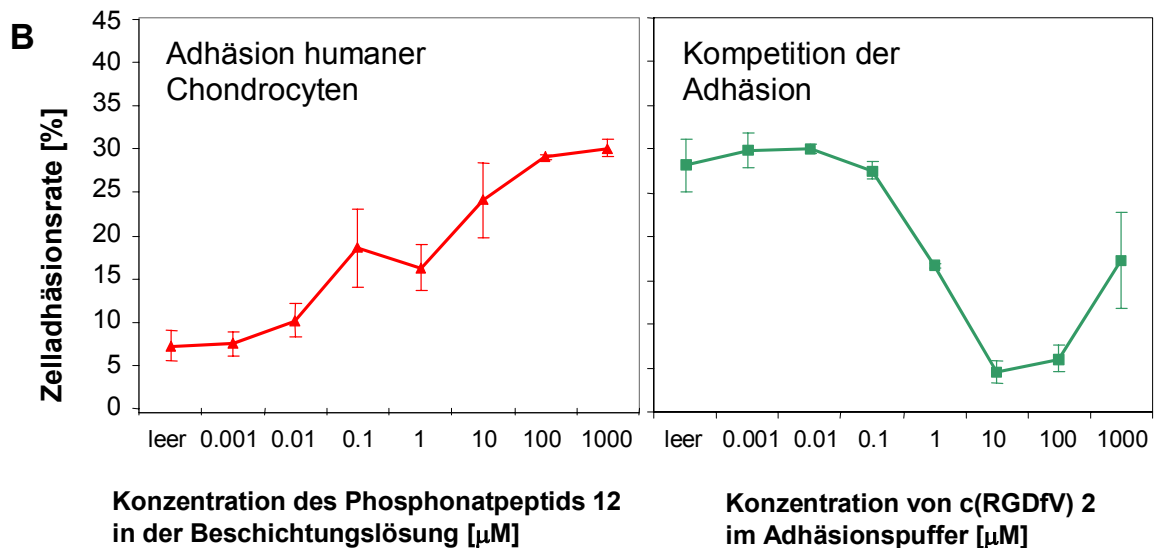


Abb. 15: **A** Das Phosphonatpeptid **12** bestehend aus RGD-Cyclopeptid, Ahx-spacer und Tetraphosphonatanker. **B** Adhäsion humaner Chondrocyten an eine mit **12** beschichtete Calciumphosphatoberfläche. Durch das lösliche RGD-Peptid **2** im Adhäsionspuffer kann die Zelladhäsion konzentrationsabhängig inhibiert werden.

Es konnte auch gezeigt werden, dass Peptide mit unnatürlichen, sauren Gruppen, z. B. Oligomere aus 2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, auf HA verankert werden können. Davon ausgehend wurde von *M. Kantlehner* ein *cyclo(-RGDfK-)*-Peptid mit Tetraphosphonatanker synthetisiert. Das Phosphonatpeptid **12** konnte *in vitro* die Adhäsion von Osteoblasten und Chondrocyten an einen Calciumphosphat-Knochenzement stimulieren (Abb. 15).^[284-286]

In-vivo-Untersuchungen von RGD-beschichteten Calciumphosphatmaterialien sind noch nicht beschrieben. Es ist zu erwarten, dass die RGD-Peptide die Osteokonduktivität dieser Materialien steigern und die Gewebeintegration beschleunigen werden. *In vitro* wurde durch das E₇RGDT-Peptid die Abscheidung von Calciumphosphatpartikeln (sog. *nodules*) und die Produktion von ECM-Molekülen durch Osteoblasten auf HA verstärkt.^[224] Die Adhäsion von Osteoclasten an Calciumphosphatoberflächen wurde bisher kaum untersucht.^[287] Aufgrund der langsamen Resorption vieler kommerzieller HA-Materialien wird der Osteoclastenadhäsion zunehmend eine größere Bedeutung zugemessen.^[256, 287] Immobilisierte RGD-Peptide könnten hier einen entscheidenden Beitrag leisten (vgl. Kap. 2.4).

4.5 Titan

Titanoberflächen haben eine gewisse Affinität zu Thiolen^[288] und weisen nach Beschichtung mit RGD-Thiolpeptiden eine leicht verstärkte Zelladhäsion auf (Kap. 6.6.2). Titan lässt sich auch analog zu Glas mit Alkoxysilanen funktionalisieren.^[289] Die Alkoxygruppen des Silans werden dabei durch Hydroxygruppen an der Metalloxydoberfläche substituiert. Über eine Aminogruppe des Silans wurde so mittels Maleinimidocarbonsäure-NHS-*linker* das Peptidfragment CGNGEPRGDTYNAY (aus BSP) angebunden. Dadurch konnte in serumfreiem Medium die Anhaftung und Spreitung von Osteoblasten auf Titan gesteigert werden.^[290] Eine nach der selben Methode mit GRGDSPYG₅C funktionalisierte Titanoberfläche stimulierte Knochenzellen zu höherer Produktion von ECM-Molekülen und Osteoclasten-Differenzierungsfaktoren.^[291]

Weiterhin eignet sich auch die Phosphonatgruppe als Anker auf Titanoberflächen. Mit dem RGD-Peptid **12** (Tetraphosphonat-Anker) konnte bei *Merck Biomaterial* die Adhäsion von Osteoblasten an Titan von 20 % auf 40 % gesteigert werden.^[292]

Analog zur Beschichtung mit funktionalisierten Alkoxysilanen wurde auch kürzlich ein neues Verfahren zur Titanbeschichtung mit funktionalisierten Phosphonaten vorgestellt.^[293] An auf der Titanoberfläche immobilisierte Phosphonatmoleküle mit Aminogruppe in der Seitenkette wurden über einen Maleinimidocarbonsäure-NHS-*linker* RGD-Peptide angebunden und so die Adhäsion von Osteoblasten an die Titanoberfläche stimuliert.^[293]

Eine weitere Technik zur Funktionalisierung von Titanoberflächen ist die Abscheidung und der Einbau von phosphat- und phosphonathaltigen Peptiden auf einer anodisch erzeugten Titandioxidschicht. Nach diesem Verfahren wurden von *Bernhardt et al.* TiAl6V4-Stifte mit dem obengenannten Phosphonatpeptid beschichtet. In Tierversuchen wurde um diese Titanstifte eine verstärkte Knochenneubildung nachgewiesen.^[294]

4.6 Polymere

Für die Anbindung von RGD-Peptiden an Polymere müssen in den meisten Fällen zunächst funktionelle Gruppen auf der Polymeroberfläche erzeugt werden. Dafür stehen verschiedene chemische und physikalische Verfahren zur Verfügung.^[57] Die funktionellen Gruppen können jedoch auch durch Verwendung von Monomeren mit funktionellen Gruppen in der Seitenkette eingeführt werden, z. B. bei der Copolymerisation von Dilactid mit einem analogen cyclischen Heterodimer aus Milchsäure und Lysin.^[57]

Die RGD-Peptide werden üblicherweise über den Aminoterminus des ungeschützten RGD-Peptids mit den unterschiedlichen funktionellen Gruppen nach einer von vielen möglichen Kupplungsmethoden an das Polymer angebunden (Abb. 16). Oft erfolgt die Kupplung im wässrigen bei neutralem pH-Wert an einen voraktivierten C-Terminus der Polymeroberfläche. Unter diesen Bedingungen liegt die Guanidgruppe des Arginins protoniert vor und ist weniger reaktiv als eine Amino-Gruppe; es werden also

keine Schutzgruppen für die Seitenketten der Aminosäuren benötigt. Für eine ausführliche Übersicht der bisher mit RGD funktionalisierten Polymere, der verschiedenen Verfahren zur Erzeugung funktioneller Gruppen auf Polymeren zur RGD-Immobilisierung und der verschiedenen Kupplungsmethoden zur Anbindung der RGD-Peptide sei auf die im Rahmen dieser Arbeit verfasste Publikation hingewiesen.^[57]

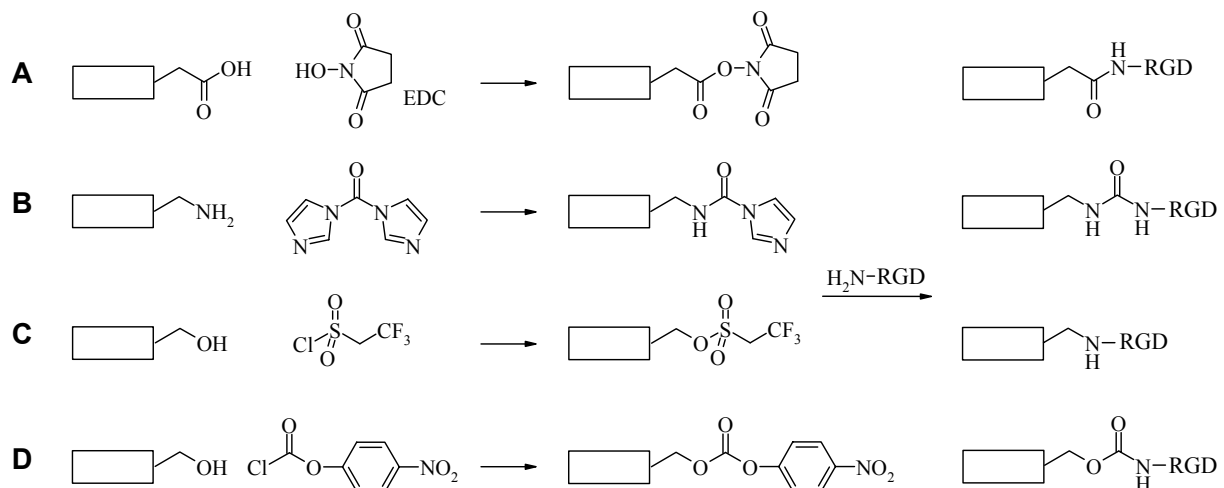


Abb. 16: Der N-Terminus der RGD-Peptide kann mit verschiedenen funktionellen Gruppen auf Polymeroberflächen reagieren, wenn diese aktiviert vorliegen:

A Carboxylgruppen, aktiviert als NHS-Ester; **B** Aminogruppen, voraktiviert mit CDI (Carbonyldiimidazol); **C** Hydroxylgruppen, aktiviert als Tresylat (2,2,2-Trifluorsulfonat); **D** Hydroxygruppen, voraktiviert mit *p*-Nitrophenyl-chloroformiat.

Neben den klassischen Kupplungsmethoden werden auch verschiedenen Methoden der chemoselektiven Ligationen zur Immobilisierung von RGD-Peptiden verwendet. Bei dieser Art der Anbindung reagieren Paare funktioneller Gruppen spezifisch miteinander (Abb. 17). Der Vorteil dabei ist, dass man kein Kupplungsreagenz braucht, die Kupplung unter milden Bedingungen verläuft und ebenfalls auf Schutzgruppen im Peptid verzichtet werden kann.^[57]

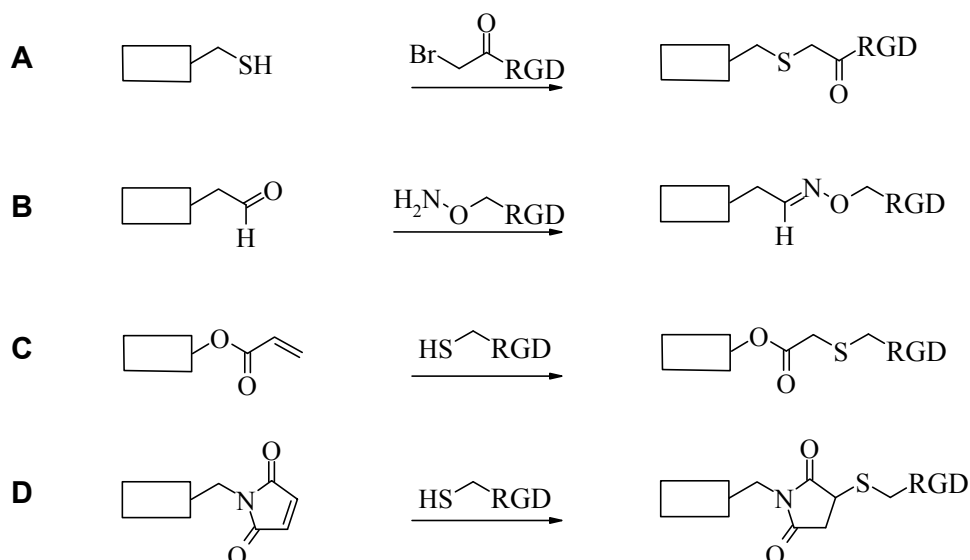


Abb. 17: Paare funktioneller Gruppen für die chemoselektive Ligation. **A** Thiol und Bromoacetyl-RGD; **B** Aldehyd und Aminoxy-RGD; **C** Acrylat und Thiol-RGD. **D** Maleinimid und Thiol-RGD.

Neben der Erzeugung und Aktivierung funktioneller Gruppen auf Polymeroberflächen können Aktivester-Acrylate oder sogar RGD-Acrylate als Monomerbaustein in das Material einpolymerisiert werden.^[295, 296] Nach letzterem Verfahren erzeugte Hydrogele auf der Basis von N-(2-Hydroxypropyl)-methacrylamid mit einpolymerisiertem AcryloylGGRGD wurden bereits in Tierversuchen (Ratte) getestet. Es konnte gezeigt werden, dass durch dieses Hydrogel Zelladhäsion, -infiltration und die Geweberegeneration von Nervengewebe im Vergleich zu nicht-RGD-funktionalisiertem Hydrogel gesteigert werden kann.^[255, 297]

In Zusammenarbeit mit *Merck Biomaterial* wurde PMMA mit von *M. Kantlehner* und *D. Finsinger* synthetisierten *cyclo*(-RGDfK-)-Peptiden mit Acrylatanker beschichtet. Während das Peptid mit dem kürzeren Linker, Acryl-Ahx-*cyclo*(-RGDfK-) **13**, keinen Effekt auf die Zelladhäsion hat, stimuliert das längere Peptid Acryl-Ahx-Ahx-*cyclo*(-RGDfK-) **14** die Adhäsion von Osteoblasten *in vitro* (Abb. 18).^[2]

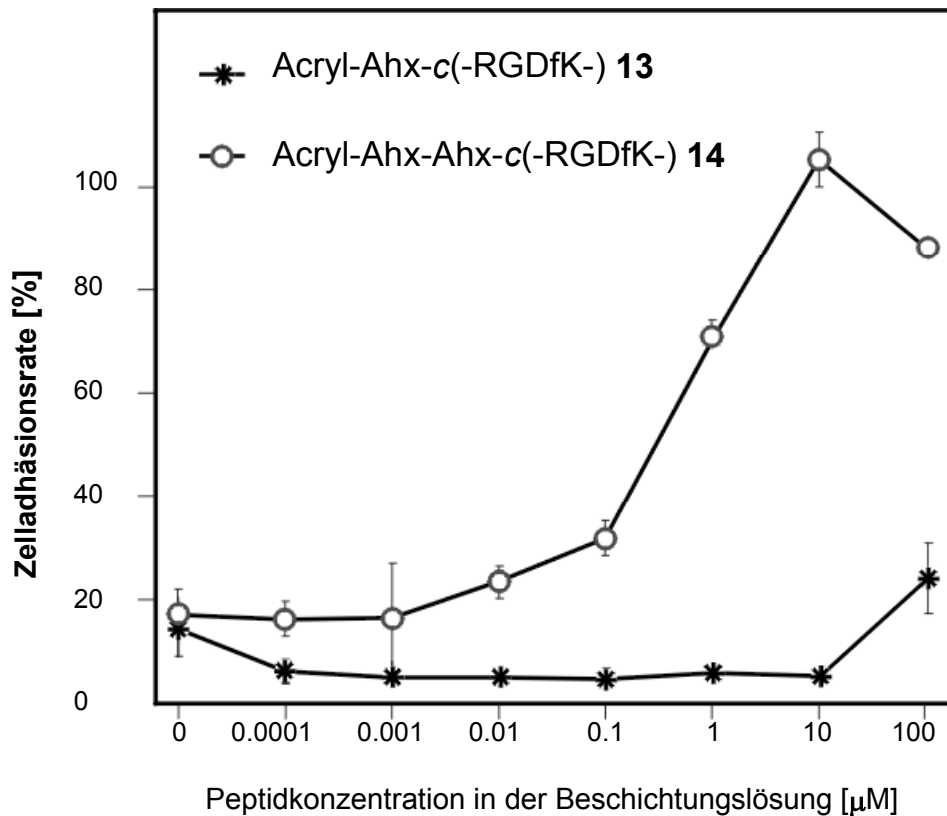


Abb. 18: Das längere Acrylamidpeptid **14** stimuliert die Adhäsion von Osteoblasten auf PMMA, während das kürzere Peptid **13** dazu nicht in der Lage ist.

Neben der erfolgreichen Stimulierung der Zelladhäsion wurde durch die RGD-Beschichtung darüberhinaus noch die Proliferation der Osteoblasten (Alkaline Phosphatase, Collagen I-Produktion) angeregt.^[2] *In vivo* (Kaninchen) wies ein mit **14** beschichteter PMMA-Formkörper einen direkten Kontakt zwischen Knochengewebe und Implantatoberfläche auf (Abb. 19 A). Im Gegensatz dazu bildete sich zwischen einer unbeschichteten PMMA-Oberfläche und dem Knochen eine deutliche, fibröse Zwischenschicht (Abb. 19 B).^[2, 298, 299]

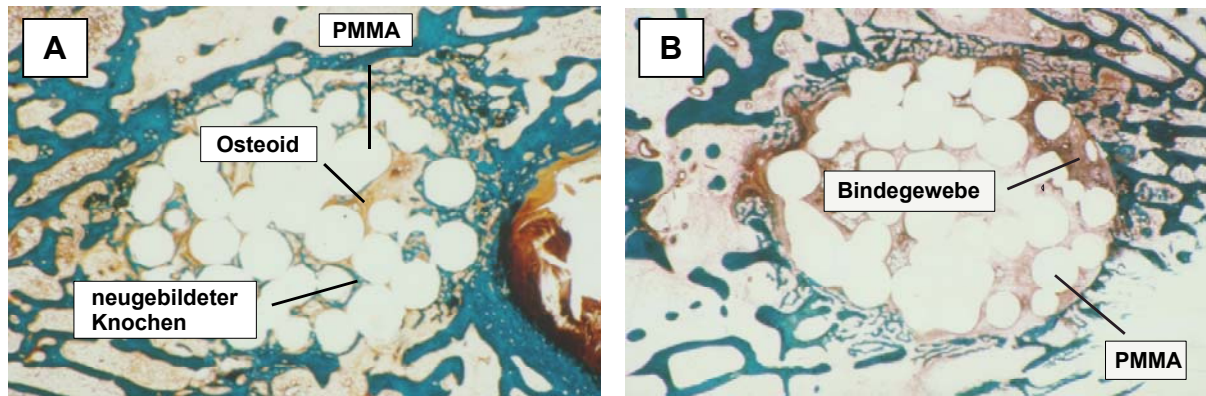


Abb. 19: Vergleich zweier Querschnitte durch PMMA-Implantate, zwei Wochen nach der Implantation in das Patella-Gleitlager der Femurkondyle von Kaninchen. **A** PMMA-Kügelchen mit RGD-Beschichtung befinden sich in direktem Kontakt mit neugebildetem Knochen (Osteoid). **B** Bei fehlender Beschichtung wird das Implantat von einer Bindegewebsschicht eingeschlossen.

Vergrößerung 16x, Färbung nach Goldner-Masson. Farb-Index: weiß: PMMA-Kügelchen; blau: Knochen; hellbraun: neugebildeter Osteoid; dunkelbraun: Bindegewebe.

Ein weiteres gängiges Verfahren zur Beschichtung von Polymeroberflächen ist die photoinduzierte radikalische Anbindung von Aziden und Benzophenonen. Mit Benzophenon-Carbonsäure (**15**) bzw. mit Aziden wie N-Succinimidyl-6-[4'-azido-2'-nitrophenylamino]-hexanoat (SANPAH, **16**) (Abb. 20) funktionalisierte RGD-Peptide konnten so auf Polymeren immobilisiert werden und erfolgreich die Zelladhäsion stimulieren.^[300-303] Attraktiv an dieser Methode ist die Erzeugung strukturierter Beschichtung durch Masken- oder Photolithographietechniken. Mikrostrukturierte Oberflächen sind z. B. wichtig für die Erzeugung von künstlichen Nervenbahnen,^[304] aber auch für die Beantwortung akademischer Fragestellungen, z. B. den Zusammenhang von Adhäsionsfläche und Zelltod.^[147]

Denkbar ist auch eine gesteuerte Ablösung von RGD-Peptiden von Oberflächen, z. B. mit den photoabspaltbaren o-Nitrobenzylamin-Linkern.^[284, 292] Von Yeo *et al.* konnte mit einem elektrochemisch spaltbaren Chinon-Linker die RGD-vermittelte Zelladhäsion auf Gold gezielt aufgehoben werden.^[305]

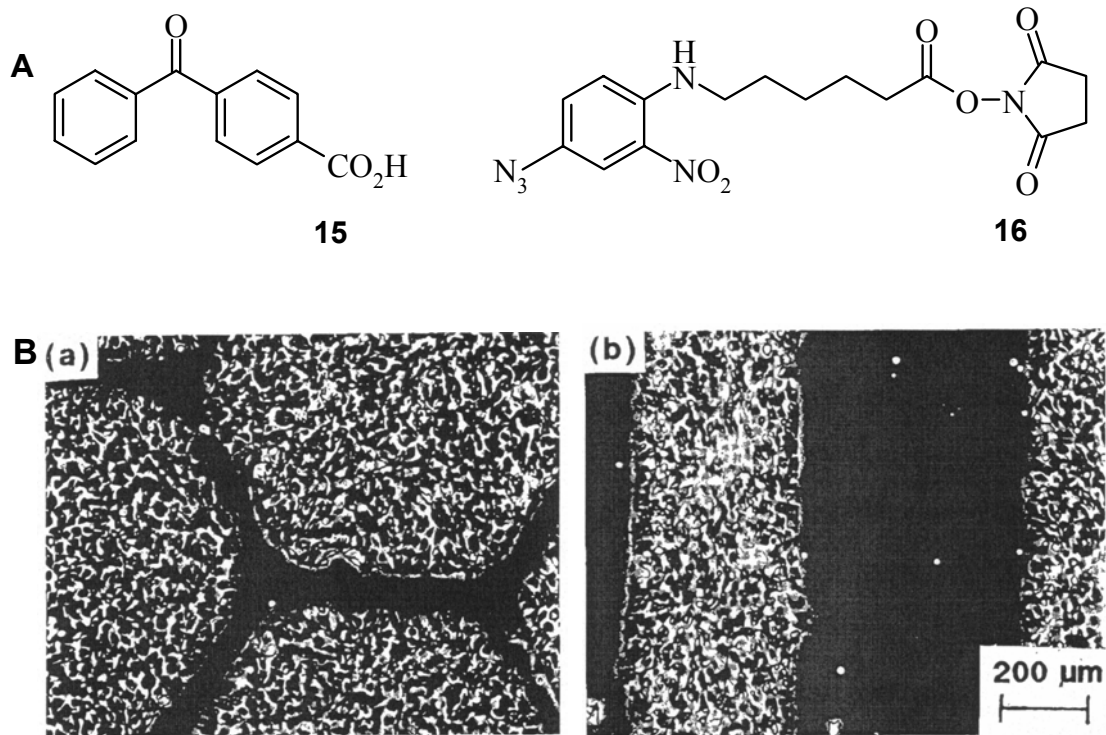


Abb. 20: **A** Benzophenoncarbonsäure (**15**) und der kommerziell erhältliche SANPAH-Linker **16** zur photochemischen Beschichtung. **B** Strukturierter Adhäsion von Endothelzellen auf PVA mittels 4-Azidobenzoyl-GGGGRGDSP durch Photomaskentechnik;^[300] **a)** wabenförmig **b)** linienförmig.

4.7 Silicium

Die Adhäsion von Zellen an Silicium-Oberflächen findet starke Beachtung in der Chip-Technologie. Die erfolgreiche Beschichtung von amorphem Silicium mit einem von C. Dahmen synthetisierten *cyclo(-RGDfK-)*-Peptid mit Pentenoylanker konnte durch ELISA bestätigt werden.^[306]

4.8 Design und räumliche Anordnung der RGD-Peptide

Zusätzlich zu einer erfolgreichen Immobilisierung der RGD-Peptide auf Oberflächen beeinflussen die Parameter **Integrin-Affinität**, **Integrin-Selektivität** und **räumliche Anordnung** der RGD-Peptide die Ergebnisse von Zelladhäsionsversuchen.

Einen Zusammenhang zwischen **Integrin-Affinität** der RGD-Peptide und Zelladhäsion kann man sich theoretisch leicht vorstellen. Man würde erwarten, dass die Zelladhäsion mit höheraffinen RGD-Peptiden zunimmt, analog zu der Wirksamkeit löslicher RGD-Peptide in Zellablösungs-*assays*, z. B. in folgender Reihe: RGD (C-Terminus frei, nahezu inaktiv) < RGD-NH₂ < RGDS < GRGDSP.^[307] Es gibt nur wenige systematische Studien zur Relation von Integrin-Affinität und Zelladhäsionsaktivität. *Hirano et al.* konnten zeigen, dass die Peptide RGDS, RGDV und RGDT für vier unterschiedliche Zelllinien eine höhere Adhäsionsaktivität als das Tripeptid RGD besitzen.^[308] Die etwa fünffach höhere $\alpha v\beta 3$ -Integrin-Affinität des Peptids *cyclo(-RGDfK-)* (**9**) gegenüber dem Peptid *cyclo(-RGDEv-)* (**17**) von *Delforge et al.* wurde mit einer Verdopplung der Zahl adhärierter Osteoblasten auf mit diesen Peptide funktionalisierten BSA-Oberflächen korreliert (Abb. 21).^[2] Zur Anbindung an BSA wurden die Peptide **9** und *cyclo[-R(β A)GDfK-]* (**18**) über die Lysinseitenkette mit N-Succinylcysteamin (**19**) und das Peptid **17** über die Glutamatseitenkette mit N-(ϵ -Aminohexanoyl)-cysteamin (**20**) verknüpft.

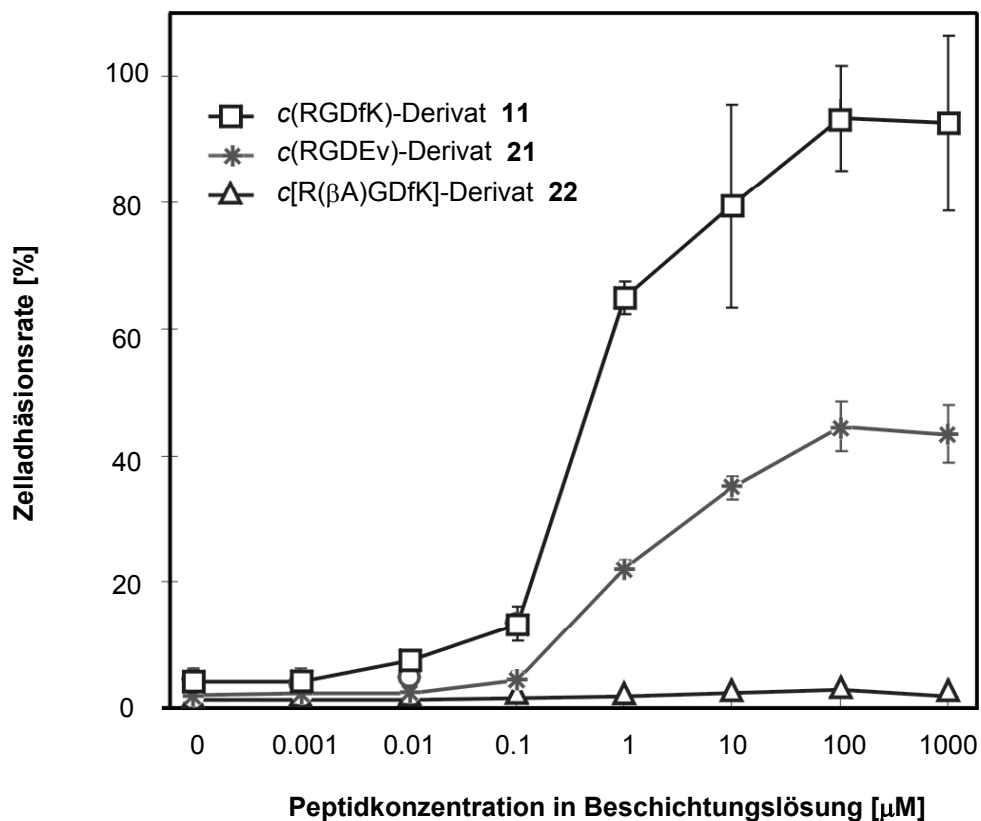
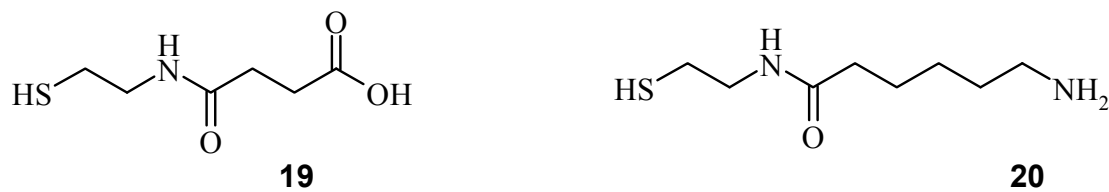


Abb. 21: Zusammenhang zwischen Zelladhäsionsrate und der $\alpha\beta 3$ -Integrinaffinität der verwendeten RGD-Peptide. (Adhäsion von MC3T3 H1-Maus-Osteoblasten an mit verschiedenen RGD-Peptiden beschichtete BSA-Oberflächen) Das Peptid mit der höchsten Integrinaffinität, cyclo(-RGDfK-) (**9**) ist mit der höchsten Zelladhäsionsrate korreliert. Die Affinität des Peptids cyclo(RGDEv) (**17**) beträgt etwa ein Fünftel, die Adhäsionsrate ist viel geringer. Keine Zelladhäsion bei Verwendung der RAD-Negativkontrolle **18**. Die Peptide sind über einen kurzen Thiollinker am BSA immobilisiert.^[284]

Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da sich die $\alpha\beta 3$ - bzw. $\alpha\beta 5$ -Integrin-Affinität der beiden Cyclopeptide lediglich um den Faktor fünf bzw. drei unterscheidet.^[123] Mögli-

cherweise ist die Ursache dafür nicht der Affinitätsunterschied der Stammpeptide **9** und **17**, sondern der Affinitätsunterschied der beiden *linker*-tragenden Peptide **11** und **21**: Während das Lysin von **9** frei auf der Oberfläche vom Integrin liegt und demzufolge ohne großen Einfluss auf die Integrin-Affinität funktionalisiert werden kann, ist die Position des Glutamats von **17** wahrscheinlich sterisch eingeengt und toleriert die Substitution mit dem Thiollinker nicht ohne Affinitätsverlust (Kap. 2.2). Möglicherweise spiegelt die unterschiedliche Zelladhäsionsaktivität dieser Peptide auch die unterschiedliche Fähigkeit, andere Osteoblastenintegrine adressieren zu können wider. Eine höhere Integrinaffinität geht auch mit einem erhöhten Widerstand gegen Ablösung durch Scherkräfte einher, wie von *Xiao* und *Truskey* mit den Peptiden GRGDSP bzw. G*PenGRGDSPC*A nachgewiesen wurde.^[309] Inwieweit sich eine erhöhte Zelladhäsionsaktivität auf eine bessere Gewebeintegration *in vivo* auswirkt ist nicht bekannt.

Neben Integrin-Affinität gibt es noch einige technische Aspekte im Design der RGD-Peptide zu berücksichtigen. So sollte die Anbindungsstelle eines Ankermoleküls an eine sterisch ungehinderte Stelle des Peptids liegen und das Peptid sollte evtl. auch ein Tyrosin zur Radioiod-Detektion enthalten. Negativkontrollen zu den RGD-Peptiden können durch minimale Veränderungen in der RGD-Sequenz realisiert werden, z. B. RGE, RGd, RAD or R β AD.^[2, 49, 54, 57, 310]

Analog zur Integrinaffinität ist eine **Integrin-Selektivität** der RGD-Peptide theoretisch von großer Bedeutung für eine Zellarten-spezifische Adhäsion über das jeweils zellspezifisch prädominante Integrin. Inwieweit sich dieser Ansatz *in vitro* oder *in vivo* realisieren lässt ist wenig untersucht. Einige Überlegungen zu diesem Gebiet sind im Anhang Kap. 9.5 beschrieben.

Die **räumliche Anordnung** der RGD-Peptide auf makroskopischer wie auch auf molekularer Ebene beeinflusst die Ergebnisse der Zelladhäsion. Auf makroskopischer Ebene weiß man, dass z. B. Endothelzellen eine zelladhäsive Oberfläche von mindestens 25 μm^2 zum Überleben brauchen.^[147]

Auf molekularer Ebene sind der Abstand des Peptids zu Oberfläche und Clustern des RGD-Peptids in Mikrodomänen wichtige Parameter.

Der Abstand eines Peptides zu Oberfläche wird üblicherweise durch ein Spacer-Molekül zwischen RGD-Peptid und Ankergruppe eingestellt. In einigen Fällen wird in der Literatur berichtet, dass eine gewisse Spacerlänge (ca. 35 nm, ausgestreckter Zustand des Spacers) für die RGD-vermittelte Zelladhäsion notwendig ist. Kürzere Spacer führen zu eingeschränkter oder überhaupt keiner Zelladhäsion. (Abb. 22, **A-C**)

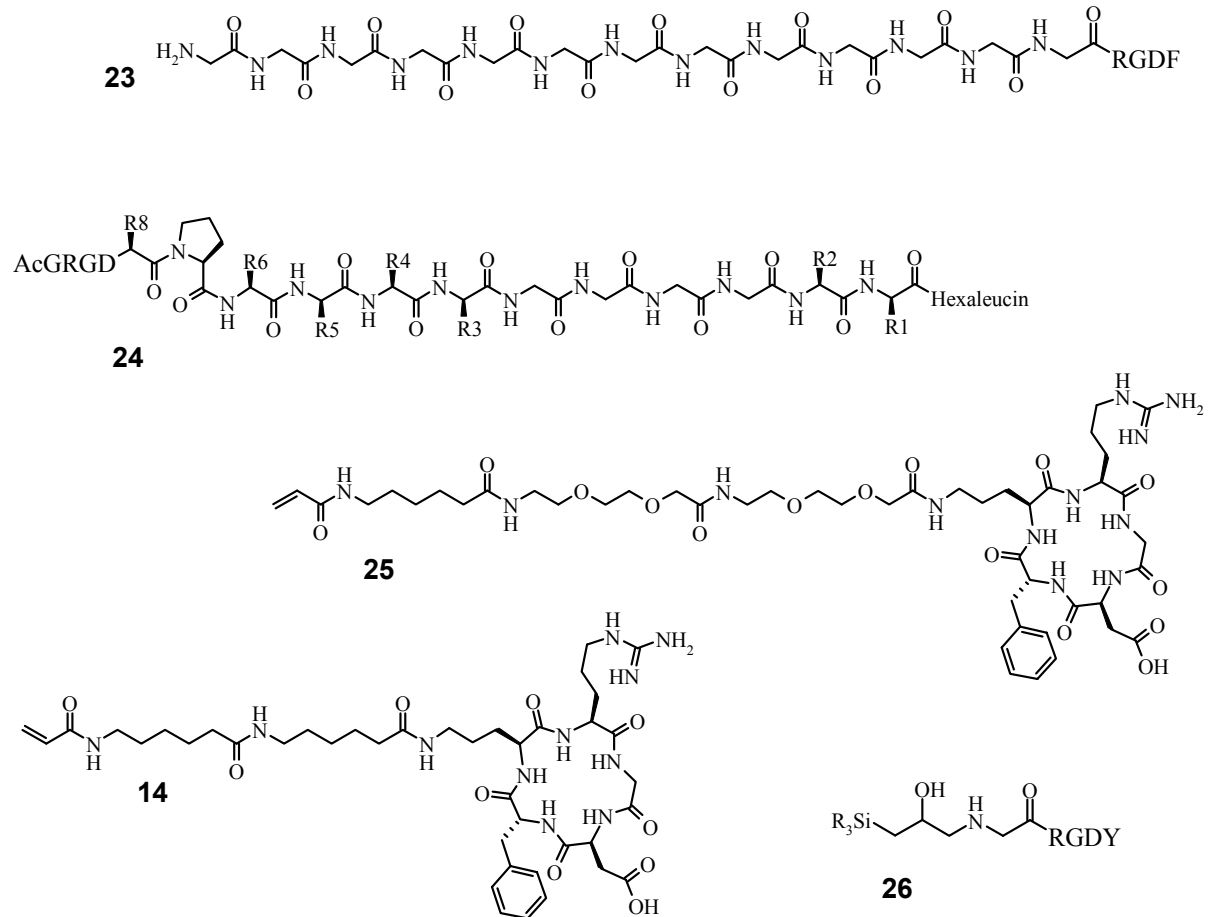


Abb. 22: Beispiele für spacer-Moleküle, die in einigen Fällen zur RGD-vermittelten Zelladhäsion notwendig sind. Ein für die Adhäsion von Blutplättchen an Polyacrylnitril-beads optimierter Gly₁₃-spacer **23**.^[95] PepTite 2000TM **24** für die Adhäsion verschiedener Zelllinien an unterschiedliche Polymere.^[88] **25** und **14**: cyclo(-RGDfK-) mit unterschiedlichen spacern mit verschiedener Länge und Hydrophilie-Profil für die Adhäsion von Osteoblasten an PMMA.^[2] In manchen Fällen wird dagegen praktisch kein Spacer benötigt (**26**).^[122]

Im Gegensatz dazu gibt es Beispiele für Zelladhäsion mit RGD-Peptiden, welche praktisch keinen Spacer enthalten, z. B. **26** auf Glas^[122] oder RGDC auf vergoldetem Titan.^[311] Woher in manchen Fällen der Bedarf für einen längeren Spacer stammt ist unklar. Aus der Kristallstruktur des $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrins kann man erkennen, dass die RGD-Bindungsstelle in der kristallisierten Konformation des Proteins nahe an der Oberfläche liegt. Mit einem relativ kurzem Spacer, z. B. Aminohexansäure, sollte sich die Distanz zwischen einer Biomaterialoberfläche und der Bindungsstelle überspannen lassen. Möglicherweise sind in manchen Fällen die RGD-Peptide nur in Vertiefungen der Materialoberfläche angeknüpft, so dass ein Spacer die Distanz zur Oberfläche überbrücken muss. Man könnte sich auch vorstellen, dass sich auf den Oberflächen mancher Materialien eine Schicht von Proteinen aus dem Adäsionpuffer abscheidet, so dass RGD-Peptide ohne Spacer nicht durch diese Schicht ragen können. Man könnte auch spekulieren, dass Spacermoleküle eine flexiblere Position der RGD-Peptide ermöglichen und dadurch die richtigen Abstände zum Clustern von Integrinen enthalten (siehe folgenden Abschnitt). Zu lange Spacermoleküle führen dagegen z. T. zu schlechteren Zelladhäsionsergebnissen^[95] und vermindern durch ihre Flexibilität eine rigide Oberflächenanbindung der Integrine, wie sie für eine Bildung der klassischen FAs notwendig ist.

Die Ausbildung von FAs ist normalerweise an eine bestimmte minimale Oberflächendichte von RGD-Peptiden gekoppelt. Nur wenn die RGD-Peptide dicht genug auf der Oberfläche angeordnet sind, können sich die entsprechenden Integrin-Aggregate bilden. Man versucht daher, RGD-Peptide gezielt in Mikrodomänen zu clustern, um so mit einer geringen Menge von RGD-Peptiden eine maximale Zelladhäsion zu erreichen.^[312]

In einem Experiment von *Maheshwari et al.*^[313] wurden dazu PEG-Sternpolymere mit einem Durchmesser von ca. 50 nm mit durchschnittlich 1, 5 und 9 YGRGD-Peptiden pro PEG-Stern funktionalisiert (Abb. 23). Diese wurden mit nichtfunktionalisierten PEG-Sternen vermischt und auf Oberflächen aufgebracht, so dass sich durchschnittliche RGD-Oberflächendichten von 0.12-20.50 nmol/cm² ergaben. An diese Oberfläche adhären Osteoblasten zeigten eine höhere Resistenz gegen Ablösung durch Scherkräfte und besser ausgebildete *stress fibers*, verglichen mit Zellen auf PEG-

Stern-Oberflächen, die die selbe Menge an statistisch gleichmäßig verteilten RGD-Peptiden enthielten.

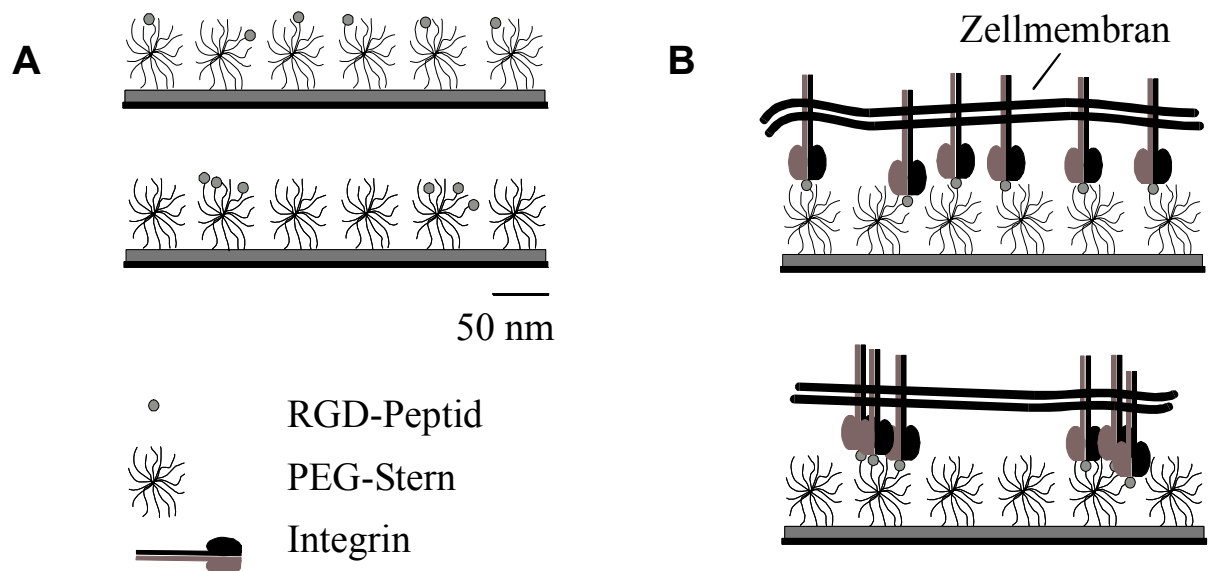


Abb. 23: Schematische Darstellung der RGD-funktionalisierten PEG-Sternpolymere. **A** Unterschiedliche Verteilung von RGD-Peptiden. Die Menge an Peptid ist in beiden Fällen die selbe. **B** Die unterschiedliche Verteilung der RGD-Peptide führt zu einer unterschiedlichen Verteilung der Integrine in der Zellmembran.

Mit der Verwendung von Sternpolymeren kommt man einer definierten Anordnung von RGD-Peptiden im Nanometerbereich nahe, allerdings gehen hier wiederum einige gemittelte Größen in die RGD-Verteilung ein, nämlich die Längen der Sternarme, die gemittelte Zahl von RGD-Peptiden pro Stern und die statistische Verteilung der Sterne auf der Oberfläche. Exakte Abstände lassen sich z. B. durch nanostrukturierte Oberflächen oder durch die Synthese definierter multivalenter RGD-Peptide erzielen. Wie groß der Abstand zwischen den einzelnen RGD-Peptiden sein muss, um die Distanz zwischen zwei Integrinen in einem Integrincluster zu überspannen, ist nicht bekannt. Als Obergrenze scheint sich aus Arbeiten mit nanostrukturierten Oberflächen ein Wert von ca. 60 nm herauszukristallisieren.^[280] Die natürliche Untergrenze stellen die Maße der Kopfgruppe der Integrine dar, also für das $\alpha\beta_3$ -Integrin $9 \times 6 \times 4.5$ nm.^[28] Von einem Virus weiß man, dass die (natürliche) pentagonale Anordnung von fünf RGD-

haltigen Penton-Base-Proteinen Zelladhäsion und Zellinvasion via αv -Integrine bewirkt, die monomere Form dagegen nicht. Die Seitenlänge des Pentagons beträgt 6 nm.^[314, 315] Damit entsprechen die Abmessungen des Pentagons etwa den Maßen der Integrinkopfgruppe und man kann spekulieren, dass das Virus die Bildung eines (Integrin)₅-Clusters induziert. Die Werte für Ober- und Untergrenze der Integrinabstände in FAs unterscheiden sich damit um eine Größenordnung. Möglicherweise sind die Toleranzgrenzen in den FAs der Zellen tatsächlich so groß, und gewisse Abstände können durch andere Moleküle (auch Integrine ohne Ligand) der FAs überbrückt werden.

5 Polyvalente Wechselwirkungen

Treten zwischen Ligand und Rezeptor mehrere Wechselwirkungen gleichzeitig auf, spricht man von multivalenten, bzw. dem amerikanischen Sprachgebrauch folgend von polyvalenten Wechselwirkungen. Polyvalente Wechselwirkungen sind in der Natur weit verbreitet und treten vor allem in verschiedenen Ebenen von Erkennungs- und Adhäsionsprozessen auf. (Tabelle 4) Obwohl die Wechselwirkungen bis hinunter auf die Ebene von kleinen Molekülen und Ionen polyvalent sein können, wird der Terminus „polyvalente Wechselwirkungen“ in der medizinischen Chemie üblicherweise erst ab der Größenordnung eines dimerisierten niedermolekularen Liganden und seiner Wechselwirkung mit einem oder mehreren Rezeptoren verwendet.

Biologische Systeme scheinen oft bevorzugt mehrere schwache (polyvalente) Wechselwirkungen einzugehen, als eine sehr starke monovalente. Dafür sind mehrere Ursachen denkbar, z. B. bieten sie die Möglichkeit abgestufter Signalprozesse: Für die Aktivierung eines Makrophagen ist ein einzelner Antikörper, der möglicherweise an eine falsche Zelle gebunden ist, nicht ausreichend. Zwei Antikörper dagegen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit das richtige Pathogen markieren, sind dazu in der Lage.^[316] Sind mehrere Rezeptortypen in die polyvalente Wechselwirkungen einbezogen, kann sowohl die Gesamtzahl der Wechselwirkungen als auch die Komplexität der Regulation zunehmen. Ein Beispiel dafür ist die Ausbildung von FAs, für die in manchen Fällen neben den Integrinen noch Syndecanen beteiligt sein müssen.^[317, 318]

Weiterhin ermöglichen polyvalente Wechselwirkungen eine größere Kontaktfläche, die eine (signalgebende) konformative Veränderung erzeugt, wie beim Spreiten einer adhärenierten Zelle. Der evolutionäre Vorteil der Rekrutierung mehrerer schwacher Wechselwirkungen könnte darin bestehen, dass anstatt auf einen entsprechenden Stimulus einen neuen Rezeptor zu entwickeln, lediglich die Zahl oder die komplexe Zusammensetzung unterschiedlicher, bereits vorhandener Rezeptoren verändert wird.^[316]

Tabelle 4: Beispiele für polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen.^[316]
Die Wechselwirkungen finden auf der Ebene von Zellen, Bakterien, Viren, Makroproteinen, Proteinen, kleinen Molekülen und Ionen statt.

„Ligand“	„Rezeptor“	Bemerkung
Leukocyt P ^a	Epithelzelle P	Im Prozess der Extravasation binden Sialyl-Lewis ^x und Integrine der Leukocyten an E- und P-Selectine bzw. VCAM der Epithelzellen
Borrelia Burgdorferi P	Blutplättchen P	Membranprotein P 66 bindet an α IIb β 3-Integrin
Influenzavirus P	Epithelzelle P	Wechselwirkung des viralen Hämagglutinin-Lectins mit Sialinsäure der Zelloberfläche
ECM P	adhärente Zellen P	Adhäsion über Integrine und andere Zelladhäsionsrezeptoren an entsprechende Adhäsionssequenzen der ECM
Antikörper P	Bakterien P	zwei (IgG) bis zehn (IgM) Antigenbindungsstellen erkennen sich wiederholende bakterielle Epitope
PDGF D ^a	PDGF-Rezeptor M ^a	PDGF als heterobivalenter Ligand dimerisiert PDGF-Rezeptoren
retinoider X-Rezeptor (RXR) M (P)	DNA P	Bindung des Transkriptionsfaktors RXR an DNA und dessen Pentamerisierung verstärken sich wechselseitig
GaNAc-Saccharid M, P	Leber-C-Lectin-Asialoglycoprotein-Rezeptor P	Vom monovalenten zum trivalenten Galactose-saccharid steigt die Bindungskonstante an das Lectin von 10^3 M^{-1} auf 10^8 M^{-1}
α -(RGDf[NMe]V-)	α v β 3-Integrin	u. a. gleichzeitige Wechselwirkung des Apartats und des Guanidins mit komplementärgeladenen Regionen des Integrins
D-Ala-D-Ala	Vancomycin	sehr kleine Dissoziationskonstante wegen fünf Wasserstoffbrücken ^[319]
K^+	Valinomycin	Kaliumion wird von sechs Carbonylsauerstoffen des Valinomycins komplexiert ^[320]

^a **P, D, M** = poly-, di- bzw. monovalenter Ligand oder Rezeptor.

In den letzten Jahren sind polyvalente Wechselwirkungen verstärkt in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.^[316, 321, 322] Polyvalente Liganden, die sich in ihren kollektiven Wechselwirkungseigenschaften quantitativ und qualitativ von den Eigenschaften der entsprechenden monovalenten Wechselwirkungen unterscheiden können, werden als vielversprechend in der Arzneimittelforschung und für die

Entwicklung neuer Reagentien für die Biochemie angesehen.^[316] Die Blockierung kollektiver Wechselwirkungen durch einen polyvalenten Antagonisten scheint in der Medizin eine vielversprechende Strategie (z. B. zur Inhibition der Anlagerung von Influenza-Viren an die Zielzelle) zu sein.^[316]

Neben der einfachen Bindung eines Liganden an seinen (Zelloberflächen-)Rezeptor treten bei polyvalenten Liganden zusätzliche Effekte auf. Diese lassen sich nach *Kiessling*^[323] sowie *Mammen* und *Whitesides*^[316] in folgende Kategorien einteilen (Abb. 24):

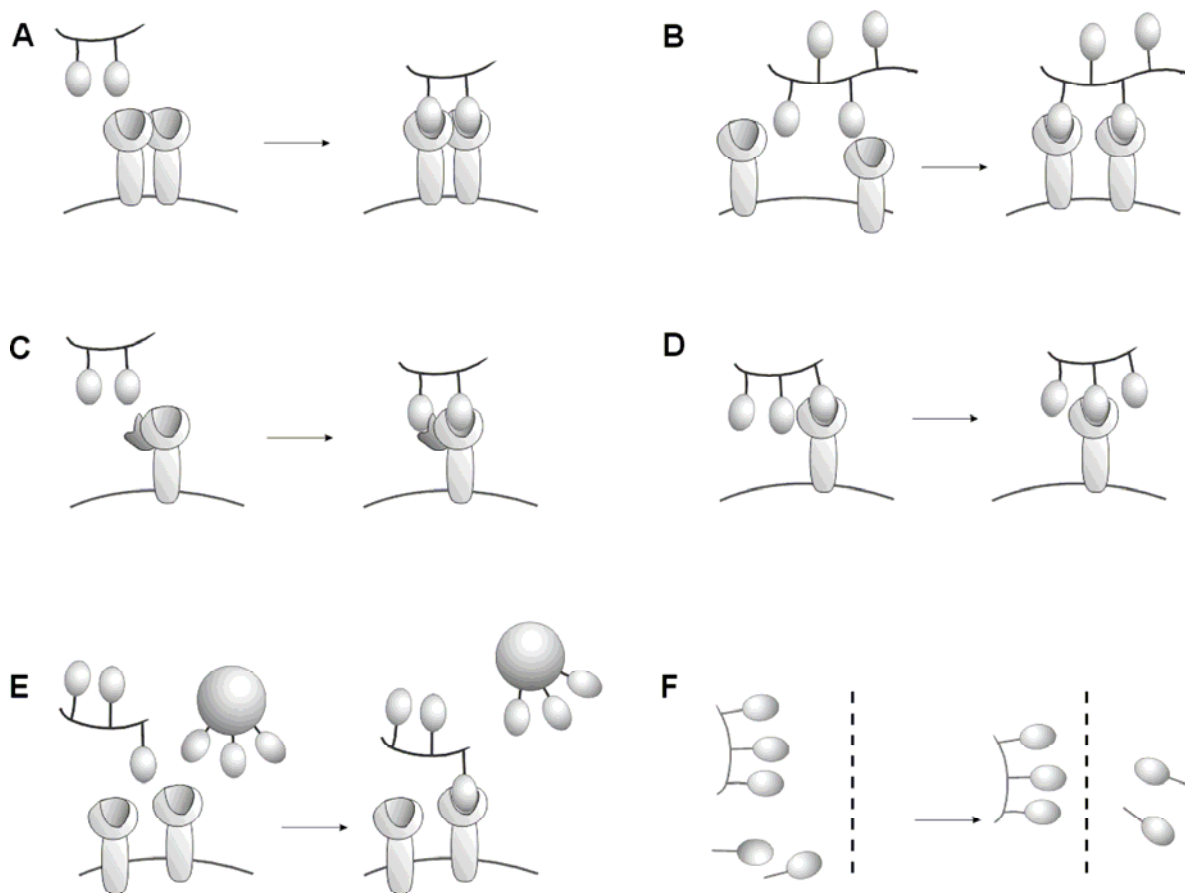


Abb. 24: Effekte polyvalenter Liganden: **A** Verstärkte Bindung an oligomerisierte Rezeptoren über Chelat-Effekt (= entropisch verstärkt). **B** Oligomerisierung bzw. Clustern von Rezeptoren durch Ligandenbindung. **C** Bindung an primäre und sekundäre Rezeptortaschen. **D** Konzentrationserhöhung von Bindungsseptitopen in der Umgebung eines Rezeptors. **E** „sterische Stabilisierung“: der polyvalente Inhibitor schirmt durch seine Größe die Rezeptoren von anderen Liganden ab. **F** Das pharmakokinetische Profil der polyvalenten Liganden kann gegenüber den monomeren verändert sein.^[324]

Die Gibbs-Bindungsenergie ΔG einer polyvalenten Wechselwirkung zwischen einem N-valenten Liganden und einem N-valenten Rezeptor und die entsprechende Bindungskonstante K lauten nach der von *Mammen et al.* entwickelten Terminologie:

$$\Delta G_N^{poly} = -RT \ln(K_N^{poly}) \quad N = \text{Zahl der Wechselwirkungen}$$

Die Bindungskonstante K_N^{poly} wird auch als die Avidität eines polyvalenten Liganden bezeichnet. In vielen Fällen ist die Avidität höher als die Affinität K einer monovalent wechselwirkenden Komponente.

Positive Kooperativität ($\alpha > 1$, siehe unten) im klassischen Sinne der Biologie, wie z. B. ein größeres ΔG für die Bindung des zweiten Sauerstoffmoleküls an Hämoglobin im Vergleich zum ersten Sauerstoffmolekül, konnte in polyvalenten Systemen noch nicht eindeutig beobachtet werden.^[316] Meistens ist die polyvalente Bindung negativ kooperativ ($\alpha < 1$), d. h. ΔG für die Bindung eines zweiten Liganden an einen polyvalenten Rezeptor ist geringer als ΔG für die Bindung des ersten Liganden. *Karush et al.* fanden heraus, dass die Affinität eines bivalenten Antikörpers an eine *Bacillus sp.*-Antigen-Oberfläche nur 30fach höher war, als die Affinität des entsprechenden monovalenten Antikörpers (ca. 10^{6-7} M^{-1})

$$\alpha = \frac{\Delta G_N^{poly} / N}{\Delta G^{mono}} = \frac{\ln(K_N^{poly})}{N \ln(K^{mono})} \quad \alpha = \text{Maß für die Kooperativität}$$

Im vorliegenden Fall wäre $\alpha = \ln(30 \cdot 10^{6.5}) / 2 \ln(10^{6.5}) = 0.6... < 1$ und somit negativ kooperativ. Da hiermit aber nicht beschrieben ist, dass die Affinität des Dimers trotzdem höher ist als die des Monomers und zudem oft die Zahl N unbekannt ist, wurde von *Mammen* und *Whitesides* der Verstärkungsfaktor β eingeführt.^[316] Er gibt das Verhältnis von experimenteller polyvalenter Bindungskonstante (normiert auf die Zahl der Liganden N_L) zu monovalenter Bindungskonstante an:

$$\beta = \frac{K^{exp} / N_L}{K^{mono}}$$

Moleküle, die hohe β -Werte aufweisen wären demnach nützlich, ungeachtet dessen, ob die zugrundeliegenden Wechselwirkungen kooperativ sind oder nicht.

Die Gibbsche Bindungsenergie einer polyvalenten Wechselwirkung setzt sich aus mehreren enthalpischen und entropischen Beiträgen zusammen, z. B. enthalpische Bindungsverstärkung, enthalpische Bindungsschwächung, Translations- und Rotationsentropie, Konformationsentropie und Solvatationsentropie.^[316] Die enthalpische Bindungsschwächung und die Konformationsentropie leisten bei polyvalenten Wechselwirkungen besonders große Beiträge zur Gibbschen Bindungsenergie und seien im Hinblick auf das Design von polyvalenten Liganden im Folgenden genauer beschrieben.

Die Bindungsenthalpie ΔH eines bivalenten Rezeptors mit einem bivalenten Liganden ist (beim Ausbleiben positiver Kooperativität) idealerweise doppelt so groß, wie die Bindungsenthalpie von monovalentem Rezeptor mit monovalentem Liganden (Abb. 25).

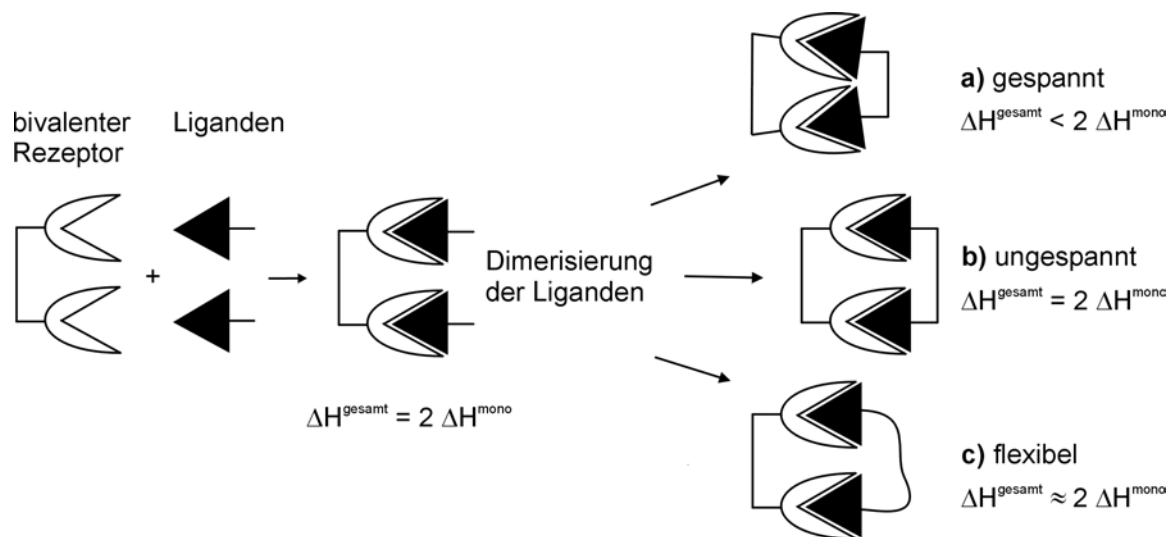


Abb. 25: Bindungsenthalpien einer bivalenten Wechselwirkung. **a)** Bei zu kurzem spacer treten Verformungen in Rezeptor und Ligand auf, die Bindung ist enthalpisch geschwächt. **b)** Mit exakter Spacergeometrie ist die Bindung enthalpisch neutral. **c)** Ein etwas längerer flexibler spacer erlaubt eine enthalpisch neutrale Anbindung bei nicht genau bekannten Abmessungen.

Treten wegen nicht genau zueinander passender Geometrie von Rezeptor und Ligand Verformungen auf, so ist eine bivalente Bindung enthalpisch geschwächt. Beim Design eines rigiden bivalenten Liganden ist also entweder eine perfekte Geometrie notwendig oder man erlaubt eine gewisse Flexibilität im *spacer*, der die beiden Bindungsepitope miteinander verbindet.

Der Entropieaufwand bei der Assoziation zweier monovalenter Rezeptoren mit zwei monovalenten Rezeptoren beträgt $2 \Delta S_{\text{trans}} + 2 \Delta S_{\text{rot}}$ (Abb 26). Wenn nun die beiden Liganden und Rezeptoren durch einen starren *spacer* mit exakt passender Geometrie verknüpft sind, beträgt der Entropieaufwand $\Delta S_{\text{trans}} + \Delta S_{\text{rot}}$ und ist damit etwa nur halb so groß wie im monovalenten Fall (Abb. 26 **A**). Hat zwischen den beiden starren bivalenten Spezies einmal eine einzelne Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung stattgefunden, so kann die nachfolgende zweite, intramolekulare Wechselwirkung quasi ohne Aufwand an Rotations-, Translations-, Konformations- und Hydratationsentropie stattfinden. Die Gibbs-Energie der zweiten Bindung ist, wegen $\Delta S \approx 0$, gleich $\Delta G \approx \Delta H^{\text{mono}}$, und somit größer als die der ersten Bindung. Eine solche Bindung ist maximal entropisch verstärkt. (Abb 26 **B**) Realistischerweise ist ΔS aber immer kleiner Null, also ungünstig, da die Zahl der möglichen Konformationen vor der Komplexierung größer ist als danach. Wenn der Aufwand an Konformationsentropie aber weiterhin kleiner ist als die Summe aus ΔS_{trans} und ΔS_{rot} , dann ist die bivalente Assoziation gegenüber der monovalenten immer noch entropisch verstärkt (Abb. 26 **C**, Weg a). Dieser Fall entspricht dem „Chelateffekt“ (Abb. 24 **A**). Ist die Konformationsentropie dagegen gleich der Summe aus ΔS_{trans} und ΔS_{rot} , so ist die Bindung gegenüber einem anderen Liganden entropisch neutral. (Abb. 26 **C**, Wege a und b gleich wahrscheinlich). Grundsätzlich kann auch der Verlust an Konformationsentropie die Summe aus ΔS_{trans} und ΔS_{rot} überschreiten. In diesem Fall wird der zweite Ligand der dimeren Spezies nicht mit einem Liganden einer anderen dimeren Spezies konkurrieren können. (Abb. 26 **C** Weg b)

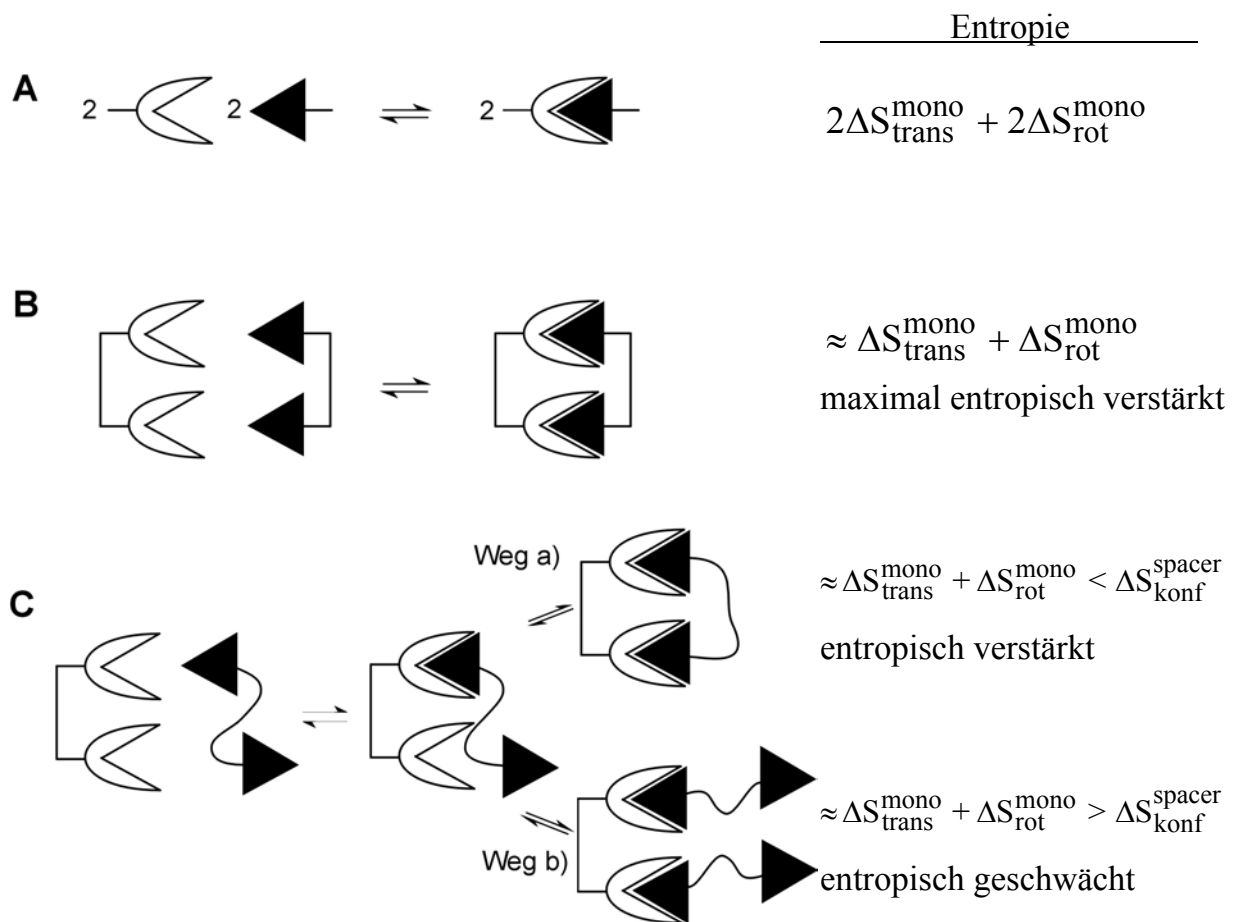


Abb. 26: *Verschiedene Konformationsentropien bei polyvalenter Wechselwirkung. **A** Monovalente Bindungssituation. **B** Maximale entropische Bindungsverstärkung durch starren spacer mit exakt passender Geometrie. **C** flexibler spacer. Weg a) Entropische Bindungsverstärkung, wenn der Konformationsentropieverlust im Spacer geringer ist als der Entropieverlust bei einer monovalenten Anbindung. Weg b) keine polyvalente Anbindung, wenn der Konformationsentropieverlust im spacer größer ist als der Entropieverlust bei einer monovalenten Anbindung.*

Der Verlust an Konformationsentropie bei einer polyvalenten Bindung ist nicht einfach zu quantifizieren. Vereinfachend kann man annehmen, dass der Verlust an Konformationsentropie hauptsächlich auf dem Einfrieren von Rotationen im *spacer* beruht.^[325] Nach einer Methode von *Mammen et al.* lässt sich die Konformationsentropie eines *spacer* durch einfaches Aufsummieren der Torsionsentropien der einzelnen Bindungen in einem *spacer* bestimmen.^[325] Die Energieaufwand beim Einfrieren der Rotation um eine C-C- oder um eine C-O-Bindung beträgt

ca. 2 kJ/mol.^[325] Für einen Triethylenglykol-Spacer würde somit der Entropieverlust einen Maximalwert von bis zu 40 kJ/mol annehmen! Es gibt jedoch mehrere Beispiele in der Literatur, aus denen hervorgeht, dass auch trotz wesentlich längeren PEG-spacer eine divalente Wechselwirkung beobachtet werden kann. In der Arbeitsgruppe von *Moroder* (MPI Martinsried) konnte z. B. durch PEG₁₉₋₂₅-verbrückte homo- und heterodimere Liganden des dimeren eukaryontischen Proteasoms die Inhibitions der Proteolyse um ca. zwei Größenordnungen verstärkt werden.^[326] In den meisten Fällen können allerdings sekundäre Effekte nicht sauber von der divalenten Wechselwirkung getrennt werden. Im beschriebenen Beispiel könnte z. B. die Konformation des PEG-Spacers im Innenraum des Proteasoms bereits eingeschränkt sein, so dass der Einfluss des Entropieverlusts der PEG-Kette bei divalenter Bindung nicht so groß werden kann. *Glick et al.* beschreiben ein divalentes PEG₈-verbrücktes Sialosid, das, verglichen mit einem monovalenten Sialosid, eine zehnfach höhere Affinität gegenüber dem trimeren Influenza-Hämagglutinin aufweist.^[65, 327] Die Affinitätssteigerung geht verloren, wenn als Spacermolekül PEG₁₀ verwendet wird, welches eine höhere Konformationsentropie aufweist. Wird der PEG₈-Spacer durch einen ähnlich langen Gly₈-Spacer ersetzt, steigt die Affinität nochmals um zwei Größenordnungen an. Dies könnte man dem geringeren Konformationsentropie-Verlust bei der Verwendung eines starrereren Spacers (Peptidbindung) zuschreiben. Wiederum ist aber zu einzuwenden, dass die Torsionsenergie eines Polyglycids nach *Mammen* ca. 0.2, 2 und 3.6 kJ/mol bzgl. der drei Bindungen in der Kette beträgt^[325] und damit durchschnittlich etwa gleich groß wie die von PEG ist (je 2 kJ/mol, s. o.). Die Affinitätssteigerung könnte man auch durch Wechselwirkungen des Polyglycin-Spacers mit dem viralen Protein erklären. Auch in dem vor kurzem von *Dekker et al.* beschriebenen divalenten Syk-bindenden Peptid, bei dem die natürliche Heptapeptidsequenz zwischen den beiden Liganden durch ein Heptaethylenglycol unter weitgehendem Erhalt der Aktivität ersetzt wurde, kann man die Beiträge zwischen Konformationsenergie und Wechselwirkung mit dem Protein nicht sauber trennen.^[328] Ebenso sollte eine polyvalente, integrinclusternde Zelladhäsion durch die Verwendung von PEG-Sternen (Länge eines Armes ca. PEG₂₀₀) aus Gründen des Konformationsenergie-Verlustes nicht möglich sein. Hier ist allerdings wiederum einzuwenden, dass zwischen einer Zelle und einer Oberfläche der Konformationsraum eingeschränkt ist, und es kommen möglicherweise wegen der

relativ langsamen Diffusion der Zelle die in Abb. 25 beschriebenen Punkte Konzentrationserhöhung in der Umgebung des Liganden **D** und „sterische Stabilisierung“ **E** zum Tragen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch einen flexiblen PEG-Spacer zwar prinzipiell viel Konformationsenergie eingebüßt werden kann, dass aber auch in verschiedenen Fällen wegen der genannten Gründe eine polyvalente Wechselwirkung möglich ist.

Für die Synthese von polyvalenten Liganden mit $N > 2$ werden verschiedene Arten von Gerüstmolekülen benutzt. Neben definierten relativ kleinen Substanzen wie z. B. dem trimeren Vancomycin^[329] oder dem pentameren und dekameren Choleratoxin-Inhibitor^[330] kommen zusätzlich größere Konstrukte wie Dendrimere,^[331-336] Liposomen,^[337-342] funktionalisierte Proteine,^[343-345] lineare Polymere,^[323, 343, 346, 347] verzweigte Polymere^[322, 348] oder in jüngerer Zeit hyperverzweigte Polymere^[349] zum Einsatz.

Von *Gestwicki et al.* wurden verschiedenen Gerüstmoleküle (niedermolekulare Moleküle, PAMAM(Polyamido-amin)-Dendrimere, Proteine, lineare definierte und polydisperse Polymere) mit α -Mannosiden funktionalisiert und auf ihre Wirksamkeit als Liganden auf das tetramere Lectin Concanavalin A *in vitro* getestet.^[343] Je nach Gerüstmolekül wurden Liganden mit speziellen Eigenschaften erhalten: Ein hohes Molekulargewicht (Protein-Konjugate, polydisperses Polymer) bewirkt gute Eigenschaften als Inhibitor, möglicherweise aufgrund der „sterischen Stabilisierung“ (Abb 24 E). Konstrukte mit einer hohen Liganden-Dichte (Dendrimer, lineares Polymer) hingegen können Concanavalin clustern und somit als Effektor wirken. Dabei sind die Concanavalin A-Lectine entweder sehr dicht und damit funktional (lineares Polymer) oder weniger dicht (Dendrimer) geclustert. Bei diesen großen Konstrukten scheint die Frage nach der Konformationsenergie wegen der hohen Ligandendichte weniger wichtig zu sein. Trotz der hohen Ligandendichte werden durch die Anordnung der Liganden aber wichtige funktionelle Unterschiede, z. B. in der Clustergeometrie bewirkt. Für eine medizinische Anwendung werden in Zukunft neben diesen Größen zusätzlich noch pharmakokinetische Parameter und die Toxizität dieser Konstrukte von Bedeutung sein.^[316, 332]

5.1 Polyvalente Integrinliganden

Auf dem Gebiet der Integrinliganden wurde polyvalente Wechselwirkungen bisher nicht systematisch erforscht obwohl die Bedeutung des Integrinclusters und die Möglichkeit, Integrine durch Antikörper zu clustern^[130, 146, 156] bekannt sind. Die derzeit bekannten polyvalenten Integrinliganden sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Eine Einschätzung dieser Liganden als polyvalent ist in den meisten Fällen schwierig, da entsprechende Untersuchungen nicht durchgeführt wurden. Am eindeutigsten können interzelluläre polyvalente Wechselwirkungen in Versuchen zur Zellaggregation nachgewiesen werden. Diese können *per se* nur mit polyvalenten Molekülen ausgelöst und mit monovalenten RGD-Peptiden inhibiert werden (Tabelle 5, Eintrag **C** und **M**) Interessanterweise ist die Zellaggregation in beiden Beispielen verringert, wenn die RGD-Peptide an verlängerten Spacern sitzen. Dieses Ergebnis könnte man als einen Verlust von Konformationsenergie interpretieren.

Bei so unterschiedlichen Konstrukten wie Dendrimer, lineares Polymer und funktionalisiertes Protein konnten in Verdrängungs-*assays* eine höhere Affinität der integrinvermittelten Anbindung an Zellen erzielt werden. (Tabelle 5, Eintrag **F**, **H**, **K**) Die Verstärkung liegt aber ungefähr nur bei einer Größenordnung und ist damit im Vergleich zu den polyvalenten Glyko-Konstrukten relativ unbedeutend. Eine ähnliche Verstärkung der Affinität konnte mit kleinen Dimeren im Rezeptor-Assay beobachtet werden (Tabelle 5, Eintrag **A** und **B**). Unter der Annahme, dass der Spacer zwischen den beiden cyclischen RGD-Peptiden viel zu kurz ist, um zwei Integrine zu binden, kann man evtl. hier den Fall einer lokalen Anreicherung von Liganden beobachten (Abb. 24 D). Ein um den Faktor 1000 kleinerer IC_{50} -Wert wird von einem RGD-HuMab-Konjugat berichtet (Tabelle 5, Eintrag **L**). Dieser Wert ist allerdings nicht leicht zu interpretieren, da erstens die Zahl der RGD-Peptide auf dem Antikörper nicht gegeben ist und zweitens kein natürlicher Ligand, sondern wiederum ein RGD-HuMab-Konjugat von der Zelle verdrängt wird.

Tabelle 5: In der Literatur beschriebene polyvalente Integrinliganden.

	Multivalenter Integrinligand	Testsystem	Referenz
A	Succinyl[<i>cyclo</i> (-RGDfK-)] ₂	Verdrängungsassay am isolierten Integrin	[89]
B	^{99m} Tc-HYNIC ^a -E-[<i>cyclo</i> (-RGDfK-)] ₂	Verdrängungsassay am isolierten Integrin, Tumor- <i>targeting</i>	[350]
C	GRGDY-PEG ₈₀ -GRGDY GRGDY-PEG ₄₅₀ -GRGDY	Aggregation von Fibroblasten, Gehirnzellen, Neuroblastomzellen und Pheochromocytomazellen	[351, 352]
D	G ₃ RGDG ₆ PHSRNG	Adhäsion und Funktionalität von Macrophagen und Riesenzellen	[353]
E	dimere und tetramere RGD-PEG-RGD-Derivate, RGD-PAMAM-Dendrimere und RGD-Polyacrylsäure	keine Tests	[354]
F	Dendrimere mit sechs und acht LDV-Peptiden	Verdrängung von monovalentem LDV-Ligand von Zelloberfläche	[334]
G	(RGD) _n , (RGDS) _n , (RGDT) _n , n = 30	Invasion und Metastasierung von B16-BL6-Melanomzellen in der Lunge, Angiogeneseinhibition, Plättchenaggregation	[355-357]
H	lin. Polymer aus GRGDS-Norbornen-carbonsäure	Zelladhäsionsassay	[346]
I	Liposom mit RGD-Farbstoff-Lipid-Konstrukt	optische Analyse der Zellanhaftung, Fluoreszenzmessung	[338]
J	Liposom mit RGD-Mimetikum-Lipid	Inhibition der Lungenmetastasierung mit B16-BL6-Melanomzellen	[342]
K	RGD-Albumin-Konjugate	Zellablösung	[358]
L	RGD-HuMab ^b -Antikörper	Verdrängungsassay von radioaktivem RGD-HuMab-Antikörper von Zelle	[345]
M	Polymerbeads mit GRGDF-Peptiden	Plättchenaggregation	[95]
N	YRGD-funktionalisierte PEG-Sternpolymere	Zelladhäsion und -migration	[313]

^a Hydrazinonicotinsäureamid ^b humanisierter indifferenten monoklonaler Antikörper

RGD(S, T)_n-Polypeptide (Tabelle 5, Eintrag **G**) weisen gegenüber monomeren RGD-Peptiden eine höhere Aktivität in verschiedenen Assays, z. B. der Inhibierung von Lungenmetastasen auf. Dieser Effekt ist aber nicht von dem Beitrag der mit Sicherheit

stark veränderten pharmakokinetischen Eigenschaften, insbesondere der Metabolisierung zu trennen. Integrinbindungsstudien liegen zu diesen Molekülen nicht vor. Interessante Ergebnisse konnten mit einem Liposom erzielt werden, welches zwischen Lipid und RGD-Peptid noch einen Fluoreszenz-Farbstoff (Chalcone) besitzt (Tabelle 5, Eintrag **I**). Wird der Farbstoff angeregt und das Liposom ist an eine Zelle gebunden, findet eine signifikante Beschleunigung der Quenchens der Fluoreszenz statt. Diese Beobachtung könnte man dadurch erklären, dass durch polyvalente Anbindung der RGD-Peptide des Liposoms an Adhäsionsplaques eine hohe Dichte von RGD-Molekülen herrscht, welche durch Dimerisieren der Doppelbindung des Chalcone-Farbstoffes abreagieren. Eine deutliche polyvalente Wechselwirkung kann man bei der Adhäsion von Fibroblasten auf Oberflächen mit vorgeclusterten RGD-Peptiden erkennen (Tabelle 5, Eintrag **N**) Durch die (wahrscheinlich) induzierten Integrincluster finden sich zwar nicht mehr adhärenzte Zellen auf diesen Oberflächen, aber die Anbindung der Zellen ist fester und die Migrationsgeschwindigkeit ist signifikant verändert (Kap. 4.8).

Insgesamt kann man sagen, dass polyvalente Bindung von Integrinliganden an Zellen in einigen Fällen erzielt werden konnte. Die beobachteten Effekte sind aber wesentlich geringer als bei den polyvalenten Glyko-Konstrukten.^[316] Möglicherweise sind bisher zu kleine Moleküle für die polyvalente Integrinbindung getestet worden. Andererseits ist die polyvalente Anbindung an Integrine *per se* schwieriger zu erreichen als z. B. an Lectine, welche bereits mehrere Bindungsstellen für einen Zucker besitzen und somit viel geringere Entfernungen überbrückt werden müssen. Für Integrine konnte gezeigt werden, dass durch Liganden-Abstände von bis zu ca 60 nm (!) noch ein Clustern von Integrinen ausgelöst werden konnte.^[280] Eine divalente Anbindung eines heterodimeren Liganden, der neben der RGD-Bindungsstelle eine zweite Bindungsstelle am selben Integrin adressiert, scheint einfacher realisiert werden zu können (Tabelle 5, Eintrag **D**). Bei einem dem Eintrag **8** ähnlichen Polymer führt der Austausch der Hälfte der RGD-Peptide durch die sekundäre Bindungssequenz PHSRN zu einer fünf-fachen Affinitätssteigerung für das Integrin $\alpha v \beta 3$, verglichen mit dem nur-RGD-Polymer!

Möglicherweise können durch die Kenntnis des minimalen bzw. maximalen Abstandes von Integrinen in einem Cluster (ca. 6 bzw. 60 nm) in Zukunft gezielter polyvalente Integrinliganden entworfen werden.

6 Synthese und biologische Evaluierung der RGD-Peptide

Im diesem Kapitel wird die Konzeption und Synthese der verschiedenen funktionalisierten RGD-Peptide beschrieben. RGD-Peptide mit Ankergruppe werden als Agonisten der ECM zur Stimulierung der Zelladhäsion auf Oberflächen eingesetzt. RGD-Peptide ohne Ankergruppe kommen als lösliche Verbindungen in Rezeptoraffinitäts- und in Zellablösungsstudien zu Einsatz. RGD-Peptide mit radiomarkierbarer Stannylkomponente werden zum Tumor-*targeting* verwendet. Die Daten der biologischen Evaluierung der verschiedenen Verbindungen werden im Anschluss an die jeweilige Synthese vorgestellt.

Die Evaluierung wurde von verschiedenen Kooperationspartnern durchgeführt. Soweit nicht anders angegeben, stammen die Daten für die Rezeptoraffinitäten von *Dr. Simon L. Goodman* und *Dr. Matthias Wiesner* von *Merck KGaA* und die Daten der Zelladhäsion von *Dr. Brigitte Jeschke*, *Dr. Anja Enderle* und *Patricia Schaffner* von *Biomet Merck BioMaterials (Merck Biomaterial)*.

6.1 Allgemeine Aspekte der Peptidsynthese

Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Peptide wird die von *Merrifield* entwickelte Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) verwendet.^[359, 360] Bei dieser Technik wird die Peptidkette sequenziell an einem festen Träger aufgebaut: eine N-terminal temporär geschützte Aminosäure wird an eine N-terminal *entschützte* Festphasen-gebundene Aminosäure gekuppelt. Um Reaktionen mit den funktionellen Gruppen der Seitenketten zu vermeiden, werden für diese permanente Schutzgruppen verwendet. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, dass durch hohe Reagenzienüberschüsse die Kupplungsreaktion zu einer fast quantitativen Umsetzung vervollständigt werden kann und dass die Nebenprodukte und Reagenzien von dem jeweiligen geträgerten Zielmolekül durch einfache Filtration entfernt werden können. In dieser Arbeit kommt die von *Carpino et al.* entwickelte orthogonale

Fmoc/*t*Bu-Schutzgruppenstrategie zum Einsatz (Abb. 27).^[361, 362] Die Verankerung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure am Harz (Schritt 1) erfolgt über einen Trityl-linker, von welchem das Peptid unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen abgespalten werden kann. Prinzipiell sind auch andere Linker mit anderen Abspaltbedingungen möglich.^[363]

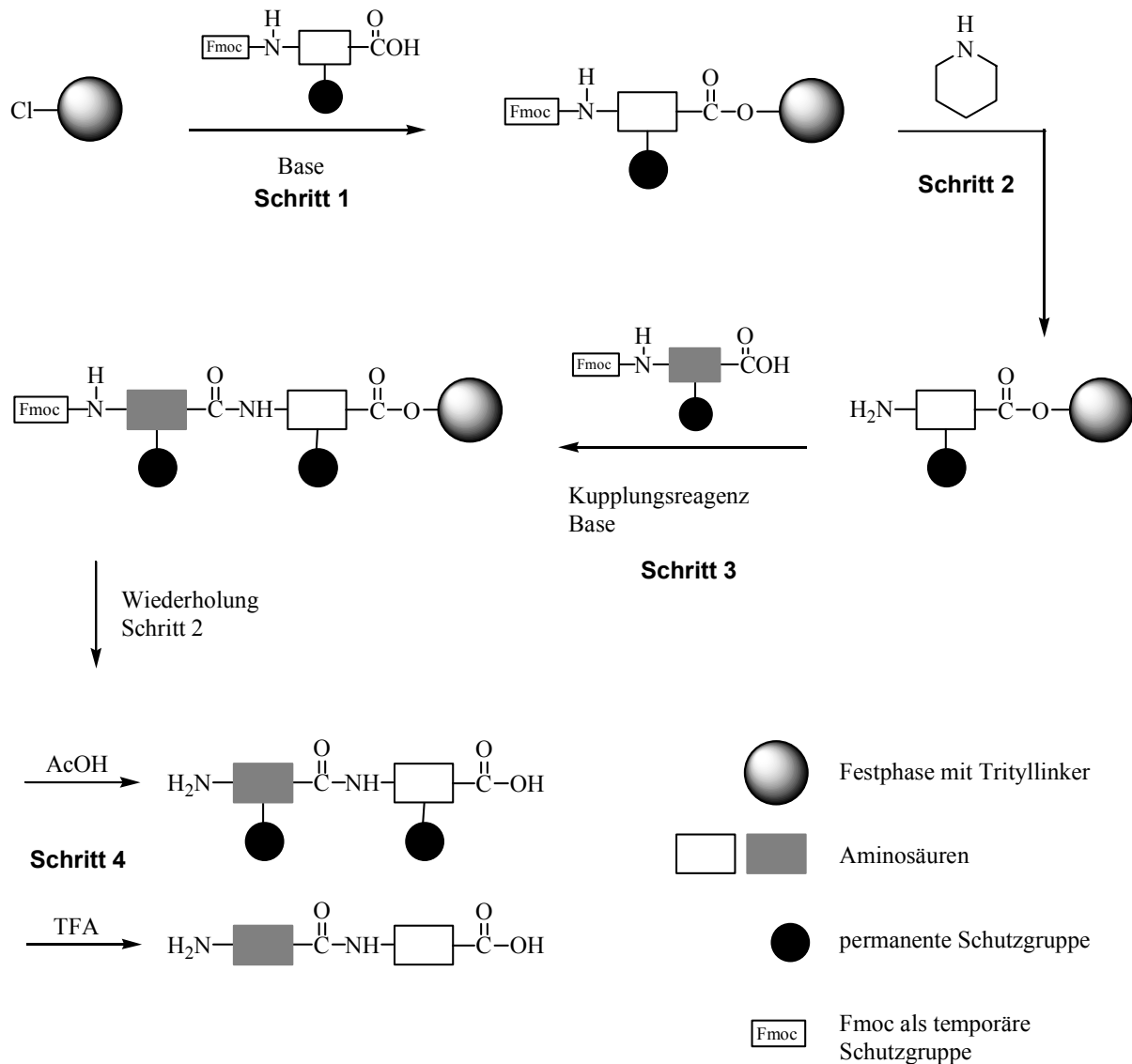


Abb. 27: Synthese von Peptiden an fester Phase nach Merrifield und Carpino. Die Abspaltung des Peptids vom festen Träger (Schritt 4) kann entweder unter Erhalt (AcOH) oder mit simultaner Abspaltung (TFA) der permanenten Schutzgruppen erfolgen.

Für die Kupplung der Fmoc-geschützten Aminosäuren muss die Carboxylgruppe aktiviert werden. Dazu können entweder voraktivierte Aminosäurederivate eingesetzt werden (z. B. N-Carboxyanhydride, Pentafluorphenolester, Säurehalogenide) oder die Aminosäuren werden *in situ* mit einem der vielen verfügbaren Kupplungsreagenzien aktiviert (Abb. 28).

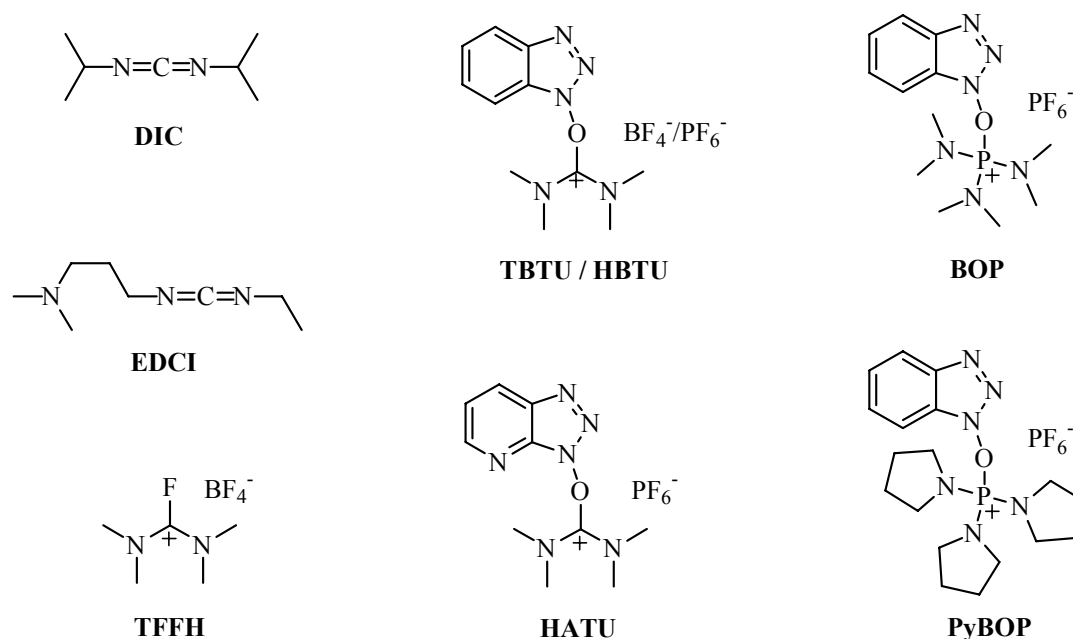


Abb. 28: Kupplungsreagenzien für die *in situ*-Aktivierung von Aminosäuren. Von den Kupplungsreagenzien HBTU und HATU ist neben der dargestellten Uronium- auch eine Guanidiniumstruktur beschrieben.^[364]

Die in Abb. 28 dargestellten Reagenzien erzeugen im ersten Schritt der Aktivierung eine Acyluronium- oder Acylphosphonium-Spezies, die dann durch die Abgangsgruppe Fluorid, HOBt (1-Hydroxybenzotriazol) oder HOAt (1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol) substituiert wird (nicht wenn Carbodiimide allein eingesetzt werden). Die intermediär erzeugten OAt-Aktivester besitzen dabei die höchste Kupplungseffizienz, weshalb HATU (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) trotz seines sehr hohen Preises mittlerweile zum Standardreagenz in der Synthese von schwierigen, z. B. N-methylierten Peptiden geworden ist.^[365, 366]

Die in den ersten Reaktionsschritten gebildeten Acyl-Onium-Verbindungen racemisieren leicht, so dass diese durch Zusatz von Additiven (Abb. 29) in die entsprechenden Aktivester überführt werden, bzw. das Reaktionsgleichgewicht zu diesen hin verschoben wird. Gleichzeitig werden sterisch gehinderte bzw. schwache Basen zur Vermeidung von Racemisierung eingesetzt. Im Falle der Carbodiimide kann durch den Zusatz dieser Additive die Bildung der N-acylierten Carbodiimide unterdrückt werden.

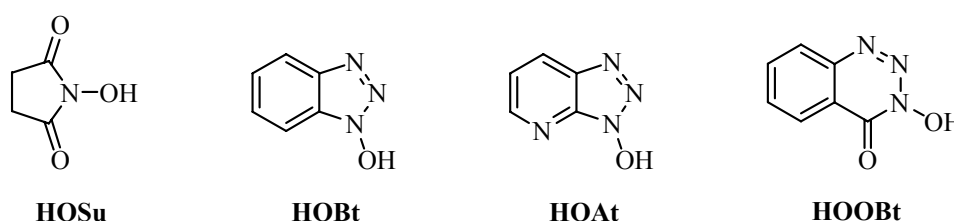


Abb. 29: Gebräuchliche Additive für die Kupplung von *in situ* aktivierten Aminosäurederivaten.

In der Festphasenreaktion hängt die Reaktionsgeschwindigkeit neben der eigentlichen Reaktivität der beteiligten Moleküle auch besonders davon ab, in welchem Ausmaß die beteiligten Reaktionspartner in Kontakt kommen können. Da der Transport ins Innere der Harzkügelchen durch Diffusion erfolgt ist es essenziell für hohe Umsatzraten (auch zur Unterdrückung von Nebenreaktionen z. B. Guanylierung des N-Terminus durch die Uronium-basierenden Kupplungsreagenzien), die Reaktionssuspension ständig zu durchmischen und die aktivierte Aminosäure in möglichst konzentrierter Lösung (≥ 0.2 M, mindestens > 0.1 M) einzusetzen.

Als permanente Seitenkettenschutzgruppen der Fmoc-Aminosäuren kommen routinemäßig folgende, TFA labilen Schutzgruppen zum Einsatz:

Aminosäure	Schutzgruppe	Kürzel
Serin, Threonin, Tyrosin	<i>tert.</i> -Butyl-Ether	<i>t</i> Bu
Aspartat, Glutamat	<i>t</i> Bu-Ester	O <i>t</i> Bu
Cystein, Asparagin, Glutamin, Histidin	Trityl-	Trt
Lysin, Tryptophan	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl-	Boc
Arginin	N ^α -(2,2,4,6,7)-Pentamethyl- dihydrobenzofuran-5-sulfonyl-	Pbf

Die bei der sauren Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen entstehenden Carbokationen müssen mittels geeigneter *scavenger* abgefangen werden, um die irreversible Alkylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Als Abspaltungsmischung kommen dabei Mischungen aus TFA, Wasser und verschiedenen Zusätzen von Nucleophilen wie Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.^[367] Heute werden diese oft durch Triisopropylsilan (TIPS) ersetzt, da es geruchlos ist und Carbokationen effektiv abfängt.^[368]

Speziell für die Synthese von verzweigten Peptiden und Peptiddendrimeren wurden in jüngerer Zeit verschiedene verzweigte Aminosäuren beschrieben (Abb. 30). Diese Verzweigungseinheiten können chiral (**27**^[332], **28**^[369], **29**^[370]) oder achiral (**30**^[371, 372]) sein und neben einer zweifachen auch zu einer dreifachen Verzweigung führen (**31**^[371], **32**^[373]). Für den Aufbau komplexer Peptiddendrimere stehen auch Aminosäuren mit verschiedenen orthogonalen N-Schutzgruppen (**31**^[374], **33**^[373]) zur Verfügung.

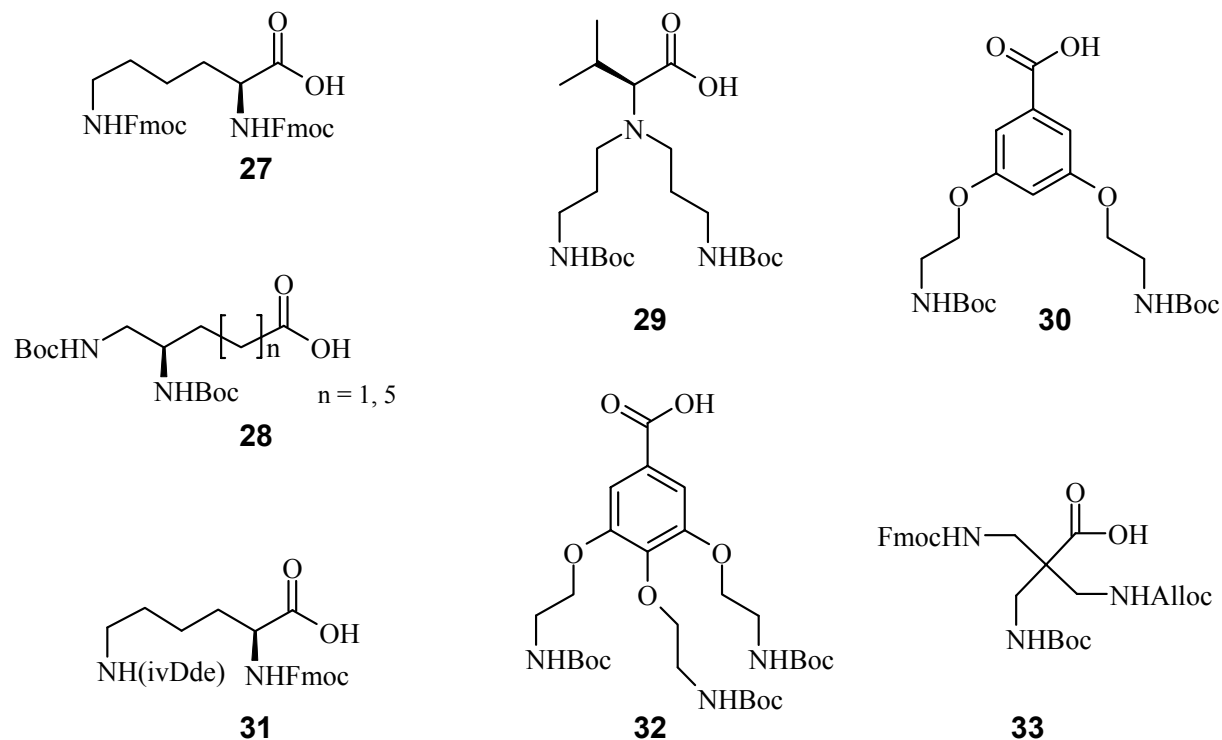


Abb. 30: Verzweigte Aminosäuren für die Peptid-Festphasensynthese.

6.2 Synthesestrategie

Die synthetische Hauptaufgabe dieser Arbeit ist die Herstellung von verzweigten Molekülen mit mehreren RGD-Peptiden und einer Gruppe zur Verankerung auf Oberflächen. Durch oberflächenimmobilisierte RGD-Multimere sollten theoretisch mehrere Integrine einer Zelle polyvalent gebunden und so die Zelladhäsion verstärkt werden sowie die Bildung von Integrinclustern induziert werden. Da der Abstand der RGD-Bindungsstellen zwischen zwei Integrinen nicht bekannt war, vermutet wurden 150 Å, sollten mehrere Multimere mit unterschiedlicher exakt definierter Länge synthetisiert werden. Nach der Theorie würde eine verstärkte Zelladhäsion dann auftreten, wenn die Abstände zwischen den RGD-Molekülen den Abständen der Integrine in einem Cluster entsprechen.

6.2.1 Cyclopeptid

Ausgangspunkt für die Syntheseplanung war das teilentschützte Cyclopeptid *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fK-] (**Z1***). In Arbeiten von R. Haubner, D. Finsinger und M. Kantlehner wurde gezeigt, dass das Cyclopeptid ohne Affinitätsverlust über die freie Aminogruppe der Lysinseitenkette mit verschiedenen Molekülen über eine Amidbindung verknüpft werden kann.^[89, 90, 284]

In der Peptidchemie wird üblicherweise die aktivierte C-terminale Komponente im Überschuss eingesetzt, um eine vollständige Umsetzung mit dem Amin zu gewährleisten. Wegen der in dieser Arbeit notwendigen vollständigen Umsetzung des Cyclopeptids mit komplexeren Molekülen sollte das Cyclopeptid zunächst als C-terminale Komponente mit freier Carboxylgruppe synthetisiert werden.

Zur Einführung der Carboxylgruppe bietet es sich an, das Lysin gegen ein Glutamat auszutauschen (Abb. 31). Die Affinität dieses Peptides dürfte sich dadurch nur unwesentlich ändern.

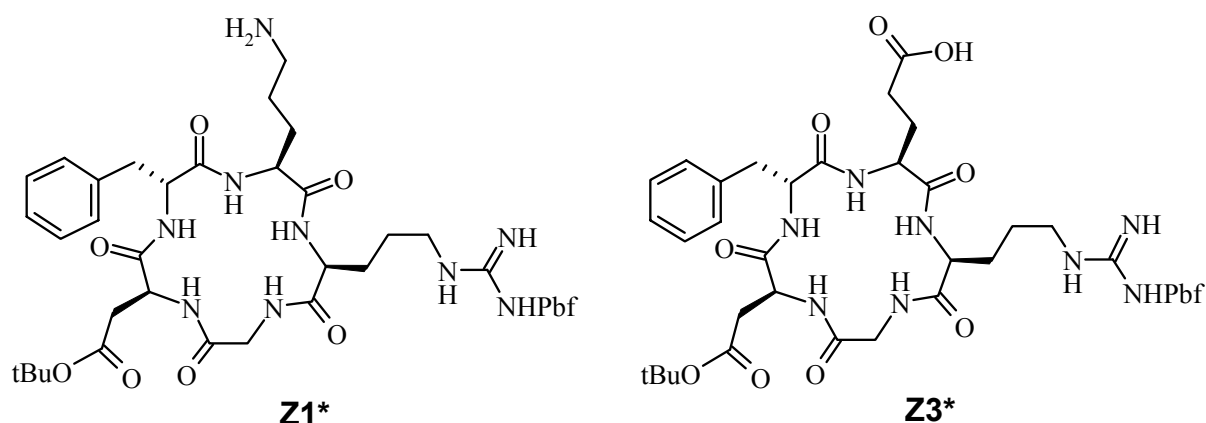


Abb. 31: In dem Cyclopentapeptiden *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fK-] (**Z1***) und in dem hier geplanten *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) sind die funktionellen Gruppen der Seitenketten von Arginin und Aspartat durch Schutzgruppen blockiert. Die freie Seitenkettenfunktionalität des Lysins bzw. des Glutamats stehen für Kupplungsreaktionen zu Verfügung.

Statt über einer Amidbindung kann das Cyclopeptid prinzipiell auch anders angebunden werden, z. B. über chemoselektive Ligation. Diese Alternativen kamen hier nicht zum Einsatz, da die Anbindung des Cyclopeptids über eine Amidbindung sehr effizient und die entstehende Amidbindung sehr stabil ist und sich indifferent gegenüber den verschiedenen Ankergruppen etc. verhält.

6.2.2 Gerüstmolekül

Entsprechend der Aufgabenstellung werden Gerüstmoleküle mit definierten Größen benötigt, an die sowohl RGD-Peptide als auch Ankerfunktionalitäten angebracht werden können. Die verzweigten Gerüstmoleküle mussten so geplant werden, dass

- nur Moleküle definierter Größe eingesetzt werden (also z. B. keine polydispersen Polymere)
- „große“ Abstände überbrückt werden können (mehrere 10 Å)
- Variationen in Größe und Verzweigungsgrad leicht machbar sind
- RGD-Peptide effizient angeheftet werden können
- eine Ankergruppe bzw. eine andere Funktionalisierung angebracht werden kann

Um diese Forderungen zu erfüllen wurde auf die Peptid-Festphasensynthese zurückgegriffen. Hier lassen sich mit den etablierten Methoden der Peptidkupplung schnell und in guten Ausbeuten mittels **verzweigter Aminosäuren** und **spacer-Aminosäuren** Peptid-Dendrimere mit diverser Struktur aufbauen.^[332] Ein bekanntes Beispiel für Peptiddendrimere sind die *multiple antigen peptides* (MAPs), die mehrere Kopien eines peptidischen Antigens an einem Lysinbaum (4 oder 8 Zweige) enthalten.^[332, 375, 376] Neben Lysin wurden für die Peptiddendrimer-Synthese in jüngerer Zeit andere Verzweigungseinheiten beschrieben (Abb. 30).

Ähnlich zu den MAPs ließen sich an die N-Termini des Gerüstmoleküls Cyclopeptide mit freiem C-Terminus ankuppeln (Abb. 32).

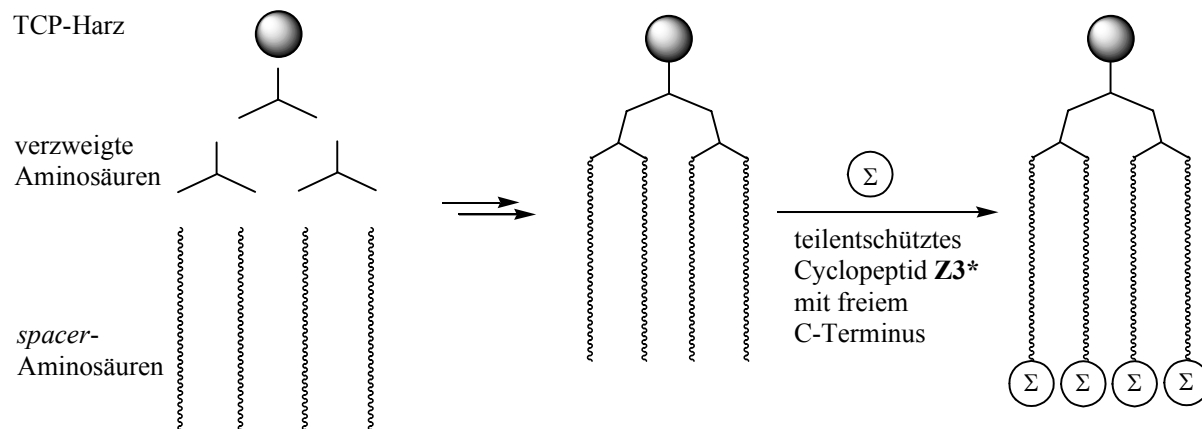


Abb. 32: Aufbau eines verzweigten Gerüstmoleküls aus verzweigten Aminosäuren und spacer-Aminosäuren am TCP(Triylchlorid-Polystyrol)-Harz. An das Gerüst werden die teilentschützten Cyclopeptide gekuppelt.

6.2.3 Anker/weitere Funktionalisierung

Da an das Gerüstmolekül nicht nur Ankergruppen sondern potenziell auch andere funktionelle Elemente, z. B. radioaktive Reportergruppen gekuppelt werden sollten, wurde zunächst nur das Gerüstmolekül mit den RGD-Peptiden am TCP-Harz aufgebaut. (Abb. 33).

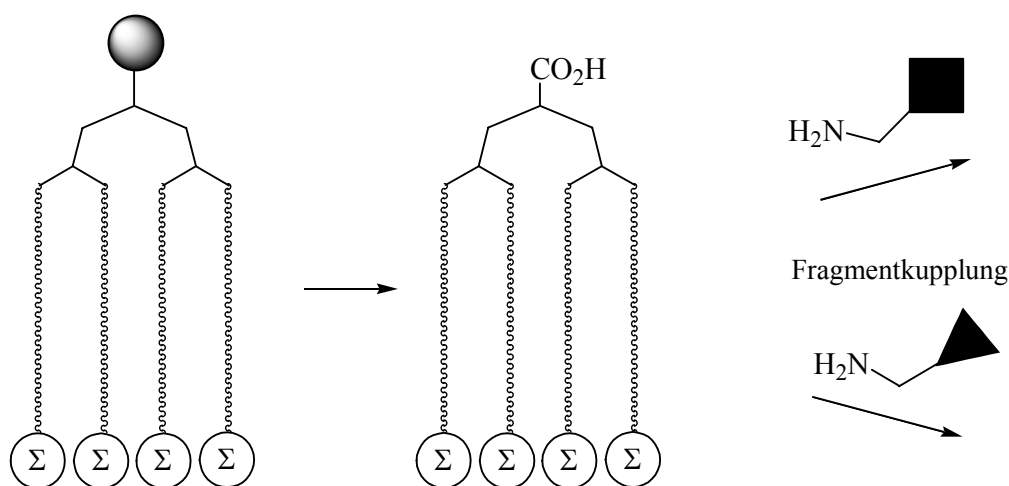


Abb. 33: Das Gerüstmolekül mit den RGD-Peptiden wird vom TCP-Harz unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen abgespalten. Der freie C-Terminus steht für weitere Kupplungsreaktionen zur Verfügung.

Nach Abspaltung des Moleküls von der Festphase unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen ließe sich das erhaltene Molekül mit jeder beliebigen Molekülen über den freigesetzten C-Terminus des Gerüsts verknüpfen.

Diese Endfunktionalisierung verlief jedoch z. T. in sehr schlechten Ausbeuten und es war nicht möglich, ausreichende Mengen für die biologischen Testungen zu synthetisieren. Die Synthese wurde daraufhin so geändert, dass die Ankerfunktionalität bereits von Anfang an in der Seitenkette der C-terminalen Aminosäure enthalten ist („alles-am-Harz-Strategie“) (Abb. 34). Diese Synthesestrategie erwies sich auch für die Synthese von monomeren funktionalisierten RGD-Peptiden als sehr erfolgreich und es konnte so eine große Vielfalt von monomeren und multimeren Verbindungen mit unterschiedlichen Ankern hergestellt werden.

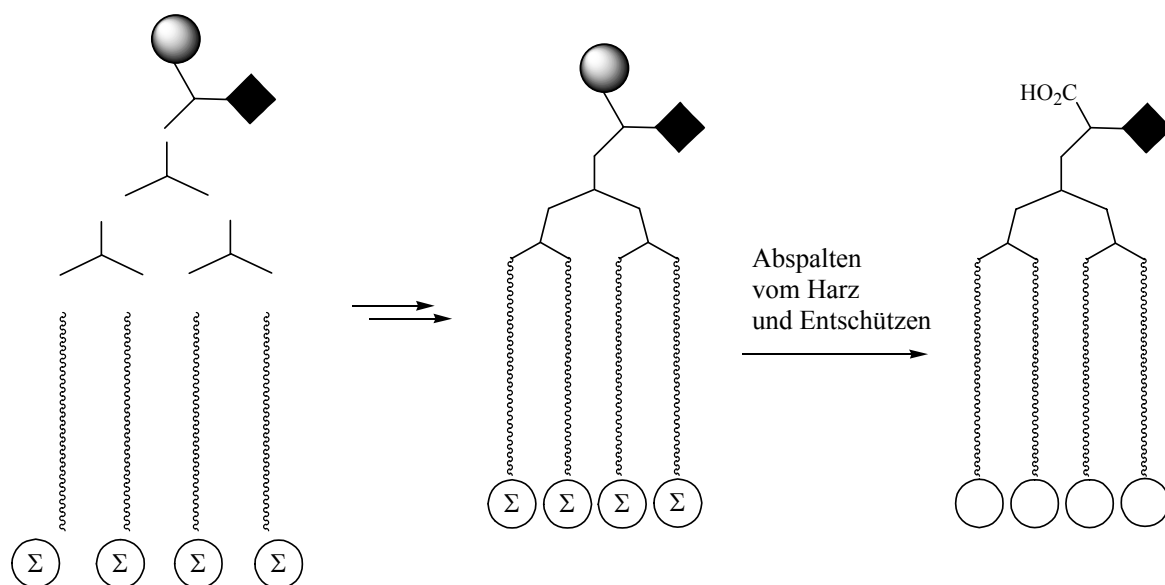


Abb. 34: Bei der „alles-am-Harz-Strategie“ ist die Ankergruppe oder die sonstige gewünschte Funktionalität bereits in der Seitenkette der ersten Aminosäure enthalten. Davon ausgehend wird das Molekül an der festen Phase aufgebaut.

Prinzipiell ist bei der Synthese verzweigter Verbindungen auch die konvergente Synthese möglich, also der Aufbau des verzweigten Moleküls von außen nach innen durch das wiederholte Verknüpfen von immer komplexer werdenden Teilstrukturen. Diese Strategie wurde z. B. erfolgreich bei der Synthese definierter, monodisperser Dendrimere angewandt.^[377] Die Festphasensynthese, bei der das Molekül ja linear

bzw. divergent und von innen nach außen aufgebaut wird, ist mit dieser Methode jedoch nicht vereinbar. In Testversuchen zum konvergenten Aufbau des Gerüstmoleküls stellte sich zudem heraus, dass bei der Verknüpfung von komplexeren Unterstrukturen ohne einen großen Reagenzienüberschuss (der aufwändig hergestellten Unterstrukturen!) nur schlechte Ausbeuten erzielt werden konnten, weshalb diese Strategie nicht weiter verfolgt wurde. Das Prinzip der Konvergenz kommt allerdings insofern zur Anwendung, als dass das Cyclopeptid nicht am verzweigten Gerüstmolekül aufgebaut wird, sondern als Pentapeptid-Fragment eingesetzt wird.

Mit den Reaktionsbedingungen der „alles-am-Harz-Strategie“ sind empfindliche Anker- oder sonstige Reportergruppen nicht kompatibel und können so nicht in Peptide eingebracht werden. Daher wurde die Synthese später weiter entwickelt und in einer Kombination der o. g. Strategien eine Aminooxygruppe anstelle einer Ankergruppe in die Seitenkette der C-terminalen Aminosäure eingeführt. Mit der Aminooxygruppe können nun nachträglich beliebige aldehyd- oder ketofunktionalisierte Moleküle über Oximligation angebunden werden. Diese Reaktion verläuft in guten Ausbeuten und ist chemoselektiv; sie kann also auch an Peptiden ohne Schutzgruppen (also nach TFA-Behandlung und HPLC-Trennung) durchgeführt werden.

Die Synthesen der jeweiligen Moleküle sind nach aufsteigender Komplexität angeordnet. Zuerst werden die einzelnen Bausteine beschrieben. Darauf folgen die funktionalisierten monomeren RGD-Peptide und anschließend die nichtfunktionalisierten und die funktionalisierten verzweigten RGD-Peptide. Die heterodimeren Zelladhäsionspeptide finden sich in einem eigenen Kapitel am Schluss.

6.3 Bausteine: Cyclopeptid, Spacer und Verzweigungseinheit

6.3.1 Cyclopeptide

6.3.1.1 Synthese

Die Synthese der Cyclopentapeptidpeptide erfolgte nach der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode: Zuerst wird das lineare Pentapeptid an der Festphase nach Fmoc-Strategie aufgebaut, dann wird es unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen vom Harz abgespalten (Abb. 27), in Lösung cyclisiert und anschließend werden die permanenten Schutzgruppen abgespalten. Soll das Peptid, wie in dieser Arbeit, über eine bestimmte Aminosäureseitenkette weiter funktionalisiert werden, wird an dieser Seitenkette eine Schutzgruppe benötigt, die sich selektiv unter Erhalt der anderen Schutzgruppen abspalten lässt.

Generell ist es günstig das lineare Peptid so aufzubauen, dass sich die C-terminale Aminosäure bei der Cyclisierung racemisierungsfrei aktivieren und koppeln lässt.^[378] Daher wurde bei der Syntheseplanung der RGD-Peptide das achirale Glycin als C-terminale Aminosäure gewählt. Für die RAD-Peptide wurde Alanin als C-terminale Aminosäure verwendet.

Die linearen Peptide H-D(O*t*Bu)fK(Z)R(Pbf)G-OH (**34**), H-D(O*t*Bu)fK(Z)R(Pbf)A-OH (**35**), H-D(O*t*Bu)fE(OBzl)R(Pbf)G-OH (**36**) und H-D(O*t*Bu)fE(OBzl)R(Pbf)A-OH (**37**) werden am TCP-Harz synthetisiert. Die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure (Gly bzw. Ala) erfolgt ohne Aktivierungsreagenzien unter Basenzusatz und anschließendem *cappen* der unumgesetzten Tritylchloridgruppen mit Methanol.

Als temporäre N-Schutzgruppe wurde für alle Aminosäuren die Fmoc-Schutzgruppe verwendet. Als permanente Seitenkettenschutzgruppen dienten Pbf für Arginin sowie der O*t*Bu für Aspartat. Orthogonal zu den sauer abspaltbaren Schutzgruppen wurde die Carbamat-Schutzgruppe Benzyloxycarbonyl- (Z) für die Seitenketten-Aminogruppe des Lysin sowie der Benzylester (OBzl) für die Seitenketten-Carboxylgruppe des Glutamats eingesetzt. Letztere Schutzgruppen lassen sich hydrogenolytisch in Anwesenheit von Pd auf Aktivkohle als Katalysator selektiv abspalten, ohne dass die TFA-labilen Schutzgruppen angegriffen werden.

Die Synthese der linearen Peptide erfolgte mit TBTU (*O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluoroborat)^[379, 380] als Kupplungsreagenz unter Zusatz von HOBt^[381, 382] in Anwesenheit der Base DIPEA (Diisopropylethylamin, Hünigs Base) bzw. Collidin. Die schwächere Base Collidin wurde bei der Kupplung des D-Phenylalanins an H-Glutamat(OBzl)-R verwendet. H-Glutamat(OBzl)-R kann unter stark basischen Bedingungen zu Pyroglutamat cyclisieren^[361] und entstand bei Kupplungen mit DIPEA bis zu 50 % als Nebenprodukt (Abb. 35).

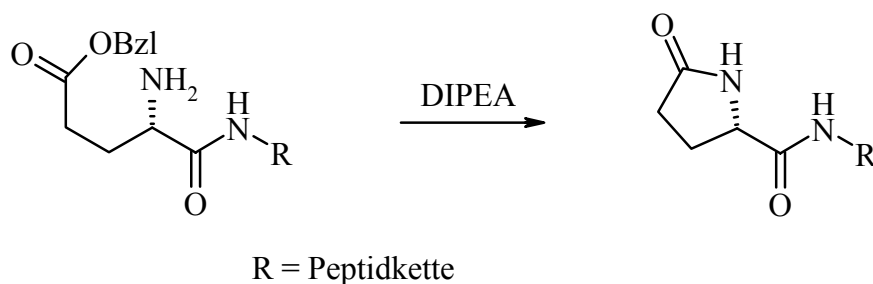


Abb. 35: Bildung von Pyroglutamat aus H-Glu(OBzl)-R unter basischen Bedingungen.

In der Literatur wird empfohlen, bei der Fmoc-Entschützung von N-Fmoc-Glu(OBzl)-R die übliche 20 % Piperidinlösung (5 und 10 min Reaktionszeit) zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe gegen 50 % Piperidin (zweimal 1 min) auszutauschen.^[361] Diese Methode hatte jedoch hier keinen Einfluss auf die Bildung des pyER(Pbf)G-OH. Durch die Verwendung der schwächeren Base Collidin beim nächsten Kupplungsschritt konnte der Gehalt an Nebenprodukt auf ca 5 % gesenkt werden. Es stört im weiteren Verlauf wenig, da es bei der Cyclisierung kaum mit dem linearen Pentapeptid koppelt und bei der Aufarbeitung nach Cyclisierung aufgrund seiner Löslichkeit ausgewaschen wird.

Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe wird das Peptid durch eine Mischung aus AcOH/TFE/DCM 3:1:6 vom Harz unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen abgespalten.

Zur Cyclisierung sind Bedingungen erforderlich, die eine intramolekulare Reaktion (Cyclisierung) gegenüber einer intermolekularen Reaktion (Oligomerisierung) begünstigen. Sie erfolgt zweckmäßig in hoher Verdünnung bei einer Peptidkonzen-

tration von $5 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ in DMF. Als Aktivierungsreagenz wird Diphenylphosphorylazid (DPPA) eingesetzt, das *in situ* den C-Terminus des linearen Peptids in ein aktives Carbonsäureazid überführt und nur eine geringe Tendenz zur Racemisierung aufweist.^[383, 384] Als Base wird festes NaHCO₃ im Lösungsmittel suspendiert. Eine Deprotonierung des C-Terminus ist nur an der Oberfläche des Feststoffes möglich, so dass dadurch die Konzentration an reaktivem Peptid zusätzlich verringert wird (Pseudoverdünnung), was die intramolekulare Cyclisierung deutlich begünstigt.^[385] Durch die strukturinduzierende D-Aminosäure und den sterisch wenig gehinderten C-Terminus erfolgt die Cyclisierung relativ schnell, was die Racemisierungstendenz des C-Terminus weiter verringert. Der Umsatz kann mittels analytischer HPLC überwacht werden; im Falle der verwendeten Peptide war die Reaktion in weniger als 24 h beendet.

Durch Hydrierung der benzylicischen Schutzgruppen mit Palladium auf Aktivkohle als Katalysator in N,N-Dimethylacetamid (DMAc) wurden die Seitenketten von Lysin und Glutamat entschützt.

Es wurden die partiell entschützten Peptide *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fK-] (**Z1***), *cyclo*[-R(Pbf)AD(OtBu)fK-] (**Z2***), *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) und *cyclo*[-R(Pbf)AD(OtBu)fE-] (**Z4***) erhalten, welche über die freie Aminogruppe des Lysins bzw. die Carboxylgruppe der Glutaminsäure weiter funktionalisiert werden können.

Die nach dieser Methode hergestellten partiell entschützten Peptide fielen in Ausbeuten von 48-67 % bezogen auf die anfangs gravimetrisch ermittelte Harzbelegung an. Die Reinheit der Peptide war gemäß analytischer HPLC sehr hoch, so dass die Cyclopeptide direkt zur Fragmentkupplung eingesetzt werden konnten. Die nach bisherigen Verfahren auftretende Graufärbung der Peptide nach der Hydrierung durch Spuren von Aktivkohle konnte beseitigt werden, indem als Lösungsmittel beim Abfiltrieren des Katalysators anstelle von Methanol ein Acetonitril/Wassergemisch verwendet wurde. Durch die polaren Wassermoleküle agglomerieren die Kohlepartikel und werden so nicht kolloidal gelöst durch den Filter gezogen.

Die Synthese der Peptide ist im Gramm-Maßstab möglich.

Zur Herstellung von *cyclo(-RGDfK-)* (**9 = Z1**), *cyclo(-RADfK-)* (**Z2**), *cyclo(-RGDfE-)* (**Z3**) und *cyclo(-RADfE-)* (**Z4**) wurden die permanenten Seitenketten-Schutzgruppen der teilgeschützten Peptide **Z1*-Z4*** mit 95 % TFA abgespalten und die Peptide mittels präparativer HPLC gereinigt.

Prinzipiell ist der Aufbau eines Cyclopeptids und die Funktionalisierung der Seitenkette der Aminosäure in Pos. 5 unter Verwendung orthogonaler Schutzgruppen auch komplett an der Festphase möglich. Das wurde für das Peptid *cyclo(-RGDfK-)* (**Z1**) bereits beschrieben.^[386] Ausgehend von Seitenketten-immobilisiertem orthogonal geschützten Aspartat Fmoc-Asp(OH)-OAll wurde das lineare Peptid Fmoc-fK(Dde)R(Pbf)GD(TCP-Tentagelharz)-OAll aufgebaut. Nach Freisetzung von C- und N-Terminus wurde cyclisiert und anschließend nach Entschützung der Lysinseitenkette mit einem Farbstoff funktionalisiert. Die Autoren machen allerdings keine Angaben über die Racemisierung des Aspartats und Dimerisierung mit einer anderen Peptidkette. Im Falle von **Z3*** würde sich die reizvolle Möglichkeit bieten, das Peptid über die Carboxylgruppe der Glutamatseitenkette am Harz anzubinden. Nach Aufbau des linearen Peptids und Cyclisierung erhielt man nach Abspaltung vom Harz gleich das Peptid **Z3*** mit dem richtigen Schutzgruppenmuster (Abb. 36).

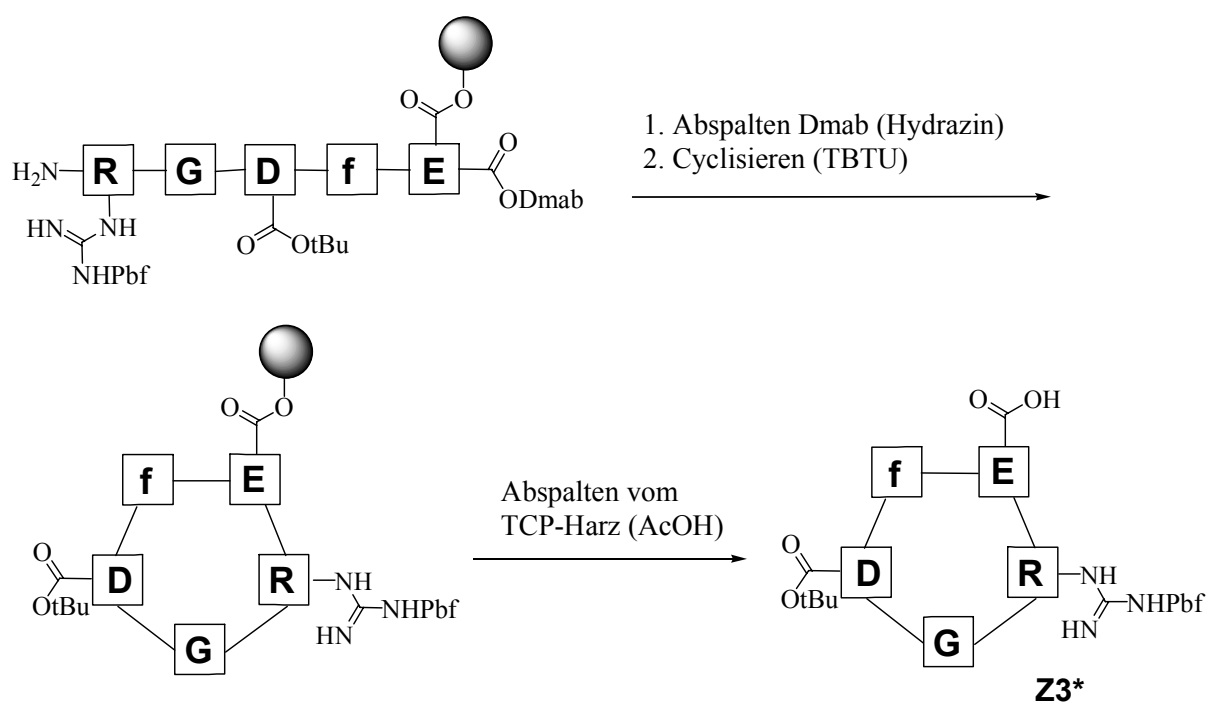


Abb. 36: Aufbau des teilentschützten Cyclopeptids **Z3*** am Harz.

Bei einem entsprechenden Versuch wurde jedoch neben **Z3*** hauptsächlich das Cyclo-dekapeptid *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fER(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z5***) (und das Cyclo-nonapeptid *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fEGD(OtBu)fE-] (**Z6***) wegen einer unvollständigen Kupplung) durch die Reaktion mit benachbarten Peptidketten erhalten. Der Gehalt an Dimer ließe sich durch eine geringere Belegung des TCP-Harzes oder durch die Verwendung längerer PEG-Linker am Harz (TCP-Tentagelharz) zurückdrängen.^[387] Da die dazu benötigte Harzmenge aber kaum mehr technisch handhabbar bzw. extrem teuer wäre und wahrscheinlich eine präparative HPLC-Trennung des Produkts notwendig würde, wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

6.3.1.2 Fragmentkupplung

Die Methoden der Fragmentkupplung des Cyclopeptids an die jeweiligen Anker- bzw. Gerüstmoleküle sind für alle folgenden Peptide ähnlich und werden hier beschrieben.

Ausgangspunkt für die Fragmentkupplung war ein von *M. Kantlehner* entwickeltes Protokoll für die Kupplung eines C-terminalen Fragments mit teilgeschütztem *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fK-] (**Z1***) in Lösung.^[284] Danach wird zunächst der C-Terminus mit 0.97 eq HATU, 1.1 eq HOAt, und 10 eq Collidin 2 h voraktiviert und anschließend mit dem teilentschützten Cyclopeptid umgesetzt. Dieses Verfahren vermeidet die Guanylierung des N-Terminus, die sonst die langsamere Fragmentkupplung dominieren kann.

Das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Peptid *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) wurde zur Fragmentkupplung in Anlehnung an das obige Protokoll mit HATU/HOAt/Collidin 2 h voraktiviert. In einer Testkupplung wurden 1.5 eq des voraktivierten Cyclopeptids mit einem an der Festphase aufgebauten dimeren Gerüstmolekül umgesetzt und 12 h reagieren gelassen. Die Kupplung erfolgte laut HPLC-MS nahezu quantitativ. Alternativ wurde zum Kuppeln DIC/HOBt/DIPEA verwendet. Die Fragmentkupplung nach dieser Methode erfolgte allerdings langsamer und wurde nicht weiter angewendet.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass eine zweistündige Voraktivierung mit HATU großzügig bemessen ist. Im Falle der Fragmentkupplung an das Monomer

H-Hegas-[Cys(Trt)]₃-TCP ohne Voraktivierung konnte die Bildung von guanyliertem N-Terminus als Nebenprodukt nicht beobachtet werden. Das Aktivierungsreagenz kommt bei der Fragmentkupplung am Harz wahrscheinlich schneller mit dem in Lösung vorliegenden Cyclopeptid in Kontakt als mit dem an der Festphase immobilisierten N-Terminus. Da das Kupplungsprotokoll nicht für jedes der erzeugten Gerüstmoleküle optimiert werden konnte und besonders für die größeren Gerüstmoleküle langsamere Kupplungen zu erwarten sind, wurde mit HATU generell 2 h voraktiviert. Gemäß Literaturangaben wird der N-Terminus nicht modifiziert durch die Phosphonium-basierenden Kupplungsreagenzien BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat) und PyBOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat).^[388] In Testversuchen erwies sich die Fragmentkupplung mit PyBOP/HOBt/Collidin 1/1/10 ohne Voraktivierung als genauso effektiv wie die Fragmentkupplung mit HATU und Voraktivierung. PyBOP ist weiterhin in NMP viel besser löslich als HATU, was besonders für die Herstellung konzentrierter Kupplungslösungen wichtig ist und mit HATU teilweise Probleme bereitete. Daher wurde die Fragmentkupplung auf PyBOP umgestellt. BOP wurde wegen der entstehenden giftigen Phosphoramide nicht verwendet.

Bei den Synthesen der einzelnen Verbindungen wird in vielen Fällen die Fragmentkupplung mit HATU beschrieben. Das bedeutet jedoch nicht, dass diese Art der Aktivierung optimal ist, sondern dass zum Zeitpunkt der entsprechenden Synthese noch nicht auf das PyBOP-Verfahren umgestellt war.

Das Peptid **Z1*** konnte mit Essigsäureanhydrid/Pyridin/DMAP ohne Probleme acetyliert werden. *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fK(Ac)-] (**Z7***) wurde nach Abspalten der Schutzgruppen mit 95 % TFA und HPLC-Reinigung als Modellverbindung **Z7** im Integrin-Affinitätsassay getestet.

Die Kupplung von **Z3*** mit Propylamin zum *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fE(N-propyl)-] (**Z8***) erfolgte mit dem oben erwähnten System DIC/HOBt/DIPEA ohne Schwierigkeiten. Nach Abspalten der Schutzgruppen mit 95 % TFA und HPLC-Reinigung wurde das Peptid *cyclo*[-RGDfE(N-propyl)-] (**Z8**) ebenfalls als Modellverbindung im Integrin-Affinitätsassay getestet.

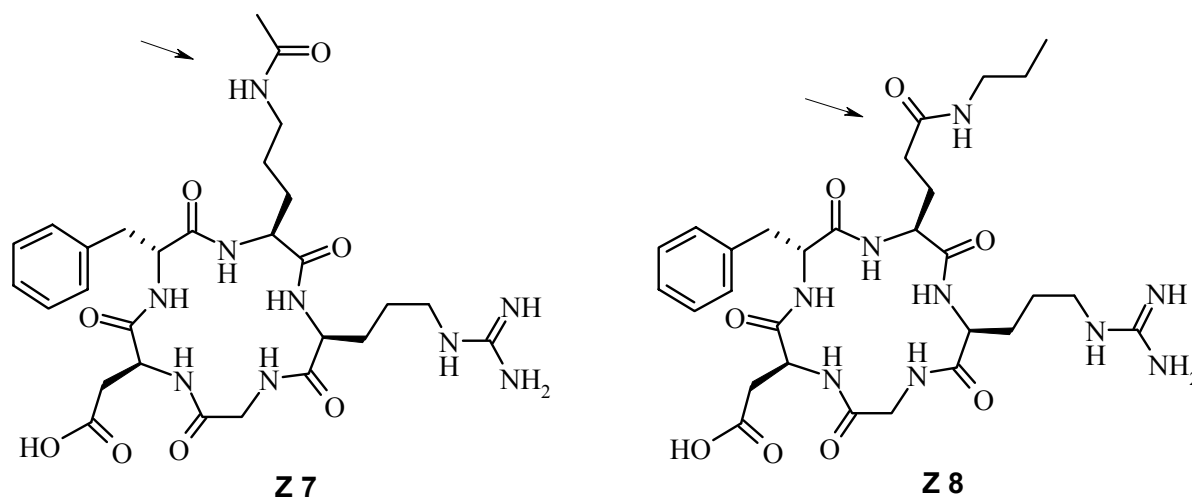


Abb. 37: Die an Position 5 amidisch verknüpften Derivate **Z7** und **Z8** dienen als Modellverbindungen für die mit größeren Molekülen verknüpften Cyclopeptide im Integrinaffinitäts-assay.

6.3.1.3 Evaluierung

In dem $\alpha\beta 3$ -hochaffinen und selektiven Peptid *cyclo*(-RGDfV-) (**2**) kann das Valin (Position 5) gegen verschiedene Aminosäuren ohne nennenswerten Affinitäts- und Selektivitätsverlust ausgetauscht werden kann (Kap. 2.2). Das Peptid Biotin-Ahx-*cyclo*(-RGDfK-) (**39**) zeigt eine dem *cyclo*(-RGDfK-) vergleichbare inhibitorische Aktivität in einem Zellaggregationsassay^[90] und das Dimer Suc[*cyclo*(-RGDfK-)]₂ (**38**) weist sogar eine leicht erhöhte Integrinaffinität auf.^[89] Man kann also davon ausgehen, dass nahezu jedwede Substitution der Aminosäure in Position 5 und eine weitere Verknüpfung darüber mit einem beliebigen Molekül die Integrinaffinität und -selektivität nicht beeinflussen sollte. Das ist jedoch kein Beweis für die Affinität der entsprechend derivatisierten Peptide und so wurden aus systematischen Gründen zunächst das bisher nicht getestete Peptid *cyclo*(-RGDfE-) (**Z3**), sowie die amidischen Derivate **Z8** und **Z7** untersucht. Auch die Verbindungen **Z5** und **Z6** wurden in den Test einbezogen. Für die Affinitätsuntersuchungen wird die Verdrängung (Inhibierung) des natürlichen Liganden Vitronectin durch die Peptide an isolierten immobilisierten $\alpha\beta 3$ -Integrinen gemessen (Tab. 6).^[1] Die Affinität der Peptide ist umso höher, je kleiner der Wert für die halbmaximale Inhibierungskonzentration (IC₅₀) ist.

Tabelle 6: IC_{50} -Werte der Cyclopeptide **Z1** - **Z8**.

Nr.	Peptid	IC_{50} [nM] $\alpha v\beta 3$ (Vn)	Ref.
2	<i>cyclo</i> (-RGDfV-)	2.2	Dissertation Haubner
Z1	<i>cyclo</i> (-RGDfK-)	4.2	Dissertation Haubner
Z1	<i>cyclo</i> (-RGDfK-)	18	Merck Datenbank
Z1	<i>cyclo</i> (-RGDfK-)	18	diese Arbeit / Merck
Z2	<i>cyclo</i> (-RADfK-)	68 % Inhib., 10^{-5} M	
Z3	<i>cyclo</i> (-RGDfE-)	24	diese Arbeit / Merck
Z4	<i>cyclo</i> (-RADfE-)	53 % Inhib., 10^{-5} M	diese Arbeit / Merck
Z5	<i>cyclo</i> (-RGDfERGDfE-)	95 % Inhib., 10^{-5} M	diese Arbeit / Merck
Z6	<i>cyclo</i> (-RGDfEGDfE-)	48 % Inhib., 10^{-5} M	diese Arbeit / Merck
Z7	<i>cyclo</i> [RGDfK(Ac)]	16	diese Arbeit / Merck
Z8	<i>cyclo</i> [-RGDfE(N-propyl)]	23	diese Arbeit / Merck

Wie erwartet sind die IC_{50} -Werte der RGD-Peptide **Z1**, **Z3**, **Z7**, **Z8** ähnlich bzw. etwas höher als für das Stammpeptid **2**. Der IC_{50} -Wert von 4.2 nM für **Z1** aus der Dissertation von *R. Haubner* konnte nicht reproduziert werden.

In Arbeiten von *Pierschbacher et al.* konnte gezeigt werden, dass in größeren RGD-Cyclopeptiden ein zweites Arginin wichtig für die Integrinaffinität sein kann.^[88] Auch aus den Ergebnissen von *modelling*-Studien von Kay Gottschalk aus unserer Arbeitsgruppe kann man eine weitere Bindungstasche für ein zusätzliches Arginin ableiten. Zumindest mit Peptid **Z5** wurde diese Tasche anscheinend nicht erreicht.

Die Peptide *cyclo*(-RGDfK-) (**Z1**) und *cyclo*(-RADfK-) (**Z2**) wurden in der Arbeitsgruppe *Prof. Göpferich* (Universität Regensburg) zur RGD-Funktionalisierung des bioabbaubaren aminofunktionalisierten Polymers Amino-PEG-co-PLA^[259] verwendet. Die Peptide werden dabei an die Aminogruppen der PEG-Ketten über einen Bis-Aktivester angebunden. Die Adhäsion humaner Osteoblasten konnte durch **Z1** signifikant verbessert werden (Abb. 38).^[389]

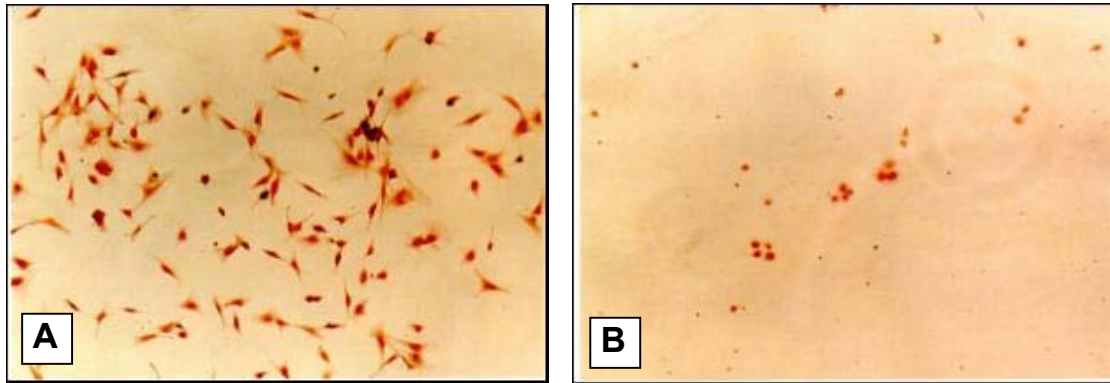


Abb. 38: Adhäsion humaner Osteoblasten an mit den Cyclopeptiden **Z1** und **Z2** funktionalisierte Polymeroberflächen. **A** Die Zahl der adhärenierten Osteoblasten wird durch das Peptid **Z1** signifikant erhöht, die Zellen weisen eine gespreitete Morphologie auf. **B** Auf der mit der Negativkontrolle **Z2** beschichteten Oberfläche sind deutlich weniger Osteoblasten zu sehen, die darüberhinaus kaum gespreitet vorliegen. Diese Versuche wurden von M. Hacker und E. Lieb durchgeführt.

6.3.2 Spacer

Für die *spacer*-Aminosäure war zunächst keine bestimmte molekulare Grundlage vorgegeben, sie sollte lediglich folgenden Anforderungen genügen:

- große Länge (mehrere 10 Å)
- Länge soll exakt definiert sein
- Syntheseaufwand vertretbar
- wasserlöslich
- biologisch inert
- nicht zu flexibel (Entropie!)

Diese Vorgaben schränken die Wahlmöglichkeiten jedoch stark ein. *Spacer* auf der Basis von längeren Alkylketten kommen z. B. nicht in Frage, da sie mit Peptiden unlösliche Präzipitate bilden.^[390] Als Grundlage für die Spaceraminosäure wurde Polyethylenglykol gewählt. Es erfüllt die Anforderungen relativ gut, ist allerdings sehr flexibel. Denkbar wäre weiterhin noch Polyglycin, welches durch die Amidbindungen etwas starrer aber auch leichter abbaubar ist.

Kommerziell erhältlich ist 8-(N-Fmoc)-amino-3,6-dioxaoctansäure (**40**), welche aber für die Anforderungen hier eher zu kurz und auch extrem teuer ist. Daher wurde die Spaceramino-säure ausgehend von Hexaethylenglycol (**41**), dem längsten kommerziell verfügbaren Polyethylenglycol mit definierter Länge, selber synthetisiert. Da die längeren Polyethylenglycole in der Dünnschichtchromatographie und in der Säulenchromatographie zum Verschmieren neigen, wurde zunächst eine Synthese auf der Basis von Tetraethylenglycol (**42**) ausgearbeitet, welche dann auf **41** übertragen wurde.

Im ersten Reaktionsschritt wurde das Ethylenglycol nach *Jullien* und *Lehn* mit einem Diazoessigsäureester und $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ umgesetzt.^[391] Dadurch wird eine geschützte Säurefunktion eingeführt und gleichzeitig der Spacer verlängert (Abb. 39). Hier wurde der hydrophobere Diazoessigsäure-*tert.*-butylester (**43**) anstelle des oft verwendeten Ethylesters eingesetzt, um das Ausschütteln zu vereinfachen (Verringerung der Hydrophilie). Außerdem lässt sich im weiteren Verlauf der *tert.*-Butylester in Gegenwart der N-Fmoc-Schutzgruppe einfacher abspalten. Da **43** (und die Vorstufe Glycin-*tert.*-butylester **46**) relativ teuer ist, wurde die Verbindung nach modifizierten Vorschriften von *Vollmar et al.*^[392] und *Skinner et al.*^[393] nach folgendem Reaktionsschema hergestellt:

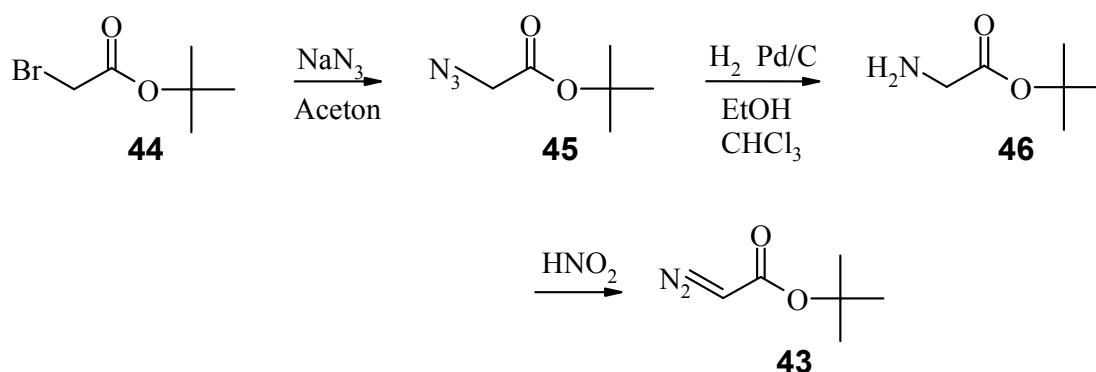


Abb. 39: Synthese von Diazoessigsäure-*tert.*-butylester (**43**).

Im zweiten Reaktionsschritt sollte am Ethylenglycol mit Brom-Acetonitril der Stickstoff für die Aminogruppe eingeführt werden und wiederum der *spacer* um eine

weitere Ethoxyeinheit verlängert werden. Es wurde aber unter den verwendeten Bedingungen nur ein komplexes Produktgemisch erhalten, wahrscheinlich wegen der Reaktivität der aciden C_{α} -Protonen der Estergruppe. In einem anderen Ansatz wurde zuerst das Ethylenglycol mit Brom-Acetonitril verlängert, welches anschließend mit Diazoessigsäure-*tert.*-butylester umgesetzt werden sollte. Da sich aber die Glycol-derivate aufgrund der guten Wasserlöslichkeit nur extrem schlecht aufarbeiten und trennen ließen und bei der Umsetzung mit **43** wegen der aciden C_{α} -Protonen der Cyanogruppe schlechte Ausbeuten zu erwarten gewesen wären, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Die Aminogruppe wurde schließlich konventionell über Tosylierung nach *Yoshida et al.* mit Triethylamin und katalytischen Mengen Trimethylammoniumchlorid,^[394] Azidierung mit NaN_3 bzw. $\text{TMSN}_3/\text{TBAF}$ ^[395] und katalytische Hydrierung hergestellt. Die Aminogruppe wurde mit Fmoc-Chlorid geschützt und schließlich der *tert.*-Butylester mit TFA abgespalten. Bei der Umsetzung des Amins mit Fmoc-Chlorid in THF und 10 %iger Na_2CO_3 -Lösung wurde bereits ein Teil der N-Fmoc-Gruppe wieder abgespalten, weshalb bei späteren Reaktionen die 10 %ige Na_2CO_3 -Lösung durch ges. NaHCO_3 -Lösung ersetzt wurde. Der *tert.*-Butylester konnte durch 90 %ige TFA in 30 min abgespalten werden. Die verschiedenen Zwischenprodukte wurden jeweils durch Flashchromatographie gereinigt und NMR-spektroskopisch charakterisiert.

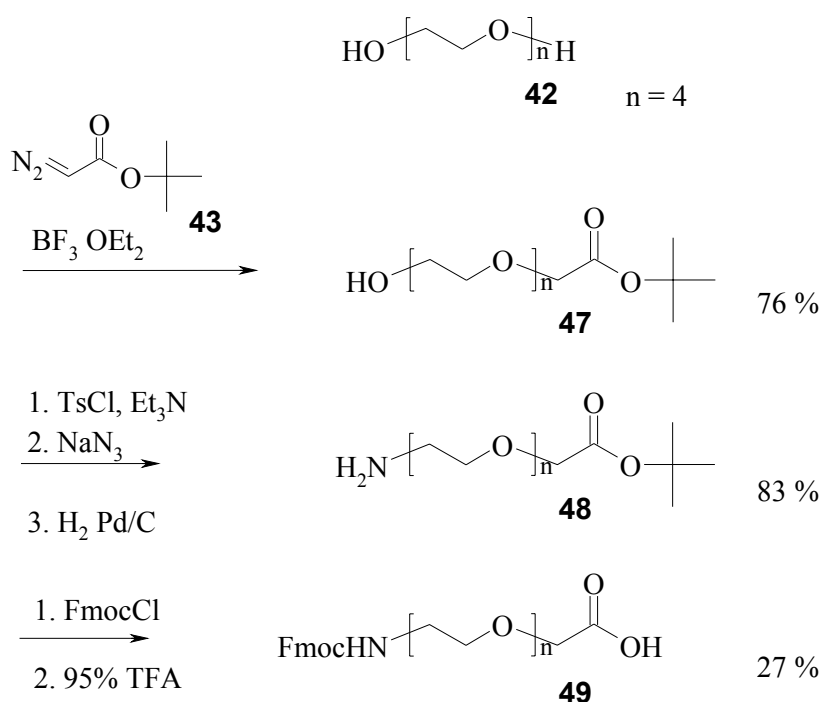


Abb. 40: Synthese von 14-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12-tetraoxatetradecansäure (**49**).

Diese für **49** ausgearbeitete Synthese wurde auf die Synthese der auf Hexaethylenglycol basierenden 20-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaeicosansäure (Fmoc-Heptaethylenglycolaminosäure, Fmoc-Hegas-OH **50**) übertragen. Für die Azidierung wurde trotz der etwas schlechteren Ausbeute (91 % vs. 99 %) das in größeren Mengen leichter handhabbare NaN₃ anstelle von TMSN₃ gewählt. Zusätzlich wurde versucht, auf chromatographische Reinigungsmethoden zur Herstellung von Fmoc-Hegas zu verzichten und eine Aufreinigung nur durch Ausschütteln zu erzielen. Dieses Vorgehen bietet sich hier an, da sich zum einen die Ethylenglycolderivate je nach Funktionalisierung besser in der wässrigen oder in der organischen Phase lösen und eine amino- und eine carboxylfunktionalisierte Stufe auftritt, die sich sauer bzw. basisch extrahieren lässt.

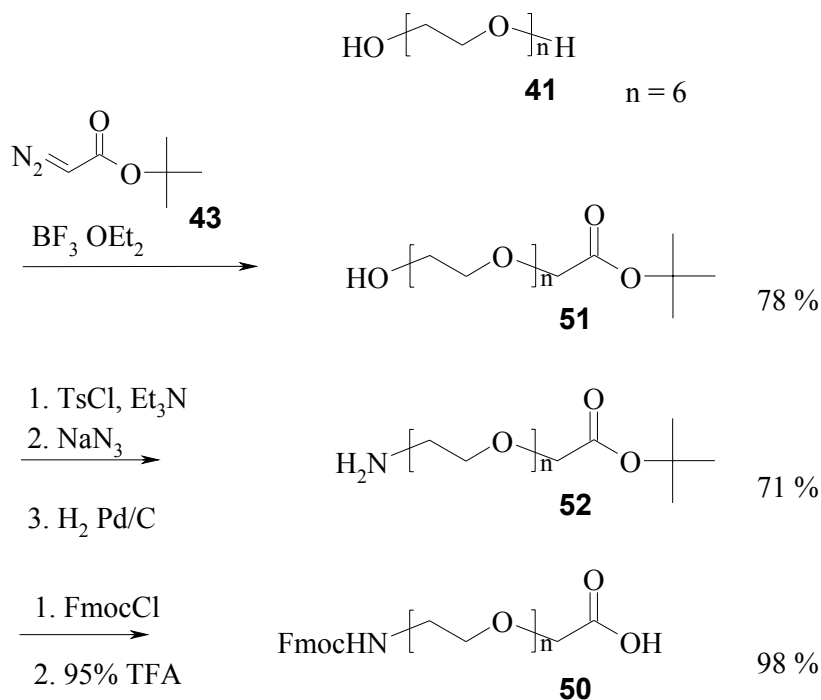


Abb. 41: Synthese von Fmoc-Hexas-OH (50).

Im ersten Schritt nach der Umsetzung von Hexaethylglycol (41) mit 43 entsteht der einfach umgesetzte *tert.*-Butylester 51, sowie doppelt umgesetztes Produkt. Setzt man 41 in größerem Überschuss ein, kann man die Menge an doppelt umgesetztem Produkt verringern, erhält jedoch größere Mengen an unumgesetzten 41. In der Praxis wurde, auch aufgrund des relativ hohen Preises, nur die dreifache Menge an 41 eingesetzt, was, bezogen auf die Zahl der Hydroxylgruppen, einem sechsfachen Überschuss entspricht. Mono- und disubstituiertes Produkt entstehen laut $^1\text{H-NMR}$ etwa im Verhältnis 10/1. Die geringen Mengen doppelt umgesetzten Produkts stören im weiteren Reaktionsverlauf nicht. Unumgesetztes 41 muss jedoch entfernt werden, um eine einigermaßen verlässliche Stöchiometrie für die Tosylierung zu erhalten und DC-Kontrolle zu ermöglichen. Bei der Extraktion mit DCM, was ein sehr gutes Lösungsmittel für Polyethylenglycole ist, geht nur wenig 41 in die wässrige Phase über. Verwendet man Essigester als organische Phase, findet man dagegen neben 41 auch teilweise 51 in der wässrigen Phase. Als ideal für die Extraktion stellte sich eine Mischung Essigester/DCM 3:1 für die organische Phase heraus, die durch Ausschüt-

teln mit ges. NaCl-Lösung von **41** befreit werden kann. Schüttelt man das Produktgemisch mit Cyclohexan/Wasser aus, findet man in der organischen Phase eine Anreicherung des doppelt umgesetzten Produkts; das Zielmolekül **51** befindet sich jedoch dabei sowohl in der wässrigen als auch in der organischen Phase.

Nach der katalytischen Hydrierung, kann man das Amin **52** mit 1 N KHSO₄-Lsg. in die wässrige Phase ziehen und, nach basisch machen mit K₂CO₃, durch Extraktion mit Chloroform wieder in die organische Phase überführen. Dieser letzte Schritt funktioniert nicht mit Essigester als organischem Lösungsmittel. Auf der letzten Stufe lässt sich analog die Säure Fmoc-Hegas-OH (**50**) mit ges. NaHCO₃-Lsg. in die wässrige Phase ziehen. Als organische Phase dient diesmal Diethylether, dem soviel DCM zugesetzt wird, dass die organische Phase klar ist und das Produkt gelöst ist. Bei der Verwendung von Essigester als organischer Phase entstehen Spuren von Essigsäure, die besonders später bei der Synthese der verzweigten Moleküle extrem stören. Das Ausschütteln muss sehr vorsichtig erfolgen, sonst bildet sich ein Gel. Durch Ansäuern der wässrigen Phase kann man **50** wieder aus der wässrigen Phase extrahieren. Zum Ansäuern geht man zweckmäßigerweise so vor, dass man zuerst einen Spatel KHSO₄ zugibt und anschließend mit so viel halbkonzentrierte HCl versetzt, bis das Produkt ausfällt. Das KHSO₄ verfügt über eine gewisse Pufferwirkung und durch die halbkonzentrierte HCl lässt sich das Ansäuern relativ schnell und ohne übermäßige Schaumentwicklung durchführen. Nach Aufnahme mit Ether/DCM und nochmaligem Durchlaufen diesen Extraktionszyklus erhält man, laut HPLC, DC und NMR sauberes **50**. Im HPLC-MS kann man erkennen, dass geringe Mengen an Produkt mit einer Ethoxyeinheit mehr und einer Ethoxyeinheit weniger enthalten sind. Diese wahrscheinlich aus dem Polymerisationsprozess zur Herstellung von Hexaethylenglycol stammenden Isomere können auch durch präparative HPLC schlecht abgetrennt werden. Sie sind bei der Synthese monomerer RGD-Peptide nicht von Bedeutung, reichern sich aber in den verzweigten Molekülen an und verbreitern die Signale in der HPLC.

Insgesamt erhält man Fmoc-Hegas-OH (**50**) als leicht gelbliches Öl nach sechs Stufen in einer Gesamtausbeute von 54 % bezogen auf eingesetzten Diazoessigsäure-*tert.*-butylester (**43**).

50 verliert bei längerem Lagern teilweise die Fmoc-Schutzgruppe, weshalb es sinnvollerweise bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wird. Die Peptidkupplungen von Fmoc-Hegas werden wegen dieser Labilität immer mit Collidin als Base durchgeführt.

Die kalkulierte Länge (Programm Sybyl 6.9) des Hegas-*spacers* beträgt im gestreckten Zustand 25 \AA .

6.3.3 Verzweigungseinheit

Als Verzweigungseinheit wurde 3,5-Di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (**53**) gewählt. In Form ihres Boc-Derivates **30** (Abb. 42) wurde dieser Abkömmling der α -Resorcylnsäure bereits von *Mulder et al.* in der Dendrimersynthese eingesetzt.^[371] Durch das substituierte Benzoesäure-Grundgerüst wird die UV-Detektion (HPLC, DC) und durch die Symmetrie die Auswertung der NMR-Messungen vereinfacht. Dieser Baustein sollte als Fmoc-Derivat in der Peptid-Festphasensynthese eingesetzt werden.

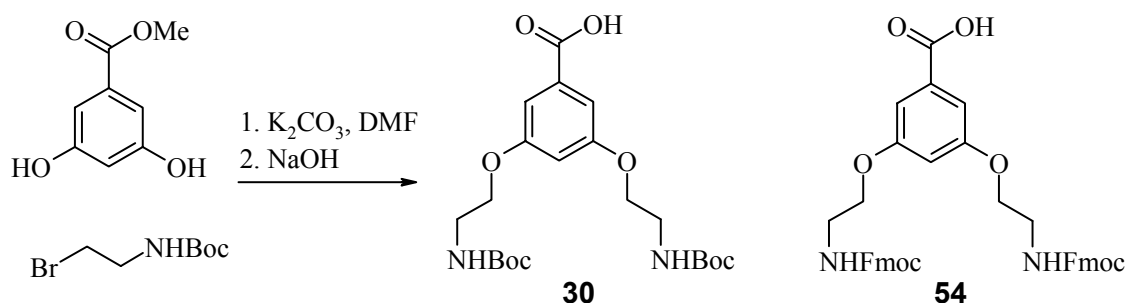


Abb. 42: Synthese der Boc-geschützten 3,5-Di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (**30**). Die entsprechende Fmoc-Verbindung **54** sollte analog synthetisiert werden.

Die Synthese von **54** stellte sich jedoch als schwierig heraus:

- Die Nukleophilie der Carboxylgruppe im Basischen (K_2CO_3 in DMF) ist höher als die der Phenolgruppen. Die Carboxylgruppe muss also geschützt oder maskiert eingesetzt werden.
- Die Carboxylgruppe kann nicht als Methyl ester geschützt eingesetzt werden. Im Gegensatz zu aliphatischen Aminosäuren ist der Methyl ester nur unter stark

basischen Bedingungen verseifbar, bei denen auch die Fmoc-Gruppe abgespalten wird.

- Die Carboxylgruppe kann nicht maskiert als Hydroxygruppe eingesetzt werden, da der Benzylalkohol dieses elektronenreichen Aromats nur schwierig zu oxidieren ist.^[396]
- Die Diaminoverbindung ohne N-Schutzgruppen ist extrem wasserlöslich und komplexiert Metallionen (z. B. nach Reduktion der entsprechenden Cyanoverbindung mit komplexen Hydriden) und ist somit schwer zu isolieren.
- Die Fmoc-Schutzgruppe kann erst nach der Substitution der Phenolgruppen eingeführt werden, das das Phenolat basisch genug ist, um die Fmoc-Gruppen abzuspalten.
- Die Bis-Fmoc-Derivate sind alle schwerlöslich und schwer zu chromatographieren.

Die Synthese von **54** gelang ausgehend vom N,N'-Bis-Boc-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäuremethylester (**55**), welcher verseift und entschützt wurde und anschließend mit FmocCl umgesetzt wurde (Abb. 43).

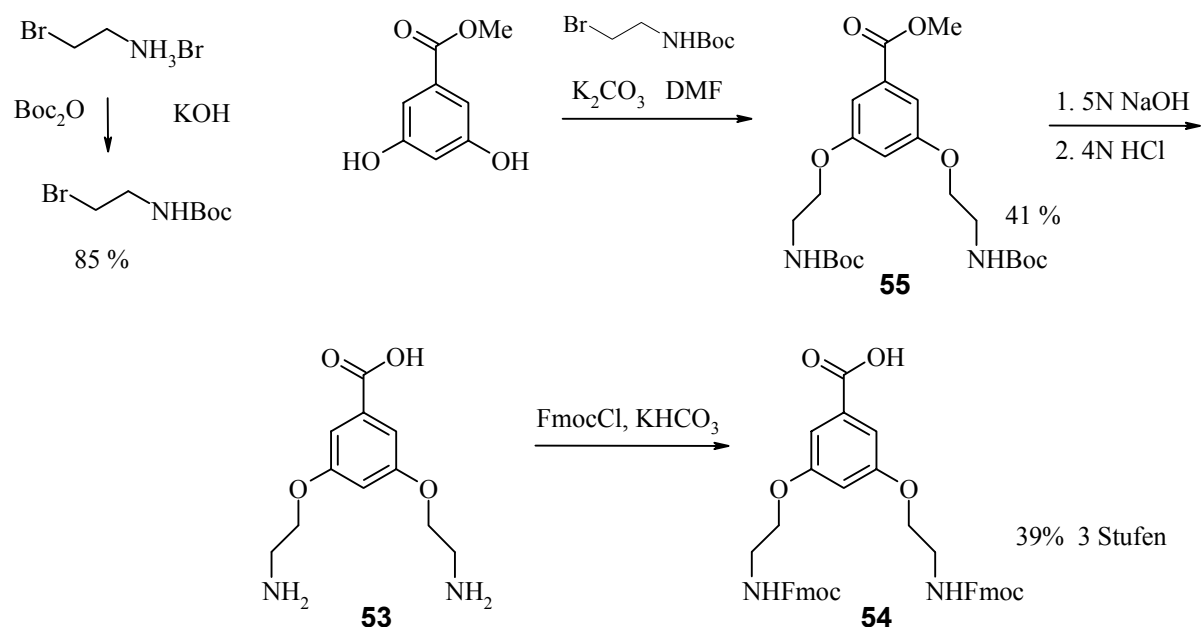


Abb. 43: Synthese von N,N'-Bis-Fmoc-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (**54**).

Die Synthese verläuft, ausgehend von kommerziell erhältlichen Ausgangsprodukten in fünf Stufen. Die Gesamtausbeute ist nicht hoch und die Aufreinigung des Zielmoleküls mittels Flashchromatographie ist schwierig, weil dieses Produkt in den gängigen Lösungsmitteln nur schwer löslich ist. Daher wurde als Alternative zur Fmoc-Schutzgruppe die Teoc(Trimethylsilyloxycarbonyl)-Schutzgruppe gewählt. Teoc ist stabil gegenüber starken Basen und kann mit Fluorid-Ionen abgespalten werden.^[397] Ausgehend von 2-Trimethylsilylethyl-p-nitrocarbonat (**56**) (Trimethylsilylethylloxycarbonyl-O-nitrophenol, Teoc-O-Np)^[398, 399] gelang die Synthese von Bis-(N,N'-Teoc)-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (Bis-Teoc-Dab-OH, **59**) in drei Stufen in guten Ausbeuten (Abb. 44).

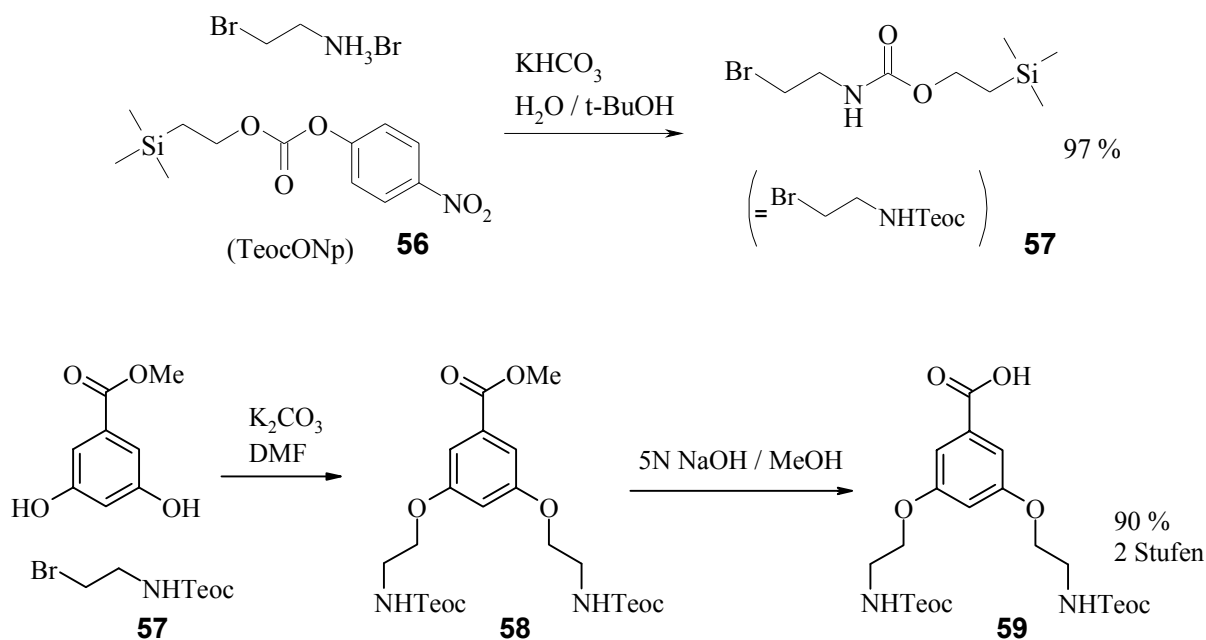


Abb. 44: Synthese von Bis-(N,N'-Teoc)-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (**59**).

Die Teoc-Schutzgruppe ist kompatibel mit den Bedingungen der Peptidfestphasensynthese^[398] und wurde bereits auch in der Festphasensynthese eingesetzt.^[400, 401] Für die Abspaltung von Teoc am TCP-Harz wurde ein Gemisch aus Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) 1 M in THF und DMSO (2:1) verwendet. Das DMSO dient dabei zur Aktivierung der Fluorid-Ionen^[397] und zur besseren Quellung des TCP-Harzes. In einem Testversuch konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung bei 50 °C in

45 Minuten abgeschlossen ist; zur Sicherheit wurde diese Zeitspanne jedoch routinemäßig auf 2 h verlängert (Abb. 45).

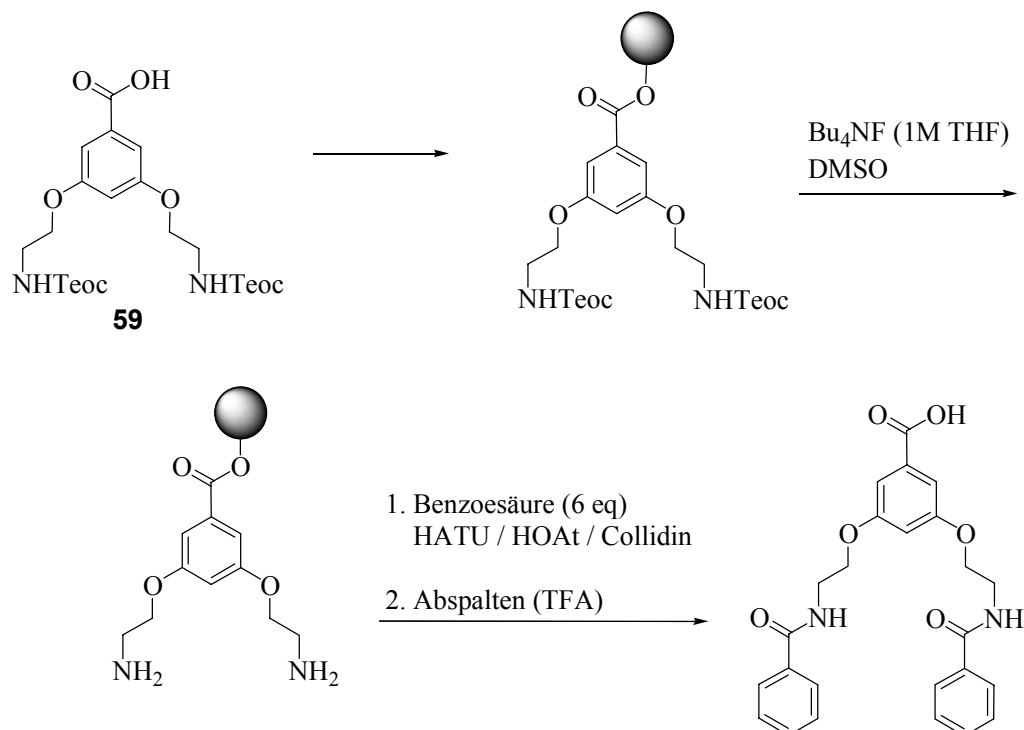


Abb. 45: Test zur SPPS-Kompatibilität von Bis-Teoc-Dab-OH (**59**). Nach Belegung von TCP-Harz, Entschützung und Kupplung mit Benzoesäure (unsubstituiertes Analogon von **59** als Testsubstanz für die Tetramersynthese) entsteht das gewünschte Kupplungsprodukt quantitativ ohne Nebenprodukt.

Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass am TCP-Harz verankerte *aliphatische* Aminosäuren unter den Bedingungen der Teoc-Entschützung vom Harz abgespalten werden. Die „alles-am-Harz“-Strategie konnte mit **59** daher am TCP-Harz nicht durchgeführt werden. Für die Synthese der Tricystein- und der Aminooxymultimeren wurde deshalb anstelle von **59** Bis-Fmoc-Lysin (**27**) eingesetzt, welches sich für die Festphasensynthese der MAPs bewährt hat.^[332]

6.4 Monomere RGD-Peptide mit Monothiolanker (Cysteinpeptide)

RGD-Peptide mit Thiolanker sind vielseitig einsetzbar. Sie eignen sich für die Beschichtung von Gold oder Titan und sie reagieren mit Michael-Akzeptorsystemen wie Maleinimid, Acrylamid und Acrylester zu Sulfiden. Maleinimid-funktionalisierte Oberflächen lassen sich durch die Umsetzung von amino-funktionalisierte Oberflächen mit einem heterobifunktionellen Linker (Maleinimidocarbonsäure-NHS-Aktivester) erzeugen (Abb. 12). Die Addition des Thiols an das Maleinimid-Akzeptorsystem erfolgt dabei chemoselektiv so dass man zur Funktionalisierung von Oberflächen entschützte RGD-Peptide einsetzen kann.

Für verschiedene Anwendungen wurde ein Satz von Thiolpeptiden mit unterschiedlichen *spacer*-Längen synthetisiert.

6.4.1 Synthese

Die Cysteinpeptide wurden nach dem „alles-am-Harz“-Konzept synthetisiert. Als C-terminale Komponente diente Cystein mit der Thiolfunktion in der Seitenkette. TCP-Harz wurde mit Fmoc-Cys(Trt)-OH belegt, woran die entsprechenden Spacer mit TBTU/HOBT/Collidin gekuppelt wurden. Die Fragmentkupplung mit 1.5 eq teilschüttem Cyclopeptid **Z3*** erfolgte mit HATU/HOAt/Collidin und zweistündigem Voraktivieren. Die Peptide wurden mit 95 % TFA und TIPS vom Harz abgespalten und entschützt. Nach Entfernen der TFA wurden die Peptide in Ether gefällt und HPLC-gereinigt. Es ist wichtig, die Cysteinpeptide für die Etherfällung in Essigsäure und nicht in TFA aufzunehmen, da im letzteren Fall der protonierte Ether durch die Thiole gespalten wird und man einen großen Anteil S-ethylierten Produkts erhält.

Die Synthese der funktionalisierten RGD-Peptide nach diesem Verfahren ist – gegenüber den beschriebenen Methoden der separaten Synthese eines Anker-Linker-Systems an der Festphase und dessen Abspaltung vom Harz mit anschließender Fragmentkupplung in Lösung – einfach, schnell und bequem.

Die Verbindungen **C1-C5** wurden in 25-35 % Ausbeute erhalten:

C1 *cyclo(-RGDfE)-C-OH*

C2 *cyclo(-RGDfE)-Ahx-C-OH*

C3 *cyclo(-RGDfE)-Hegas-C-OH*

C4 *cyclo(-RADfE)-Hegas-C-OH*

C5 *cyclo(-RGDfE)-Hegas₂-C-OH*

6.4.2 Evaluierung

Von den Thiolpeptiden wurde Verbindung **C3** im Rezeptorassay auf Affinität gegenüber dem $\alpha v\beta 3$ -Integrin getestet. Der IC_{50} -Wert von **C3** beträgt 6.2 nM und ist damit vergleichbar mit dem des Stammpeptids **Z3***. Im Zelladhäsionsassay auf BSA zeigte Verbindung **C3** eine zu **11** vergleichbare Zelladhäsionsrate (Abb. 13). Die maximale Zahl von adhärenierten Zellen wurde nicht ganz erreicht. Grund dafür könnte die leicht verringerte Nucleophilie der Thiolgruppe in Nachbarschaft zur Carboxylgruppe sein, die sich wahrscheinlich in einer etwas weniger effektiven Additionsreaktion an den Maleinimidlinker auswirkt.^[402] Dies sollte sich allerdings durch verlängerte Reaktionszeit der Anbindungsreaktion leicht ausgleichen lassen.

Die Peptide **C1**, **C3** und **C4** wurden in der Arbeitsgruppe *Prof. Göpferich* (Universität Regensburg) zur RGD-Funktionalisierung des bioabbaubaren amino-funktionalisierten Polymers Amino-PEG-co-PLA^[259] verwendet. Die Anbindung erfolgte über einen heterobifunktionellen Maleinimidocarbonsäure-NHS-*linker*. Durch die Peptide **C1** und **C3** konnte die Adhäsion humaner Osteoblasten signifikant gesteigert werden (Abb. 46).

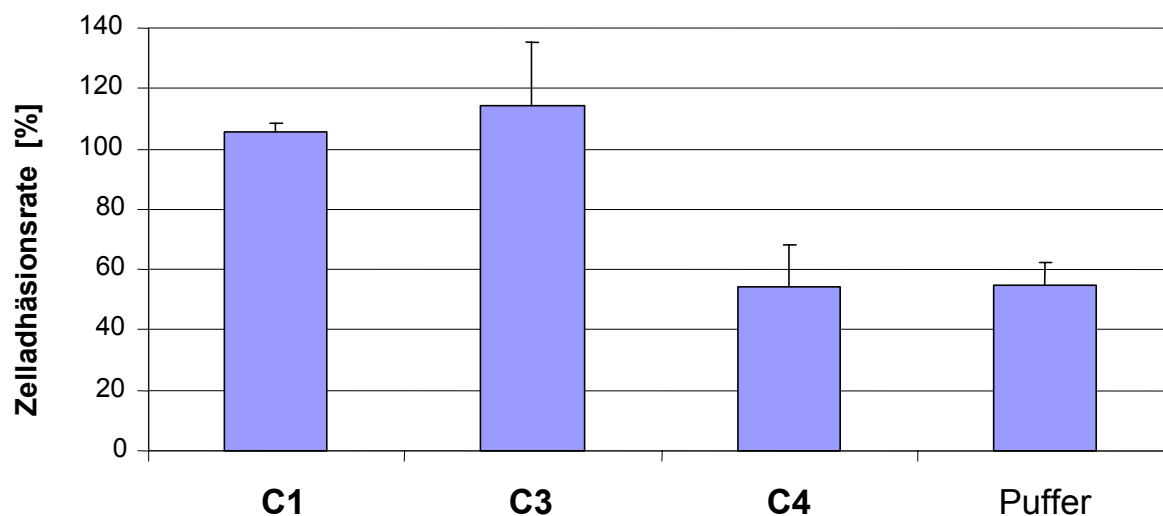


Abb. 46: Adhäsion humaner Osteoblasten an die mit den Peptiden **C1**, **C3** und **C4** funktionalisierte Polymeroberfläche. Die Verbindungen **C1** und **C3** können die Adhäsionsrate gegenüber der Negativkontrolle **C4** und der Leerkontrolle (Puffer) signifikant steigern. Diese Versuche wurden von M. Hacker und E. Lieb durchgeführt.

Verbindung **C2** wird von S. Cesana in der Arbeitsgruppe Dr. Jordan (TU München) für die RGD-Funktionalisierung von Acrylester- und Maleinimid-terminierten Poly(methyloxazolin) verwendet. In der Arbeitsgruppe Prof. Spatz (Universität Heidelberg) werden die Verbindungen **C3-C5** zur Beschichtung von nano-Goldpunkten genutzt (Abb. 47).

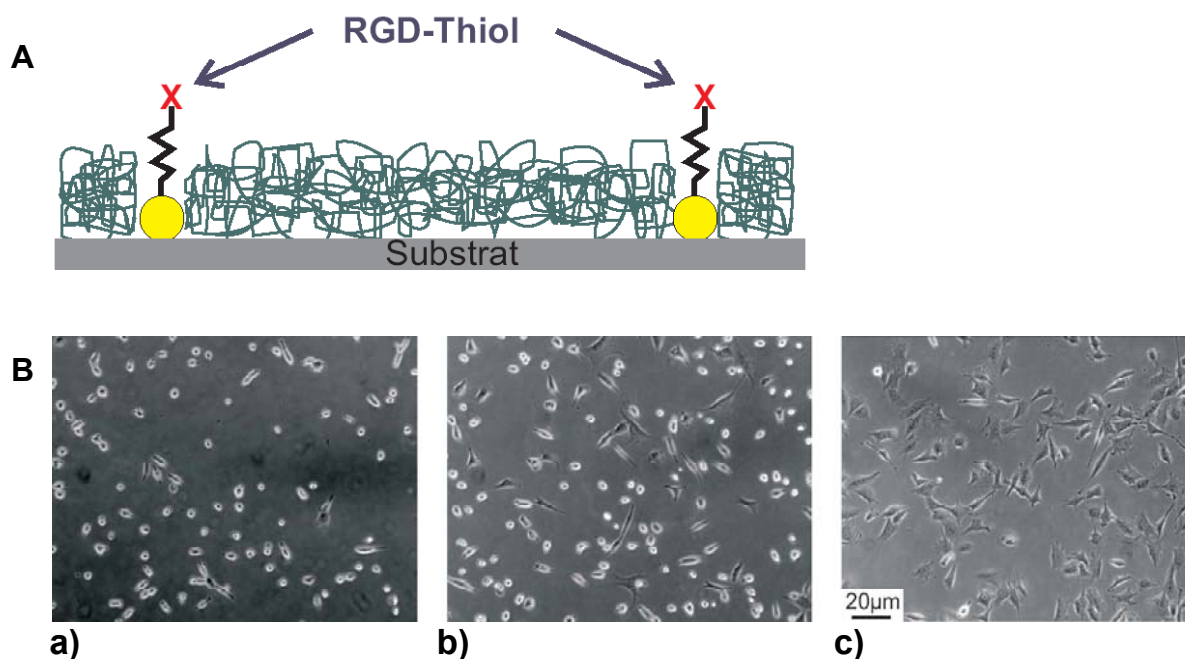


Abb. 47: **A** Schematische Darstellung der strukturierten Oberfläche: Goldpunkte in definierten Abständen sind mit RGD-Peptiden mit Thiolanker beschichtet. Dazwischen wird eine PEG-Schicht aufgebracht, die unspezifische Zelladhäsion minimiert. **B** Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten an **a)** eine Oberflächen ohne RGD-Peptide. Die adhärenierten Zellen sind nicht gespreitet. **b)** Oberfläche mit Mercaptopropionyl-Ahx-cyclo(-RGDfK-). Die Zelladhäsion ist kaum gesteigert, der Ahx-Spacer ist zu kurz, um aus der PEG-Schicht zu ragen. **c)** Oberfläche mit RGD-Peptid C5. Der längere Hegas₂-Spacer reicht durch die PEG-Schicht und stimuliert Zelladhäsion und Zellspreitung.

6.5 RGD-Peptide mit saurem Anker (Phosphatpeptide)

Motivation für die Synthese von RGD-Peptiden mit saurem Anker war die Tatsache, dass das RGD-Phosphonatpeptid **12** Zelladhäsion auf Calciumphosphatoberflächen stimuliert (Abb. 15), die Synthese dieser Peptide aber mit mehreren technischen Problemen einherging.

Gleichzeitig war in der Literatur bekannt, dass RGD-Peptide mit einem Anker von Peptiden mit sauren Seitenkettengruppen Zelladhäsion stimulieren, z. B. $\text{E}_6\text{EPRGDT}^{[282]}$ oder $\text{D}\oplus\text{S}\oplus\text{SEEKFLRRIGRFGLPGRGDS}^{[283]}$ (Kapitel 4.4). Besonders letzteres Peptid mit einer sauren, Phosphoserin-haltigen Sequenz des Calciumphosphat-bindenden Staherin deutet an, dass sich ein relativ kurzer Anker aus natürlichen Aminosäuren für die Immobilisierung auf Calciumphosphat eignen sollte. Für die Synthese von phosphorylierten Peptiden nach der Fmoc-Strategie wurden in den letzten Jahren phosphorylierte Aminosäuren mit geeigneten Schutzgruppen entwickelt, welche seit kurzem auch kommerziell erhältlich sind, z. B. Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH (**60**), Fmoc-Thr(PO(OBzl)OH)-OH (**61**), Fmoc-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH (**62**) oder Fmoc-Tyr[OP(NMe₂)₂]-OH (**63**) (Abb. 48). Die Abspaltung der Schutzgruppen bzw. die Hydrolyse zum Phosphat erfolgt unter den klassischen Abspaltbedingungen mit 95 % TFA und TIPS.

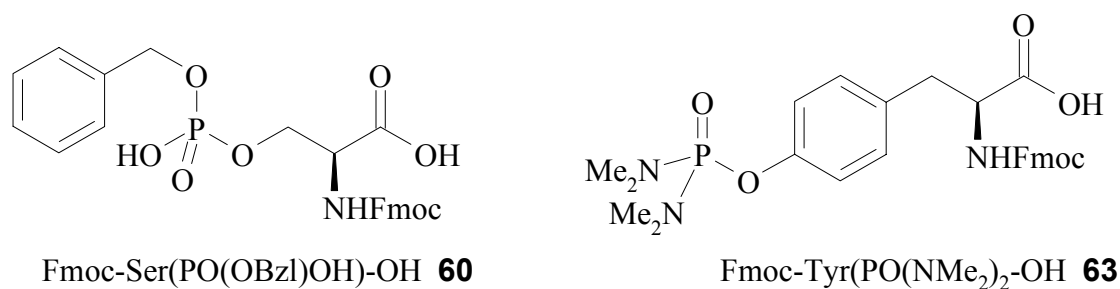


Abb. 48: Phosphorylierte Aminosäuren für die Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie.

Es sollten, ausgehend vom Peptid $\text{D}\oplus\text{S}\oplus\text{SEEKFLRRIGRFGLPGRGDS}$, kleinere Peptide synthetisiert werden insbesondere mit der Fragestellung, wieviele saure Gruppen in einem Calciumphosphatanker enthalten sein müssen und ob die Reihenfolge der verschiedenen Aminosäuren wichtig für die Anbindung ist. Für die Art der Anbindung an Hydroxylapatit wurden nämlich neben der elektrostatischen Anziehung der positiv geladenen Calciumphosphatoberfläche auch direkte Gitter-Wechselwirkungen vorgeschlagen.^[403-405] Zusätzlich sollte als eine Art Positivkontrolle ein RGD-Peptid mit einem E₁₀-Anker synthetisiert werden, ähnlich dem Peptid E₆EPRGDT von Fujisawa et al.^[281, 282] Dieser beschreibt Bindungsstudien, wonach Hexaglutamat E₆

wesentlich besser auf Calciumphosphat bindet als Pentaglutamat E₅. Daraus würde sich relativ offensichtlich ergeben, dass Anker mit mehr als sechs Glutamaten noch besser binden könnten; allerdings wurden solche Anker bisher nicht publiziert.

6.5.1 Synthese

Die Peptide wurden gemäß „alles-am-Harz“-Strategie synthetisiert. Wegen des freien C-Terminus führt dies vorteilhafterweise zu einer zusätzlichen Carboxylgruppe im Anker. Als Aminosäuren mit sauren Seitenketten wurde Glutamat und Phosphoserin, z. T. auch Phosphotyrosin verwendet. Aspartat, Phosphothreonin und γ -Carboxyglutamat wurden wegen der Gefahr von Nebenreaktionen bzw. wegen mangelnder Stabilität nicht eingesetzt. Die Zahl der sauren Aminosäuren im Anker wurde entsprechend der Statherin-Sequenz auf fünf festgelegt. Ausgehend von Pentaglutamat wurden Anker mit einer steigender Zahl von Phosphoserinen in wechselnder Anordnung synthetisiert. Peptid **P5** besitzt die der Statherinsequenz D \oplus S \oplus SEE nachgeahmte Sequenz E \oplus S \oplus SEE.

Zur Synthese wurde TCP-Harz mit Fmoc-Glu(OtBu)-OH oder Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH (**60**) belegt woran die entsprechenden Anker-Aminosäuren mit TBTU/HOBt/DIPEA gekuppelt wurden. Diese Peptide wurden analog zu den Cysteinpeptiden mit Fmoc-Hegas-OH (**50**) verlängert und in einer Fragmentkupplung mit *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) verknüpft. Nach Entschützung und HPLC-Trennung wurden die Peptide **P1-P5** in Ausbeuten von 4-31 % erhalten.

- P1** *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-EEEEEE-OH
- P2** *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-EEEE \oplus S-OH
- P3** *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-EEE \oplus S \oplus S-OH
- P4** *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-EE \oplus S \oplus S \oplus S-OH
- P5** *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-E \oplus S \oplus SEE-OH

Bei der Synthese der Phosphatpeptide traten mehrere Probleme auf. Zunächst war von den Phosphonatpeptiden bekannt, dass diese Peptide in der analytischen HPLC kaum

sichtbar und im ESI-MS sehr schlecht detektierbar waren. Dieses führte dazu, dass die Phosphonatpeptide mit Schutzgruppen HPLC-gereinigt werden mussten und dann entschützt wurden. Die anschließende Analytik mit HPLC-ESI-MS und ^{31}P -NMR brachte weitere Unsicherheiten mit sich. Bei den Phosphatpeptiden stellte sich die Situation zunächst genauso dar, so waren z. B. die Peptide in der analytischen HPLC nicht detektierbar. Es konnte dann allerdings gezeigt werden, dass eine präparative HPLC-Trennung der vollständig entschützten Peptide sehr gut möglich ist. Dies beruht möglicherweise auf der im Vergleich zur analytischen HPLC größeren Pufferkapazität der größeren Lösungsmittelmengen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aus den Lösungen der HPLC-Fractionen relativ gute ESI-MS-Spektren (Loop-Modus) angefertigt werden konnten. Ursache für die Signalverbesserung war der Gehalt von 0.1 % TFA im Laufmittel der präparativen HPLC. Erhöhte man in den ESI-MS-Proben den TFA-Gehalt weiter auf 1-5 %, konnten den normalen Peptiden analoge sehr deutliche Signale erhalten werden. Ohne den TFA-Zusatz dominiert im Massenspektrum ein Signal $m/z = m+24^+$. Woher die Masse 24 stammt ist unklar, möglicherweise handelt es sich um ein Produkt $[\text{m-OH}^- + \text{Acetonitril}]^+$. Die Analytik der Phosphatpeptide im geschützten Zustand ist allerdings weiterhin ein Problem, da man trotz Zusatz von TFA das gewünschte Peptid oft kaum oder gar nicht sieht und aufgrund der starken Signale der Nebenprodukte (s. u.) zu der Annahme geführt wird, das gewünschte Produkt sei nicht enthalten.

Bei der Synthese von Phosphatpeptiden können eine Reihe von Nebenreaktionen auftreten: Monobenzyl-geschützte Phosphate sind zwar schlechtere Abgangsgruppen als Bisbenzyl-geschützte, trotzdem kann es bei der Fmoc-Entschützung durch Piperidin zur Eliminierung von Phosphat kommen. An das aus Phosphoserin entstehende Dehydroalanin kann leicht Piperidin zum Piperidylalanin addieren:

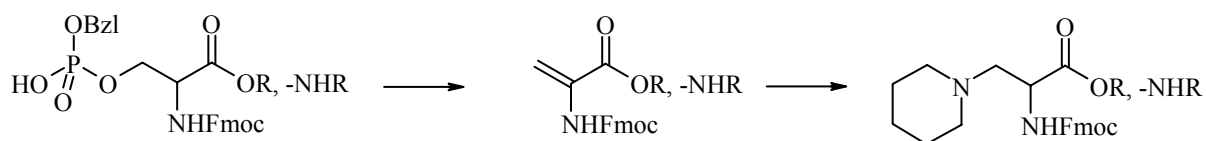


Abb. 49: *Unter Baseneinwirkung eliminiert Benzylphosphat aus Benzylphosphoserin. Piperidin kann an das entstandene Dehydroalanin addieren.*

Piperidylalanin ionisiert sehr gut im ESI-MS und dominiert oft die Spektren der Phosphatpeptide. Die Fmoc-Entschützung mit 20 % Piperidin in DMF wurde daher auf zweimal 5 min reduziert. Als weitere „Nebenreaktion“ wird von der sauren P-OH-Gruppe mit Basen ein Salz gebildet. So neutralisiert Phosphoserin pro Kupplung ein Äquivalent Base und bei der Fmoc-Entschützung wird Piperidin am Peptid zurückgehalten. In der folgenden Peptidkupplung kann das Piperidin einen Teil der aktivierten Aminosäure abfangen und so unvollständige Kupplungen verursachen. Dies führte insgesamt dazu, dass neben den gewünschten Peptiden **P1-P5** zusätzlich noch die deletierten bzw. Piperidylalanin-haltigen Peptide **P6-P10** in Ausbeuten von 2-8 % isoliert werden konnten. Die Sequenz dieser Peptide wurde im Fall von Unklarheiten massenspektrometrisch durch Sekundärionenzerfall bestimmt.

P6 *cyclo(-RGDfE-)-EE@SE-OH*

P7 *cyclo(-RGDfE-)-E@SE@SE-OH*

P8 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EE@S-OH*

P9 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-@SE@SEX-OH*

P10 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EE@S@SX-OH*

X = Piperidylalanin

In einer zweiten Runde wurden verkürzte Peptide ohne Spacer mit nur zwei Phosphaten hergestellt. Weiterhin wurden Cyclopeptide synthetisiert, die die Phosphatgruppe in den Seitenketten enthielten und somit die kürzest möglichen RGD-Phosphatpeptide darstellen.

Die Kupplungen der einzelnen Aminosäuren erfolgte mit TBTU/HOBT/DIPEA und wurden als Doppelkupplungen durchgeführt. Für die Kupplungen von Fmoc-Ser(PO(OBzl)OH)-OH (**60**) wurde jeweils ein Extraäquivalent DIPEA zugefügt. Um bei der Fragmentkupplung mit dem Cyclopeptid keine Doppelkupplung (Verlust des Cyclopeptids durch Reaktion mit dem Piperidin) durchführen zu müssen, wurde zur Entfernung des Piperidins das Harz gemäß einer Vorschrift von Novabiochem mit DIPEA/TFA/DMF 20/2/78 gewaschen. Es stellte sich allerdings heraus, dass mit

dieser Methode das Piperidin nicht entfernt wird. Als günstigste Methode, die das Piperidin vollständig entfernt, erwies sich das dreimalige Waschen des Harzes mit einer Triethylaminlösung (30 %ig in NMP) (Abb. 50).

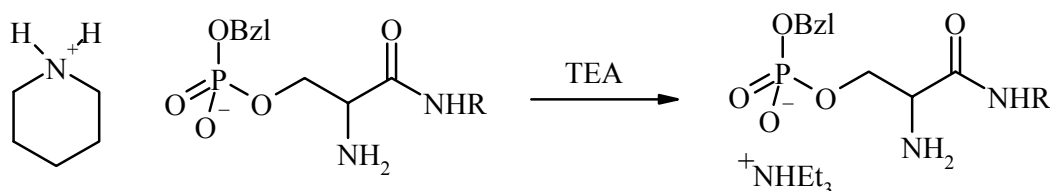


Abb. 50: Piperidin wird von den sauren Phosphaten als Salz im Harz zurückgehalten. Das Piperidin kann gegen Triethylamin ausgetauscht werden, welches im folgenden Kupplungsschritt nicht stört.

Um Phosphatgruppen in die Seitenketten von Cyclopeptiden einzuführen wurde das D-Phe durch D- P^{\oplus} Tyr und das Glutamat durch P^{\oplus} Ser oder P^{\oplus} Tyr ersetzt. Fmoc-D-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH (**66**) ist kommerziell nicht erhältlich und wurde analog zu einer Synthese von Fmoc-L-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH nach folgender Sequenz hergestellt (Abb. 51).^[406]

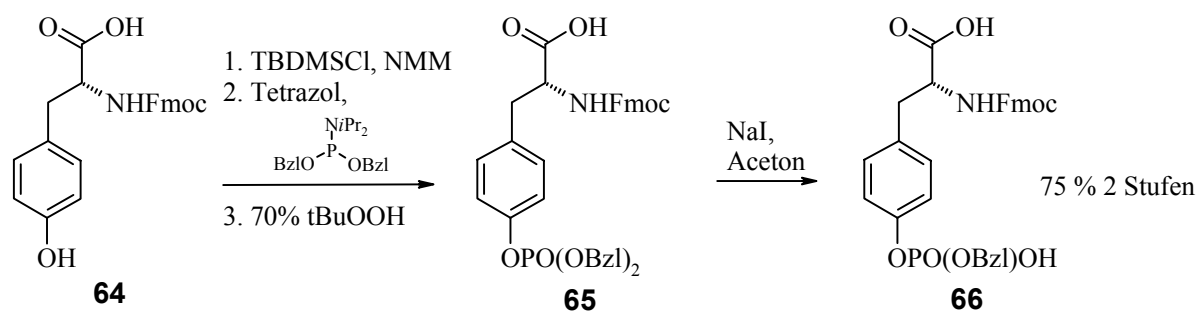


Abb. 51: Synthese von Fmoc-D-Tyr(PO(OBzl)OH)-OH (**66**).

Die Synthese der Cyclopeptide wurde analog Kap. 6.3.1.1 durchgeführt. Nach Entschützen mit TFA und HPLC-Trennung wurden die Peptide **P13** - **P20** in Ausbeuten von 4-11 % erhalten.

- P13** *cyclo*(-RGDfE-)-EⓈSEⓈS-OH
P14 *cyclo*(-RGDfE-)-ⓈSEⓈS-OH
P15 *cyclo*(-RGDfE-)-GⓈSEⓈS-OH
P16 *cyclo*(-RGDfE-)-EⓈSⓈS-OH
P17 *cyclo*(-RGDfE-)-ⓈSⓈS-OH
P18 *cyclo*(-RGDfⓈS-)
P19 *cyclo*(-RGDⓈyV-)
P20 *cyclo*(-RGDⓈyⓈY-)

Die Ausbeuten der Synthese der Phosphatpeptide ist insgesamt nicht zufriedenstellend. Die Synthesen der jeweiligen Verbindungen sind jedoch nicht optimiert und das Wissen um die optimalen Synthesebedingungen wurden im erst im Lauf der verschiedenen Synthesen erworben, sodass bei einer nochmaligen Synthese wesentlich höhere Ausbeuten zu erwarten sind.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Synthese von Phosphatpeptiden mit den entsprechenden geschützten Fmoc-Aminosäuren problemlos möglich ist, wenn man folgende Punkte beachtet:

- Für die Kupplung der Monobenzylphosphat-haltigen Aminosäuren ist ein Extraäquivalent Base nötig.
- Doppelkupplungen sind durchzuführen.
- Die Fmoc-Entschützung mit 20 % Piperidin in NMP sollte zweimal 5 min nicht überschreiten, um die Bildung von Dehydroalanin möglichst gering zu halten.
- Vor der Fragmentkupplung lässt sich Piperidin durch dreimaliges Waschen mit 30 % Triethylaminlösung in NMP entfernen.
- Die MS-Analytik der geschützten Phosphatpeptide ist oft wenig aussagekräftig.
- Entschützte Phosphatpeptide möglichst nicht mit Methanol aufnehmen, da sich rasch Methylester bilden.
- Die Detektion der entschützten Phosphatpeptide im ESI LOOP-MS ist möglich durch Zusatz von 1-5 % TFA.

Der oben erwähnte Dekaglutamat-Anker wurde durch wiederholtes Kuppeln von Fmoc-Glu(OtBu)-OH mit TBTU/HOBt/DIPEA an mit Fmoc-Glu(OtBu)-OH belegtem TCP-Harz aufgebaut. Allerdings war die Kupplung an die fünfte Aminosäure unvollständig und von der sechsten Aminosäure an ließ sich Fmoc kaum abspalten. Mit Fmoc-Glu(OBzl)-OH ließ sich nach der selben Methode das Dekapeptid synthetisieren. Ab der vierten Aminosäure kam es jedoch bei jedem Kupplungsschritt trotz der Verwendung von Collidin als Base zur Bildung von Pyroglutamat (vgl. Kap. 6.3.1.1). In der HPLC-MS-Analytik stellte sich das Produktgemisch als eine „Leiter“ ausgehend von Pyroglutamyl[E(OBzl)]₄ bis Pyroglutamyl[E(OBzl)]₉ in abnehmender Konzentration dar. Das gewünschte Produkt H-[E(OBzl)]₁₀ war kaum vorhanden. Daher wurde wieder auf Fmoc-Glu(OtBu)-OH zurückgegriffen.

Für die Synthese schwieriger, aggregierender Aminosäuresequenzen werden neben Temperaturerhöhung und längeren Kupplungszeiten normalerweise strukturbrechende Elemente wie chaotrope Salze,^[407] oder reversible am Stickstoff substituierte Aminosäuren verwendet, z. B. 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl(Hmb)-Reste^[408] oder die Mutterschen Pseudoproline.^[409] Da es im hier vorliegenden Fall nicht um eine biologisch aktive Sequenz mit festgelegter Struktur, sondern lediglich um eine Anhäufung von sauren Aminosäureseitenketten ging, wurde das entsprechende D-Glutamat als strukturverändernde Einheit verwendet. Durch den Einbau von Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH an Position 5 und 7 gelang die Synthese des Dekaglutamatankers ohne Probleme. Die Wahl der Position 5 erfolgte wegen der in dieser Region auftretenden Probleme; die Wahl der Position 7 erfolgte eher zufällig. An den Dekaglutamatanker wurden Fmoc-Hegas-OH (**50**) und cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) bzw. cyclo[-R(Pbf)AD(OtBu)fE-] (**Z4***) angeknüpft. Nach Abspalten vom Harz und Entfernung der permanenten Schutzgruppen wurden die Peptide **P11** und **P12** mittels semipräparativer HPLC gereinigt und in Ausbeuten von von 21 und 29 % erhalten.

P11 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-EEEEeEeEEEE-OH

P12 *cyclo*(-RADfE-)-Hegas-EEEEeEeEEEE-OH

Fujisawa et al. beschreiben keine Probleme bei der Synthese von E₇PRGDT.^[282] Möglicherweise liegt das an den Aminosäuren PRGDT am Anfang der Sequenz, die eine Aggregation unterbinden. Allerdings beschränken sich die Angaben über die Synthese in der entsprechenden Publikation lediglich auf die Aussage, dass das Produkt „nach Fmoc-Strategie“ hergestellt wurde, ohne dass weitere Informationen z. B. über Schutzgruppen oder Ausbeuten gegeben werden.

Als Negativkontrollen für Zelladhäsion wurden weiterhin verschiedene der oben beschriebenen Ankerpeptide ohne RGD-Cyclopeptid verwendet. Die Ankerpeptide fielen in Ausbeuten von 33-37 % an

P21 H-EⓈSEⓈSE-OH (Verbindung **P21** wurde von *J. Auernheimer* synthetisiert

P22 H-ⓈSEⓈS-OH

P23 H-EEEEeEeEEEE-OH

6.5.2 Evaluierung

Im für einige Phosphatpeptide durchgeführten Rezeptorassay zeigen die ankerfunktionalisierten Cyclopeptide ähnliche Werte wie die Stammpeptide. Der benachbarte saure Anker wirkt sich offenbar nicht auf die Bindungsaffinität aus (Tab 7).

Tabelle 7: IC₅₀-Werte ausgewählter Phosphatpeptide.

Nr.	Peptid	IC ₅₀ [nM] αvβ3 (Vn)
Z3	<i>cyclo</i> (-RGDfE-)	24
P7	<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-EⓈSEⓈSE	11
P11	<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas-EEEEeEeEEEE	60
P12	<i>cyclo</i> (-RADfE-)-Hegas-EEEEeEeEEEE	34 % Inhib., 10 ⁻⁵ M
P16	<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-EⓈSⓈS	25
P17	<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-ⓈSⓈS	22
P 18	<i>cyclo</i> (-RGDfⓈS-)	11 % Inhib., 10 ⁻⁵ M
P 19	<i>cyclo</i> (-RGDⓈyV-)	25
P 20	<i>cyclo</i> (-RGDⓈyⓈY-)	85 % Inhib., 10 ⁻⁵ M

Zunächst überraschend scheinen die Werte für die phosphorylierten Zyklen. Die Substitution des D-Phenylalanins durch D-Phosphotyrosin hat nur wenig Einfluss auf die Affinität (**P19**), wohingegen die Substitution der – normalerweise für die Affinität weniger wichtigen – fünften Aminosäure durch Phosphotyrosin oder Phosphoserin zum starken Affinitätsverlust führt (**P18**, **P20**).

Die Phosphatpeptide wurden bei *Merck Biomaterial* auf ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Zelladhäsion getestet. Dazu wurden Calciumphosphat-Zement-Oberflächen (*Calcibone®*, *Merck Biomaterial*) mit den Peptiden beschichtet und zunächst im ELISA^[2] mit einem auf das cyclische RGD-Peptid spezifischen Antikörper auf ihre relative Menge an Peptid untersucht (Abb. 52 und 53).

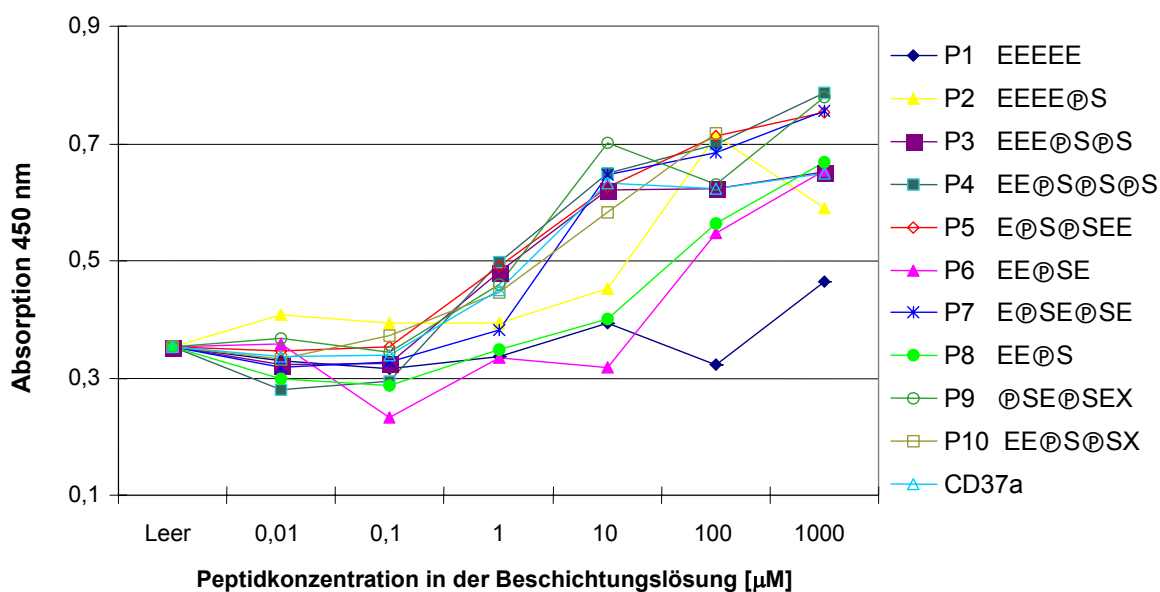


Abb. 52: ELISA von **P1-P10** auf Calciumphosphat (*Calcibone®*, *Merck Biomaterial*). Die Fehlerbalken der Standardabweichung (i. d. R. Werte zwischen 0.01-0.06) wurden zur besseren Übersicht weggelassen. CD37a: von C. Dahmen synthetisiertes Phosphonatpeptid **12**.

Aus den Ergebnissen des ELISA lässt sich folgender Trend herauslesen: Peptid **P1** mit dem Pentaglutamatanker zeigt die geringste Verankerung auf Calciumphosphat. Mit steigendem Phosphoserinegehalt steigt die Peptidmenge auf der Oberfläche: Zunächst

mittlere Werte für Verbindungen mit einem Phosphoserin (**P2**, **P6** und **P8**) und schließlich gute Werte für Verbindungen mit zwei Phosphoserinen (**P3**, **P5**, **P7**, **P9**, **P10**), unabhängig von der Position der Phosphoserine im Anker. Die Ergebnisse des Phosphonatpeptids **12** (**CD37a**) werden damit erreicht bzw. übertroffen. Mit drei Phosphoserinen (**P4**) lässt sich im Rahmen der Messgenauigkeit keine weitere Steigerung mehr beobachten. Interessanterweise scheint die Anwesenheit der basischen Seitenkette des Piperidylalanins nicht zu stören (**P9** und **P10**). Die Werte für die Peptide **P13-P17** (jeweils zwei Phosphoserine im Anker) entsprechen im Bindungsverhalten den analogen Verbindungen (**P3**, **P5**, **P7**, **P9**, **P10**) (Abb. 52). Reduziert man den Anker auf Diphosphoserin, bleibt die Verankerungsfähigkeit (im Rahmen der Messgenauigkeit) erhalten (**P17**). Der Dekaglutamatanker zeigt ein vergleichbares Anbindungsverhalten (**P11**). Damit kann man die Anbindungsaktivität von fünf Glutamaten etwa mit einem Phosphoserin gleichsetzen. Das RAD-Kontrollpeptid **P12** dürfte ähnlich gut wie das entsprechende **P11** anbinden, wird jedoch vom Antikörper schlechter erkannt. Ob die kleinen Cyclopeptide **P18 - P20** vom Antikörper nicht erkannt werden oder nicht auf die Oberfläche binden kann man mit diesem Versuch nicht beantworten.

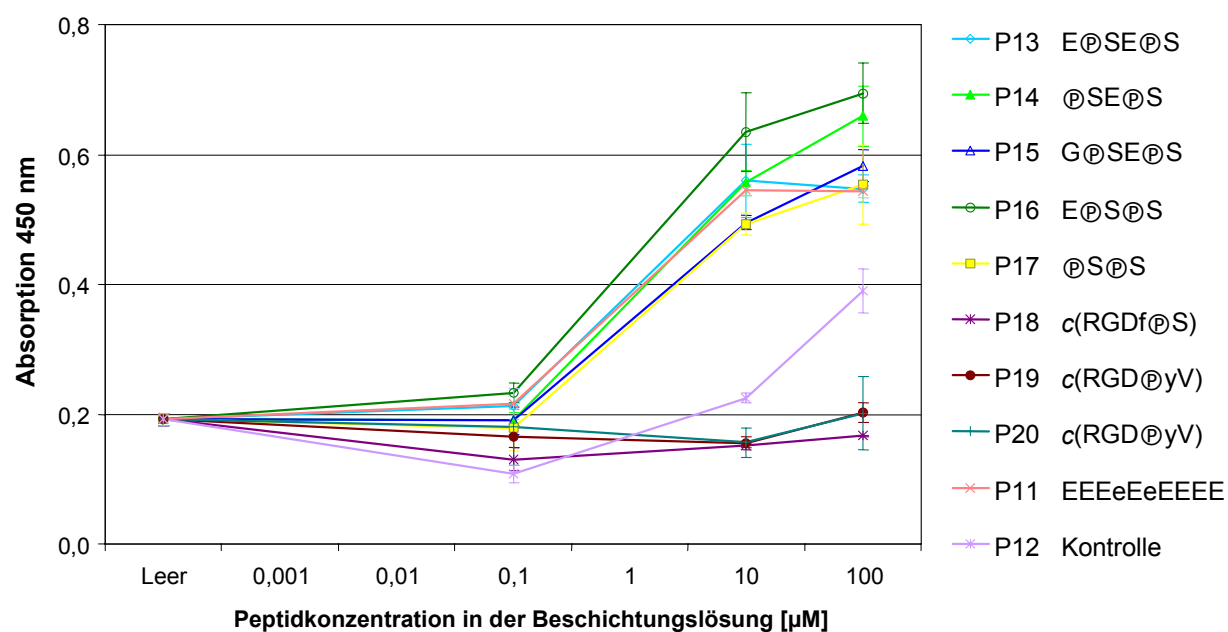


Abb. 53: ELISA von **P11-P20** auf Calciumphosphat (Calcibone®, Merck Bio-material).

Von den Peptiden **P1** - **P10** wurde eine Auswahl auf ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Adhäsion von Osteoblasten getestet (Abb. 54). Die Ergebnisse spiegeln die Trends des entsprechenden ELISA wider, wobei die Variabilität bei der Zelladhäsion wesentlich höher ist. Wiederum werde die Werte des Phosphonatpeptids entweder erreicht oder übertroffen. Die positiven Resultate für Verbindung **P7**, die keinen *spacer* enthält, legen nahe, dass dieses Calciumphosphat nicht zu den Materialien gehört, bei denen ein Spacer zwischen Ankergruppe und RGD-Peptid für eine stimulierte Zelladhäsion essentiell ist.^[57]

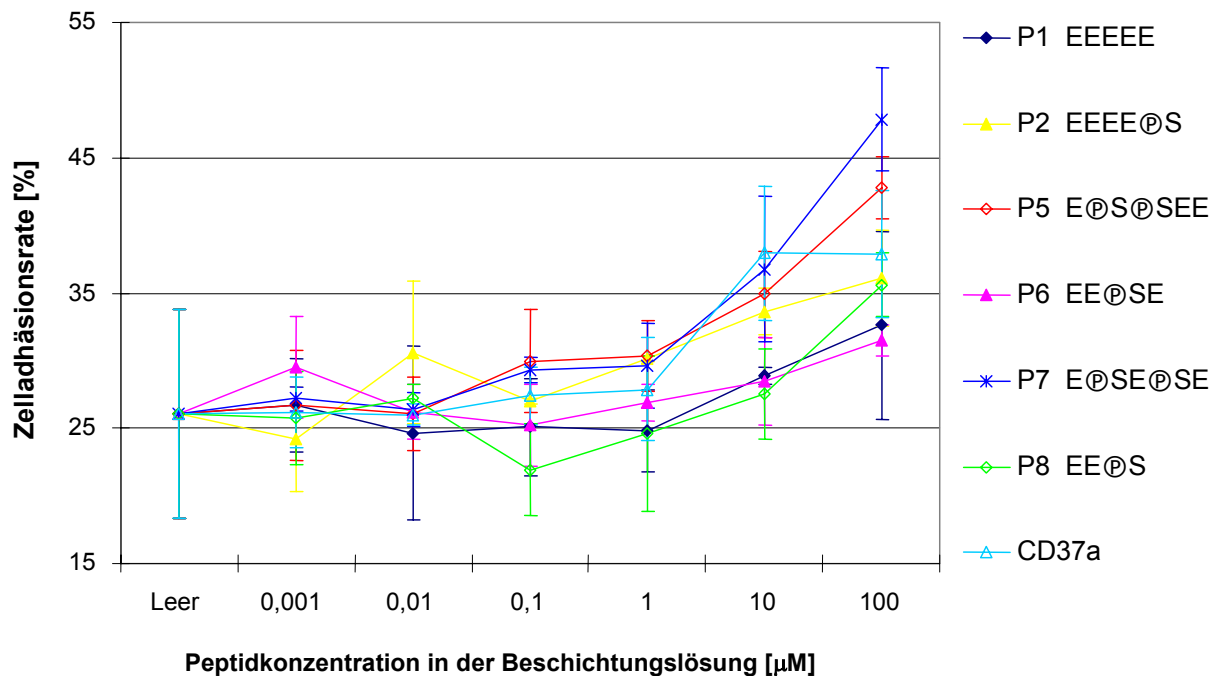


Abb. 54: Stimulierung der Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten durch **P1**, **P2**, **P5-P8** und Phosphonatpeptid **CD37a** auf Calciumphosphat (Calcibone®, Merck Biomaterial).

Bei den Adhäsionsergebnissen der verkürzten Peptide **P13** - **P17** ist ein interessanter Trend festzustellen (Abb. 55): **P13** (Anker E@SE@S), **P15** (Anker G@SE@S) und **P16** (Anker E@S@S) besitzen die dem ELISA entsprechende Adhäsionsaktivität, bestätigen also, dass hier auf einen Spacer verzichtet werden kann. Die Aktivität von **P14** (Anker @SE@S) und **P17** (Anker @S@S) ist merklich verringert. Bei diesen

Peptiden ist ein Phosphoserin direkt an das Glutamat des Cyclus gekuppelt. Der Aktivitätsunterschied lässt sich nicht durch eine unterschiedliche Integrinaffinität erklären (Tab. 7). Möglicherweise sind die RGD-Cyclen von **P14** und **P17** durch das benachbarte Phosphoserin zu nahe an der Calciumphosphatoberfläche lokalisiert und können vom Integrin nicht erkannt werden; ein gewisser minimaler *spacer* zwischen Ankergruppe und RGD-Motiv wäre also nötig.

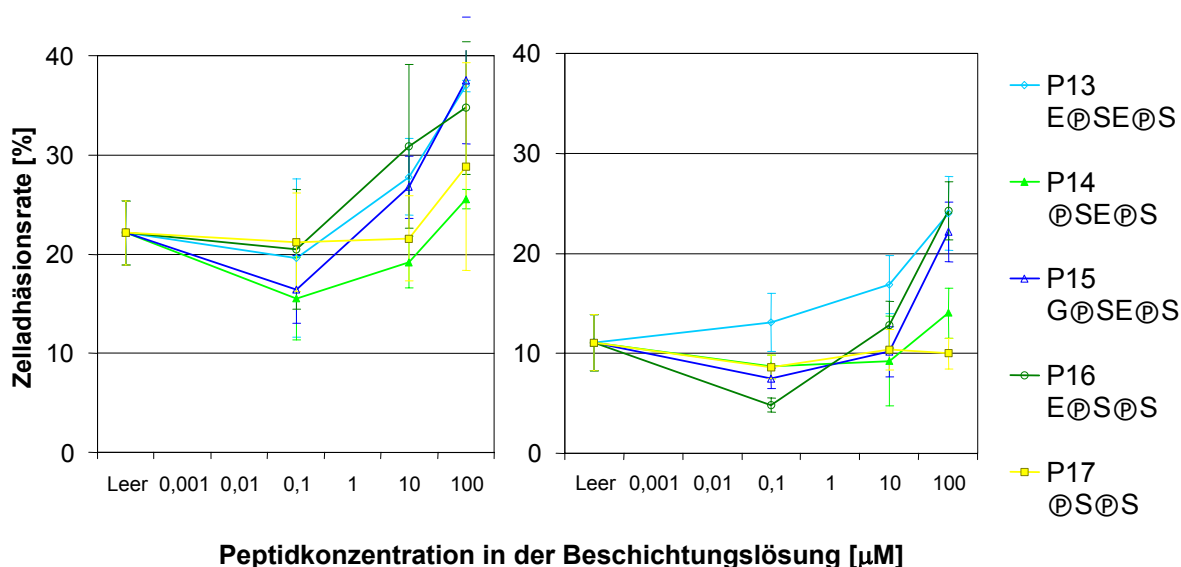


Abb. 55: Stimulierung der Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten durch **P13-P17** auf Calciumphosphat (Calcibone®, Merck Biomaterial). Die Verbindungen **P14** und **P17** weisen eine deutlich schwächere Zelladhäsionsaktivität auf. Die Absolutwerte der Zelladhäsion unterscheiden sich stark zwischen den einzelnen Versuchsreihen.

Die Absolutwerte für die Zelladhäsion in den verschiedenen Versuchsreihen unterscheiden sich erheblich. Die Zahl der adhärenierten Zellen wird zwar jeweils um ca. 15 % gesteigert, jedoch macht das relativ gesehen im ersten Fall etwa ein Drittel des Ausgangswertes aus, während im zweiten Fall die Zahl der adhärenierten Zellen, bezogen auf den Ausgangswert mehr als verdoppelt wird. Die Art der Darstellung sollte nicht darüber hinwegtäuschen, dass nach demselben (für BSA entwickelten) Protokoll der Prozentsatz der adhärenierten Osteoblasten auf BSA mit Thiol-RGD von ca. 0 % auf 70-100 % gesteigert werden kann (vgl. Abb. 13).

Von den Verbindungen **P11**, **P12** und **P18-P23** weist einzig **P11** (Dekaglutamatanker) eine Steigerung der Zelladhäsionsrate auf (Abb. 56).

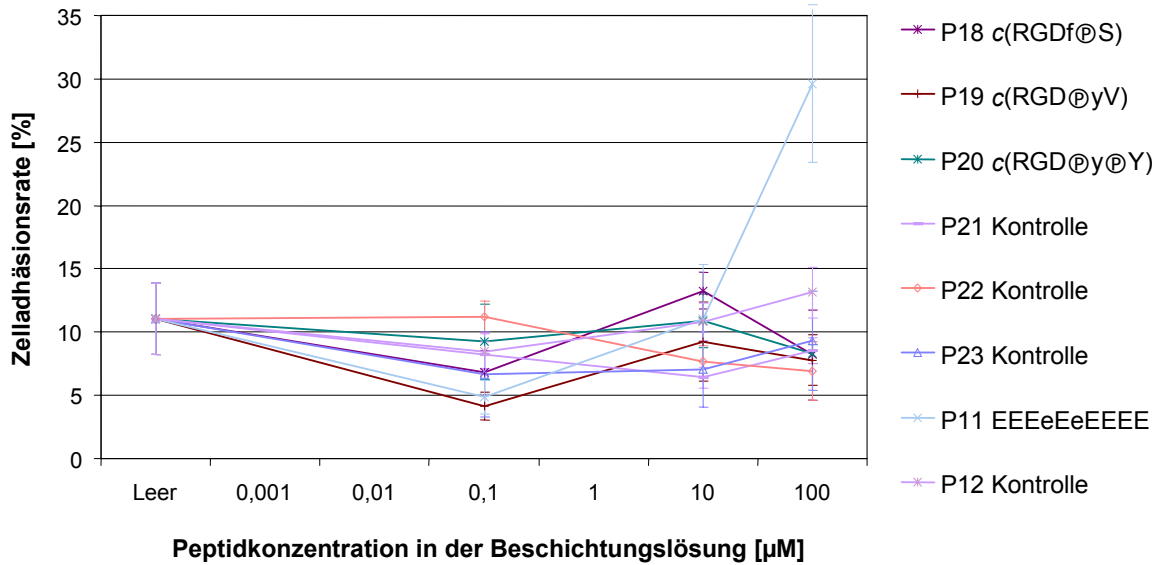


Abb. 56: Stimulierung der Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten durch **P11**, **P12**, und **P18-P23** auf Calciumphosphat (Calcibone®, Merck Biomaterial).

Das Kontrollpeptid **P12** und der Dekaglutamatanker allein (**P23**) besitzen keine Adhäsionsaktivität, genauso wie die Ankermoleküle **P21** und **P22**. Der im Intergin-affinitäts-assay aktive Cyclus **P19** zeigt keine Zelladhäsionsaktivität. Nach den Kristallstrukturdaten des ligandengebundenen $\alpha\beta3$ -Integrins, kann der Cyclus **P19** wegen des fehlenden eines minimalen *spacers* nicht gleichzeitig an das Integrin und an die Calciumphosphatoberfläche binden. Da wegen der Phosphatgruppe in **P19** eine Anreicherung des Peptids an der Materialoberfläche zu erwarten ist, liegt hiermit ein guter Hinweis darauf vor, dass zur Stimulierung der Zelladhäsion das RGD-Peptid gleichzeitig an die Oberfläche und an das Integrin gebunden sein muss. Alternativ wäre nämlich auch z. B. eine lokale Anreicherung des RGD-Peptids an der Oberfläche als Adhäsionsstimulus vorstellbar.

Insgesamt wurden verkleinerte *cyclo(-RGDfE-)*-Peptid-Derivate gefunden, die effektiv die Adhäsion von Osteoblasten an Calciumphosphat stimulieren können. Die Verdopplung der Zahl der adhärenierten Zellen entspricht in etwa den in der Literatur beschriebenen Werten (z. B. *Itoh et al.*: 38 % \rightarrow 74 %^[224]), wobei ein Vergleich wegen der

unterschiedlichen Testbedingungen problematisch ist. Mit dem Octapeptid *cyclo(-RGDfE-)-E@S@S P16* wurde das bisher kleinste auf Calciumphosphat adhäsionsaktive Peptid synthetisiert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass aus der Calciumphosphat-bindenden Statherinsequenz **D@S@SEEKFLRRIGRFG** die saure N-terminale Pentapeptidsequenz auf Calciumphosphat bindet. Damit konnten Ergebnisse aus Festkörper-NMR-Studien bestätigt werden.^[283] Mit den hier zur Verfügung stehenden, nach der Peptid-Festphasensynthese herstellbaren RGD-Phosphatpeptiden ließe sich die Bioaktivität von Calciumphosphatkeramiken leicht steigern. Die Wirkung der RGD-Peptide dürfte dabei die osteokonduktive Wirkung von Calciumphosphat erhöhen. In jüngerer Zeit wurde auch von einer Stimulierung der Osteoblastenproliferation durch oberflächenimmobilisierte RGD-Peptide berichtet.^[224] Der zu langsame Abbau der meisten Calciumphosphatkeramiken und damit die Wichtigkeit der Osteoclastenaktivität ist in der letzten Zeit verstärkt in den Fokus der Aufmerksamkeit gerückt.^[287] Möglicherweise würden oberflächenimmobilisierte RGD-Peptide die Adhäsion der stark $\alpha\beta3$ -exprimierenden Osteoclasten verbessern^[256] und so den Umbau dieser Calciumphosphatkeramiken in natürlichen Knochen beschleunigen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der hier synthetisierten Peptide wäre der durch den Phosphatanker ermöglichten Einbau in anodisch erzeugte Titanoxidschichten.^[294]

6.6 Monomere RGD-Peptide mit Polythiolanker (Polythiolpeptide)

Die Synthese der RGD-Peptide mit Polythiolanker wurde durch die Beobachtung angeregt, dass die Immobilisierung von RGD-Phosphatpeptiden auf Hydroxylapatit durch eine steigende Zahl von sauren Ankergruppen verstärkt wird. Analog könnte man sich vorstellen, dass die geringe Adhäsionsaktivität der RGD-Peptide mit einem Thiol als Ankergruppe, z. B. des 3-Mercaptopropionyl-*cyclo(-RGDfK-)* (**11 = EMD 73 450**), durch das Hinzufügen weiterer Thiole, also durch die Generierung eines „Polythiol“-Ankers gesteigert werden kann.

Es wurden RGD-Peptide mit 1-4 Thiolen als Ankergruppen und verschiedenen Spacern geplant. Die Thiole sollten analog zu den Cysteinpeptiden durch den Einbau von Cysteinen in den Anker eingeführt werden. Um einen möglichen strukturellen Einfluss der Anordnung der Thiole zu untersuchen wurden auch Derivate hergestellt, bei denen die Cysteine durch Glycinspacer etwas größere Abstände zueinander aufweisen.

6.6.1 Synthese

Die Synthese der Polythiolpeptide erfolgte analog zu den Cysteinpeptiden (Kap. 6.4). An mit Fmoc-Cys(Trt)-OH belegtes TCP-Harz wurde eine unterschiedliche Zahl von Fmoc-Cys(Trt)-OH gekuppelt. Die Kupplung erfolgte mit TBTU/HOBt/DIPEA. Bei einigen Peptiden wurden zwischen den Cysteinen Glycin eingebaut. An den Polythiolanker wurden Fmoc-Hegas bzw. Fmoc-Ahx als *spacer* gekuppelt. Für die Fragmentkupplung wurden nur 1.2 eq teilentschützen Cyclopeptids **Z3*** eingesetzt. Die Peptide wurden mit 95 % TFA und TIPS vom Harz abgespalten und entschützt. Nach Entfernen der TFA wurden die Peptide mit Essigsäure aufgenommen, in Ether gefällt und HPLC-gereinigt.

In der HPLC-MS-Analytik zeigte sich, dass Fmoc-Cys(Trt) aufgrund der relativ starken Base DIPEA bei der Kupplung teilweise racemisiert.^[410] Zusätzlich hatte sich bei der Fragmentkupplung ein großer Teil des Kupplungsreagenzes mit N-Terminus (Guanylierung) statt mit dem Cyclopeptid umgesetzt. Ursache dafür waren technische Probleme mit dem verwendeten Syntheseblock, die zu einer ungleichmäßigen Verteilung und Durchmischung der Kupplungslösung führten (vgl. Kap. 6.1). In der HPLC-Trennung wurden auch die racemisierten Isomere aufgefangen, da diese zusätzliche Strukturvarianten darstellen. Gemäß der Annahme, dass die Peptidkupplung schneller als eine vollständige Racemisierung ist, wurden die größeren Signale in der HPLC dem nicht-racemisierten Produkt zugeordnet.^[411] Nach HPLC-Trennung wurden die gewünschten Produkte in Ausbeuten von 11-18 % erhalten, die Isomere fielen mit 3-6 % Ausbeute an:

- S1** *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-OH
S2 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CC-OH
S3 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-cC-OH
S4 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CCC-OH
S5 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CcC-OH^a
S6 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-cCC-OH^a
S7 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CCCC-OH
S8 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CCCC-OH^b
S9 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CGC-OH
S10 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-CGCGC-OH
S11 *cyclo*(-RGDfE-)-Ahx-CCC-OH

^aZuordnung der Isomeren nicht eindeutig

^bGemisch verschiedener Cysteinisomere)

Die Polythiolverbindungen sind nicht offensichtlich oxidationsempfindlicher als die Monothiolverbindungen, wenn man z. B. die Stabilität in Lösung für die HPLC-MS-Analytik betrachtet. In 0.1 % TFA-Lösung bilden sich auch von der Tetracysteinverbindung **S7** nach zwei Tagen keine Disulfide.

6.6.2 Evaluierung

Die Polythiolverbindungen wurden bei *Merck Biomaterial* auf ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Zelladhäsion getestet. Dazu wurden Titanplättchen mit den Peptiden beschichtet und zunächst im ELISA^[2] auf ihre relative Menge an Peptid untersucht (Abb. 57).

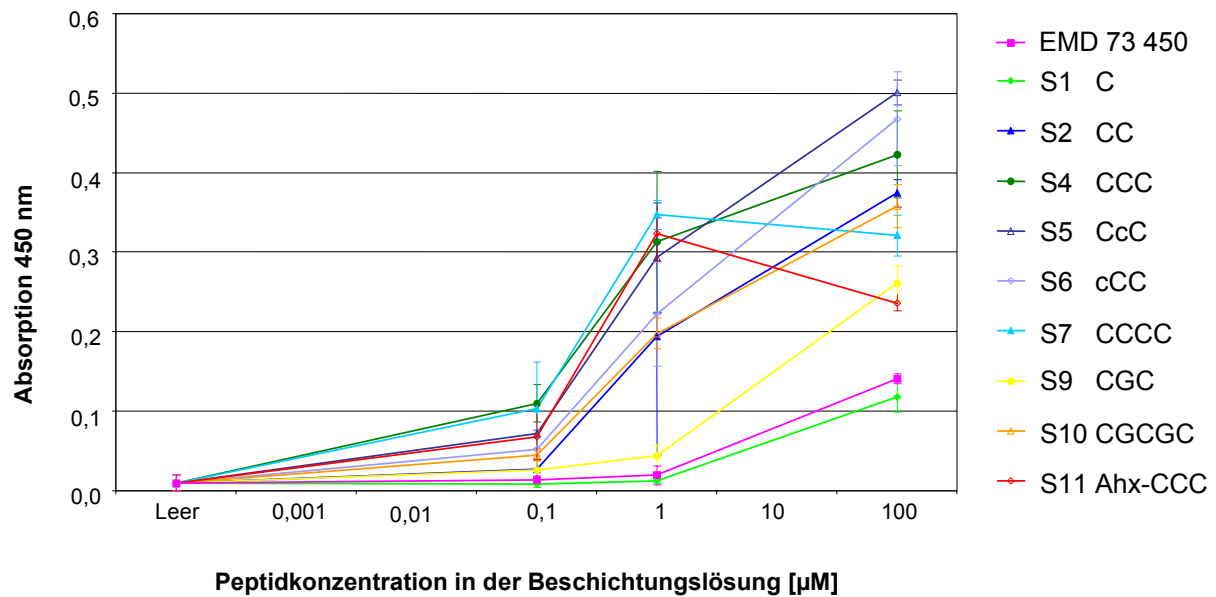


Abb. 57: ELISA von mit **S1**, **S2**, **S4-S7**, **S9-S11** und dem Kontrollpeptid **EMD 73 450** beschichteten Titanplättchen zur Bestimmung der relativen Peptidmenge.

Es lassen sich, im Rahmen der angegebenen Fehler, folgende Trends feststellen: Verbindung **S1** mit einem Cystein als Anker und **EMD 73 450** binden in vergleichbarer (geringer) Menge an die Oberfläche. Die Menge an Beschichtung nimmt sprunghaft zu, wenn im Anker zwei Cysteine enthalten sind (**S2**). Es gibt eine weitere, aber weniger ausgeprägte Zunahme mit drei Cysteinen (**S4**). Die Isomere **S5** und **S6** des Tricysteinankers binden vergleichbar gut. Die Verwendung von vier Cysteinen, Glycinspacern im Anker bzw. Ahx als Spacer anstelle von Hegas wirkt sich eher negativ auf die Anbindung aus (**S7**, **S9-S11**). Im Zelladhäsionsassay spiegelt die Zahl der adhärenierten Osteoblasten die Ergebnisse des ELISA relativ gut wider (Abb. 58).

Auch hier lässt sich eine signifikante Zunahme der Zelladhäsion durch zwei Cysteine im Anker feststellen (**S2**). Eine weitere geringere, mit Hilfe der Isomeren reproduzierbar bestätigte Zunahme gibt es mit drei Cysteinen (**S4-S6**). Alle weiteren Veränderungen führen zu geringerer Zelladhäsion.

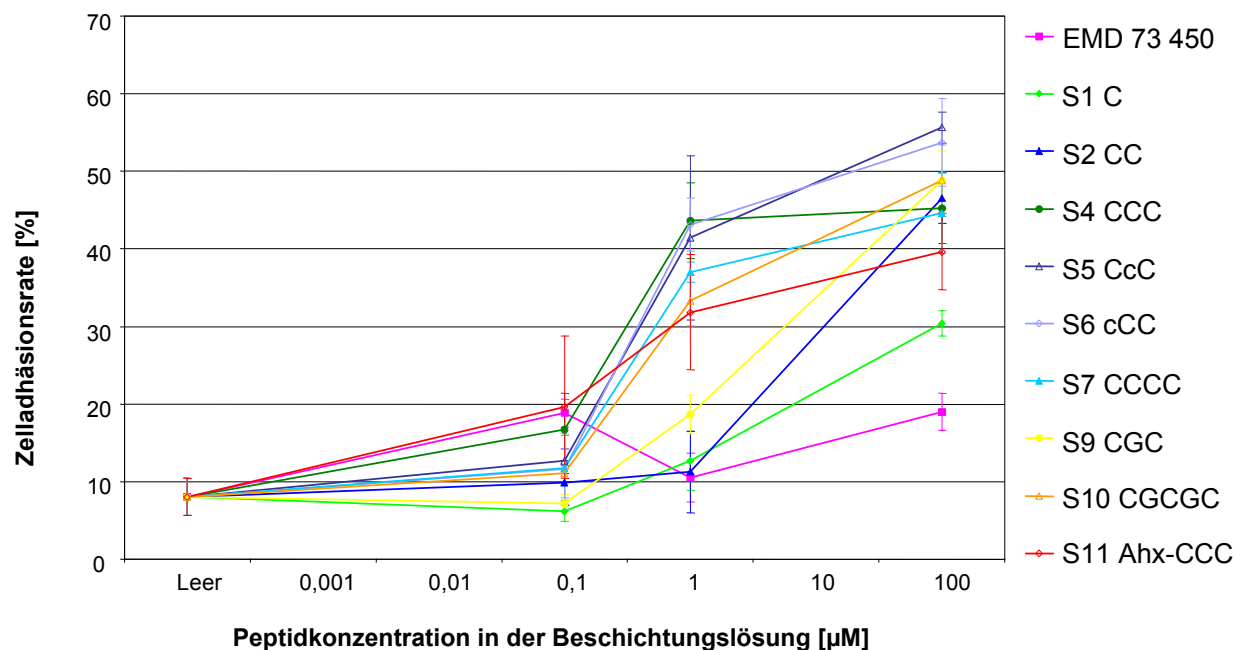


Abb. 58: Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten an mit *S1*, *S3-S7* und *S9-S11* beschichtete Titanplättchen.

Mit diesen Ergebnissen konnte die oben aufgestellte Theorie bzgl. der Effektivität eines Polythiolankers bestätigt werden. Ob dieser Effekt auf der gleichzeitigen Anbindung mehrerer Thiole oder auf durch die benachbarten Thiole veränderten Werte für Basizität/Nucleophilie/Redoxpotenzial beruht, kann mit diesen Ergebnissen nicht entschieden werden. Bei Untersuchungen der Cysteinadsorption an Titanoberflächen fanden *Gold et al.* insbesondere pH-abhängige ionische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Gruppen der Aminosäure und den verschiedenen ionischen Titanat-Spezies von Titanoberflächen. So zeigte z. B. die zwitterionische Form des Cysteins ($\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}(\text{CH}_2\text{SH})\text{CO}_2^-$) bei pH 3 eine starke Adsorption an die bei diesem pH-Wert vorherrschende positiv geladene TiOH_2^+ -Spezies.^[288] Die hier synthetisierten Polythiole können, zumindest im Ankerbereich, nicht als Zwitterion vorliegen. Plausibler erschiene z. B. ein Anbindungsmechanismus, bei dem ein mehrzähliger Thiolligand die an die Titanoberfläche adhärenen Wasser- und Hydroxidmoleküle aus den entsprechenden Titankomplexen verdrängt.

6.7 Multimere RGD-Peptide ohne Anker

Da die räumlichen Dimensionen für einen polyvalent wechselwirkenden Integrinligand unbekannt waren, sollte, gemäß Syntheseplanung, ein Satz von Verbindungen mit unterschiedlichem Verzweigungsgrad und *spacer*-Länge hergestellt werden. Es wurden Monomere, Dimere und Tetramere mit 1-, 2- bzw. 3-mal Hegas und ein Oktamer mit 1-mal Hegas als Spacer synthetisiert (Abb. 59).

Im Folgenden wird der Ausdruck Multimere für alle diese Verbindungen unabhängig vom Verzweigungsgrad verwendet.

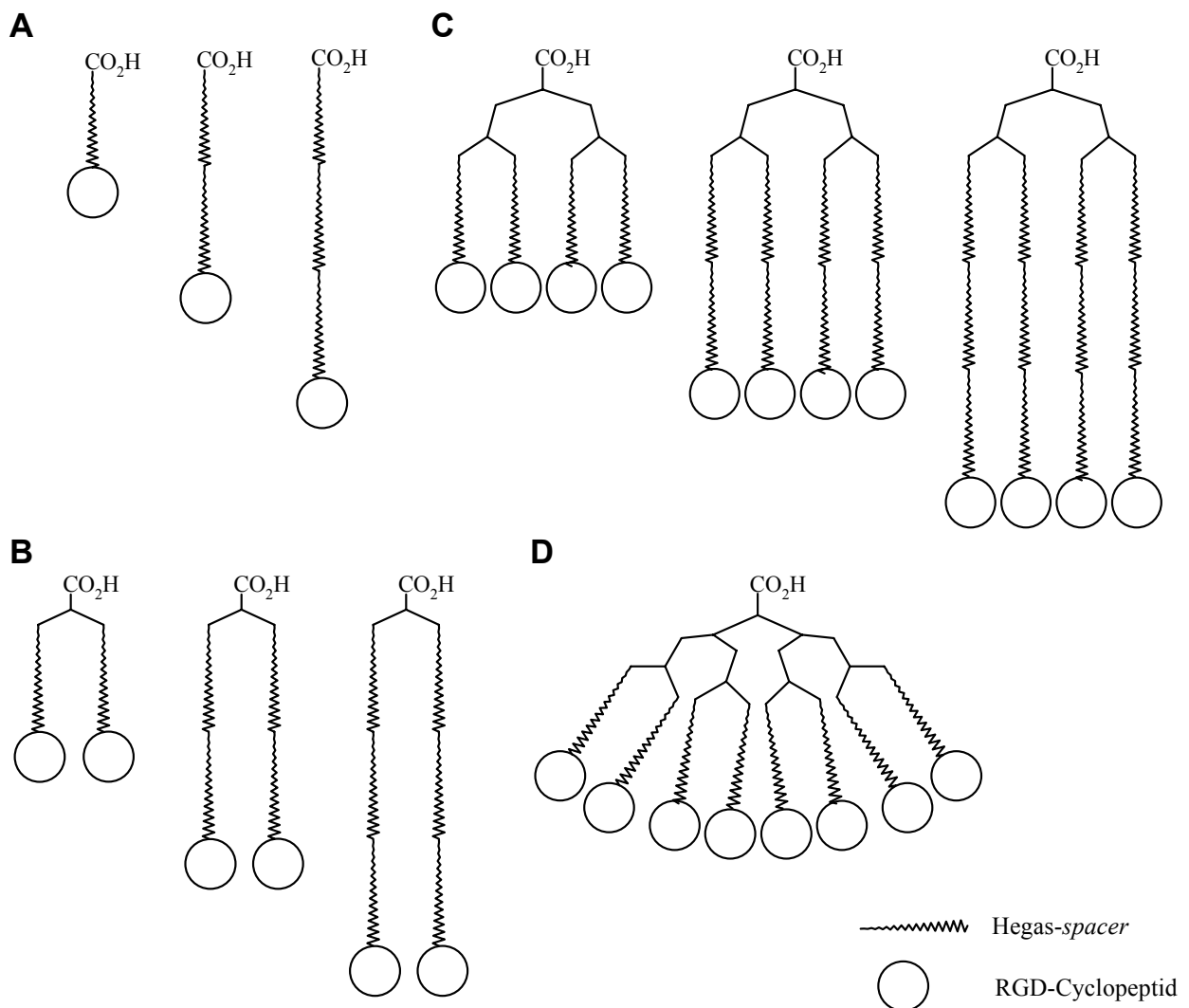


Abb. 59: Schematische Darstellung des Satzes der Monomeren (**A**), Dimeren (**B**) und Tetrameren (**C**) mit 1-3 Hegas-spacern und des oktameren (**D**) RGD-Peptide mit 1 Hegas-spacer.

Die Synthese der Multimeren wurde zunächst so durchgeführt, dass das Gerüstmolekül am TCP-Harz aufgebaut und dieses mit dem teilgeschützten *cyclo*[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) umgesetzt wurde. Nach Abspaltung des Peptids vom Harz unter Erhalt der Schutzgruppen steht der freie C-Terminus zur weiteren Funktionalisierung zur Verfügung. Ein Satz dieser Peptide wurde ohne weitere Funktionalisierung des C-Terminus vollständig entschützt. Die Verbindungen wurden auf ihre Effektivität als Integrinligand im Rezeptorassay und als polyvalente Liganden im Zellablösungs-Assay untersucht.

6.7.1 Synthese

Für die Synthese der Monomeren **M1-M3** wurde TCP-Harz mit Fmoc-Hegas-OH belegt. Dieses wurde mit der entsprechender Zahl weiterer Fmoc-Hegas-OH verlängert. Zur Kupplung wurde dazu zunächst das System TBTU/HOBt/DIPEA verwendet. Da die Fmoc-Schutzgruppe im Hegas jedoch relativ labil ist und daher z. T. Hegas-Moleküle mit freiem N-Terminus erzeugt wurden, entstanden höhere Homologe mit zusätzlichen Hegas-Molekülen (bei Verbindung **M3** 40 % Tetra-Hegas-Nebenprodukt!). Durch die konsequente Aufbewahrung von Hegas bei -18 °C und der Verwendung der schwächeren Base Collidin konnte die Bildung dieser Nebenprodukte unterdrückt werden. Die Fragmentkupplung mit 1.5 eq teilentschütztem Cyclopeptid erfolgte mit HATU/HOAt/Collidin nach einstündigem Voraktivieren. Es wurden so die Verbindungen *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-OH (**M1**), *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas₂-OH (**M2**) und *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas₃-OH (**M3**) erhalten. Das monomere RAD-Kontrollpeptid **M 11** wurde in Lösung durch Kuppeln von 20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure-*tert.*-butylester (**52**) und *cyclo*[-R(Pbf)AD(OtBu)fE-] (**Z4***) mit DIC/HOBt/DIPEA hergestellt. Nach Entschützung mit 95 % TFA und HPLC-Trennung wurden die monomeren Verbindungen in Ausbeuten von 17 – 28 % erhalten.

Für die Synthese der verzweigten Gerüstmoleküle wurde TCP-Harz wegen des vermuteten sterischen Anspruchs des verzweigten Moleküls mit einem leichten Unterschuss an Bis-Teoc-Dab-OH belegt, wodurch ein Belegungsgrad von ca 30 % erzielt

wurde. Die Abspaltung der Teoc-Schutzgruppe erfolgte in DMSO mit zehn Äquivalenten TBAF pro Teoc-Gruppe (1M TBAF-Lösung in THF) für 2 h bei 50 °C. An dieses Diamin wurden zur Synthese der Tetrameren und des Oktamers Bis-Teoc-Dab-OH mit HATU/HOAt/Collidin gekuppelt und ebenso entschützt. Für die Synthese des Oktamers wurde dieser Vorgang nochmals wiederholt.

Ab einem bestimmten Zeitpunkt entstanden bei der Entschützung der Teoc-Schutzgruppe hauptsächlich Nebenprodukte. Anstelle der Verbindung $[(\text{Teoc})_2\text{-Dab}]_2\text{-Dab-OH}$ konnte z. B. folgendes hauptsächlich auftretende Produkt im ESI-MS - anhand des typischen Zerfallsmusters für Derivate mit vier Teoc-Gruppen - identifiziert werden (Abb. 60):

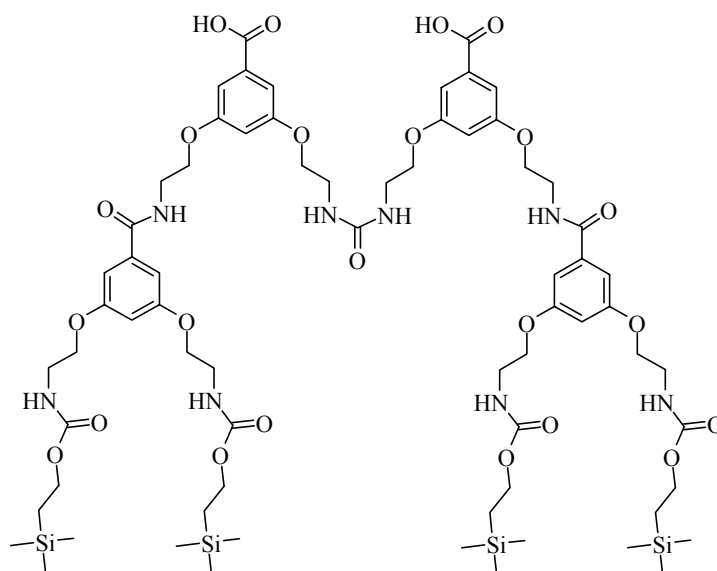


Abb. 60: Harnstoffverbrücktes Nebenprodukt, welches anstelle von $[(\text{Teoc})_2\text{-Dab}]_2\text{-Dab-OH}$ entstanden war. Die Identifizierung erfolgte über den für Verbindungen mit vier Teoc-Gruppen typischen Zerfall ($m/z = m-28$ ($\text{CH}_2\text{CH}_2?$), $m-56$, $m-84$, $m-112$) im ESI-MS.

Es wurde vermutet, dass diese harnstoffverbrückten Derivate von unvollständig zerfallenen, möglicherweise stabilisierten Carbaminsäuren oder Isocyanat-ähnlichen Zwischenstufen stammten, die dann benachbarte Moleküle miteinander vernetzen. Geringen Mengen Essigsäure und viele andere bei der Entschützung zugesetzte

Reagenzien zur Zerstörung der Carbaminsäure konnten die Bildung der Nebenprodukte nicht beeinflussen. Die nebenproduktfreie Teoc-Entschützung gelang schließlich durch die Verwendung von DMSO einer anderen Charge!

An den Verzweigungsbaum wurde Fmoc-Hegas-OH (**50**) gekuppelt (TBTU/HOBt/Collidin) und dieser Vorgang für die höheren Homologe entsprechend wiederholt. Die Fragmentkupplung des Cyclopeptids **Z3*** wurde mit HATU/HOAt/Collidin nach zweistündigem Voraktivieren durchgeführt.

Üblicherweise wurden zwei Äquivalente Fmoc-Hegas-OH bzw. 1.5 Äquivalente Cyclopeptid pro Aminogruppe für die Kupplungen eingesetzt. Besonders bei den höheren Homologen wurden nach positivem Kaisertest und/oder nach entsprechender HPLC-MS-Kontrolle Doppelkupplungen durchgeführt. Dies ist besonders bei der Synthese der stark verzweigten Strukturen wichtig, da z. B. bereits eine in einem Ast des Oktamers fehlende Aminosäure das gesamte restliche Molekül unbrauchbar macht! Nach dem vollständigem Aufbau der verzweigten Verbindungen wurden diese mit 95 % TFA und TIPS vom Harz abgespalten und entschützt. Besonders bei den höheren Homologen **M8 - M10** entstanden während der Synthese schwer trennbare Produktgemische, so dass diese Verbindungen zunächst als geschützte Verbindungen mit DCM/AcOH/TFE vom Harz abgespalten und HPLC-gereinigt wurden. Danach wurde mit 95 % TFA und TIPS die permanenten Schutzgruppen abgespalten und nochmals HPLC-gereinigt.

In der analytischen HPLC zeigte sich bei den höheren Homologen eine Verbreiterung der Signale. Zunächst wurde angenommen, dass diese aufgrund der für diese Verbindungen zu kleinen Porengröße des Trennmaterials entstünden. Später stellte sich heraus, dass das Hegas-Molekül zu einem geringen Anteil kürzere und längere Ketten mit zusätzlichen oder fehlenden Ethoxyeinheiten enthält. Diese wurden aufgrund ihrer Masse (hauptsächlich ± 44) anfänglich fälschlicherweise z. B. als doppeltes Na^+ -Addukt ($+ 2 \text{Na}^+ - 2 \text{H}^+ = 44$) interpretiert. Die Trennleistung der verwendeten HPLC-Säulen bei der Präparation dieser Verbindungen war so gut, dass verschiedene Isomere mit unterschiedlichem Gehalt und Position der zusätzlichen Ethoxyeinheit theoretisch abgetrennt werden konnten. Aus praktischen Gründen wurde jedoch darauf verzichtet.

Die verzweigten Moleküle wurden nach HPLC-Trennung in Ausbeuten von 1 - 28 % erhalten.

Insgesamt wurden folgende Verbindungen synthetisiert:

Monomere	M1 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas-OH
	M2 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂ -OH
	M3 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃ -OH erhalten
Dimere	M4 [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -Dab-OH
	M5 [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -Dab-OH
	M6 [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃] ₂ -Dab-OH
Tetramere	M7 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -Dab} ₂ -Dab-OH
	M8 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -Dab} ₂ -Dab-OH
	M9 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃] ₂ -Dab} ₂ -Dab-OH
Oktamer	M10 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -Dab} ₂ -Dab} ₂ -Dab-OH
Negativkontrollen:	M11 <i>cyclo</i> (-RADfE-)-Hegas-OH
	M12 [<i>cyclo</i> (-RADfE-)-Hegas]-Dab-OH
	M13 {[<i>cyclo</i> (-RADfE-)-Hegas]-Dab} ₂ -Dab-OH

6.7.2 Evaluierung

Zunächst wurde die Integrinaffinität der Verbindungen im Rezeptorassay untersucht (Tab. 8). Die monomeren Verbindungen weisen dieselben IC₅₀-Werte auf wie das *cyclo*(-RGDfE-)-Stammpeptid. Die verzweigten Peptide besitzen dagegen, mit steigendem Verzweigungsgrad, viel kleinere IC₅₀-Werte: Bei den Dimeren beträgt der IC₅₀-Wert etwa ein Zehntel des Wertes der Monomeren. Beim Übergang zu den Tetrameren und zum Oktamer verringert sich der IC₅₀-Wert nochmals jeweils ca. um den Faktor drei. Diese systematische Veränderung des IC₅₀-Wertes ist (ausgenommen **M7**) unabhängig von der Länge des *spacers*.

Tabelle 8: IC_{50} -Werte der multimeren RGD-Peptide ohne Anker im Rezeptor- und im Zelladhäsionsassay.

Nr.	Rezeptorassay	Inhibierung der Adhäsion
	IC_{50} [nM], $\alpha v\beta 3$ (Vn)	IC_{50} [nM], WM 164 ^a (Vn)
Z3 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)	24	nicht bestimmt
M1 (Monomer)	19	nicht bestimmt
M2	27	200
M3	19	380
M4 (Dimer)	2.1	280
M5	1.9	100
M6	1.3	270
M7 (Tetramer)	3.5	140
M8	0.4	210
M9	0.7	920
M10 (Oktamer)	0.16	170
M11 (Negativkontrolle)	73 % Inhib., 10^{-5} M	nicht bestimmt
M12	91 % Inhib., 10^{-5} M	nicht bestimmt
M13	59 % Inhib., 10^{-5} M	nicht bestimmt

^a die Melanom-Zelllinie WM 164 adhärert an Vitronectin via $\alpha v\beta 3$ -Integrine.

Als Erklärung für die Verringerung des IC_{50} -Wertes könnte man annehmen, dass die verzweigten Verbindungen nach einer initialen Bindung eines RGD-Peptids an den isolierten Rezeptor langsamer als die kleineren Homologen vom Rezeptor wegdiffundieren, wodurch die lokale RGD-Konzentration am Rezeptor erhöht ist (Abb. 24 D). Möglicherweise liegen, bedingt durch den Aufbau des Experiments, auch polyvalente Wechselwirkungen vor: Die isolierten $\alpha v\beta 3$ -Integrine werden durch Adsorption an eine PS-Oberfläche immobilisiert. Bei dem Adsorptionsprozess könnte es durch unspezifische Wechselwirkungen der Integrine untereinander zur Bildung (unphysiologischer) Cluster kommen. Diese könnten dann mit den multimeren RGD-Peptiden

multivalent wechselwirken oder zumindest, wie oben beschrieben, von der lokal erhöhten der RGD-Konzentration profitieren.

Bei der Inhibierung der Zelladhäsion werden WM 164-Zellen, die spezifisch über das $\alpha v \beta 3$ -Integrin an Vitronectin adhären, mit den RGD-Peptiden inkubiert und die Zahl der an eine Vitronectinoberfläche adhärenen Zellen bestimmt. Man geht davon aus, dass die Adhäsion der Zellen an die Vitronectin-Unterlage polyvalent ist und man könnte erwarten, dass ein polyvalenter Inhibitor diese Adhäsion, verstärkt durch die sterische Stabilisierung (Abb. 24 E), besonders effektiv inhibiert. Die verbesserten IC_{50} -Werte der verzweigten RGD-Peptide aus dem Rezeptorassay spiegeln sich in den Ergebnissen des Zelladhäsions-Assays jedoch nicht wider. Im Rahmen der Messgenauigkeit sind alle Verbindungen ähnlich aktiv. Möglicherweise ist eine polyvalente Anbindung der verzweigten RGD-Peptide aufgrund ihrer Flexibilität nicht möglich. Für eine Effektivitätssteigerung durch Abschirmung der Zelle von der Vitronectin-oberfläche (sterische Stabilisierung) ist die Größe der Moleküle wohl zu gering.

Von den Dimensionen der Multimeren wäre eine polyvalente Anbindung der Integrine theoretisch möglich: Unter der Annahme, dass sich vier Integrine mit einem gemittelten Kopfdurchmesser von 60 Å an den Ecken eines Quadrats mit der Seitenlänge 60 Å anordnen, beträgt der Abstand vom Mittelpunkt des Quadrats zum Mittelpunkt der Integrine und damit in etwa zur RGD-Bindungsstelle 42 Å (Abb. 61). Dieser Abstand sollte von den höheren Homologen **M8** und **M9** mit den Hegas₂- und Hegas₃-*spacern* überbrückt werden können (Länge Hegas im gestreckten Zustand: ca. 25 Å).

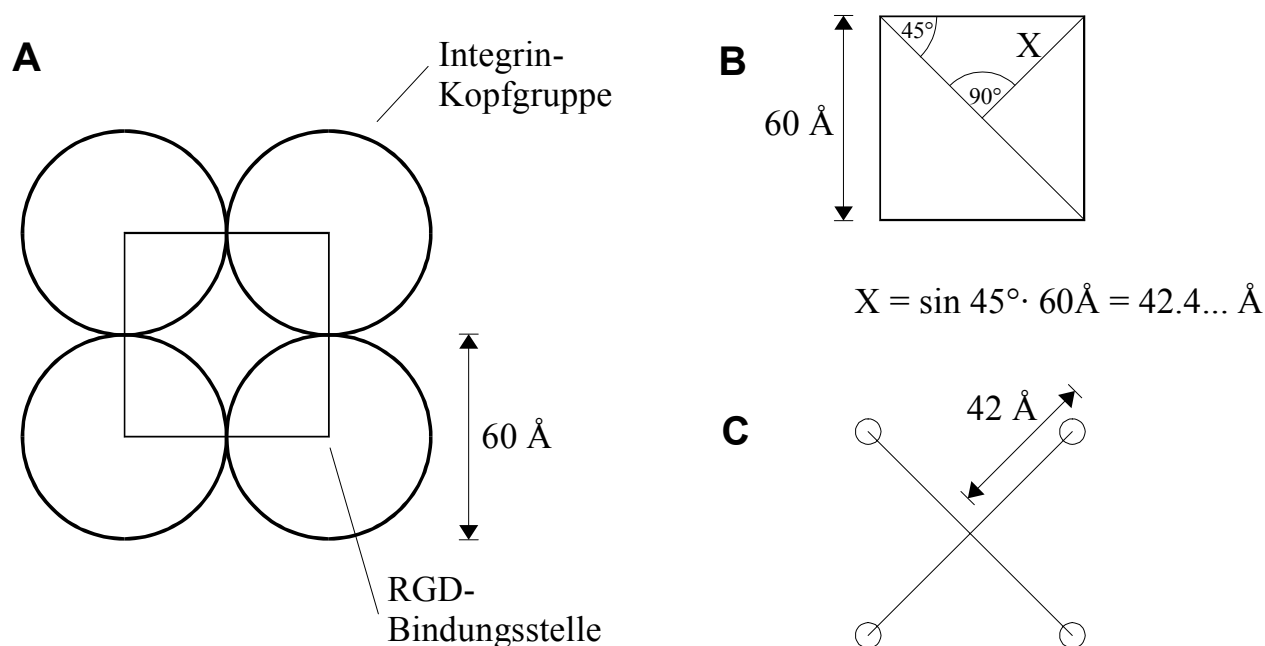


Abb. 61: **A** Schematische Darstellung der quadratischen Anordnung von vier Integri-
nen. **B** Aus dem Durchmesser der Kopfgruppen lässt sich der Abstand zum Mittelpunkt
des Quadrats berechnen und so die benötigte spacer-Länge für ein tetraivalentes
RGD-Peptid bestimmen (**C**). Für ein trivalentes oder divalenten RGD-Peptid (drei-
eckige bzw. lineare Anordnung der Integrine) beträgt die benötigte spacer-Länge 35 \AA
bzw. 30 \AA .

Tatsächlich dürfte die effektive Länge der *spacer* wohl kürzer sein als das theoretisch mögliche Maximum. Nach Wong *et al.*^[318] kann man die effektiven Länge L eines PEG-Spacers in Wasser nach der Formel $L = a \cdot N^{0.89}$ abschätzen (a : Länge einer Ethoxy-Einheit, 3.5 \AA ; N : Zahl der Ethoxy-Einheiten). Danach hätte der Hegas₃-*spacer* (21 Ethoxy-Einheiten) zwar nur eine effektive Länge von ca. 52 \AA , wäre aber noch lange genug, um die Ecken des oben erwähnten Quadrats zu erreichen. Die hier berechneten Werte für die Dimensionen eines Integrintetramers und eines entsprechenden tetrameren Liganden sind insoweit realistisch, als sie von der Natur in der Form des pentameren Penton-Base-Proteins vorkommen. Dieser virale Proteinkomplex bindet über RGD-Sequenzen an den Spitzen eines Pentagons polyvalent an seine Zielzellen. Die Seitenlänge des Pentagons beträgt 60 \AA .

6.8 Multimere RGD-Peptide mit Monothiolanker (Cysteamin-Multimere)

Um eine verbesserte Anbindung von Zellen auf Oberflächen zu erreichen, sollten RGD-Multimere zur Immobilisierung auf Oberflächen hergestellt werden. Dazu wurde der im obigen Kapitel beschriebene Satz von RGD-Multimeren unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen vom TCP-Harz abgespalten und über den freien C-Terminus mit einem Anker-molekül gekuppelt. Dazu wurde S-Triptylcysteamin **67** gewählt, welches bereits in ähnlichen Systemen verwendet wurde.^[284] Über die Thiolgruppe lassen sich die Peptide an maleinimidfunktionalisierte BSA-Oberflächen - das bei *Merck Biomaterial* am besten etablierte Oberflächenmodellsystem - anbinden. Die S-Triptylgruppe ist mit den Bedingungen der Peptidsynthese kompatibel.

6.8.1 Synthese

Der in Kap. 6.7.1 beschriebene Satz von RGD-Multimeren wurde am TCP-Harz aufgebaut und unter Erhalt der Schutzgruppen mit HFIP/DCM vom Harz abgespalten (Peptide **M1*-M9***). S-Triptyl-Cysteamin (**67**) wurde aus Triphenylmethanol und Cysteamin durch Lösen in TFA und Abziehen des Lösungsmittels hergestellt.^[284] Unter diesen Bedingungen ist die Aminogruppe protoniert und somit nicht nucleophil. Die Thiolgruppe wirkt als *scavenger* für das unter den sauren Bedingungen gebildete Triptylkation (Abb. 62).

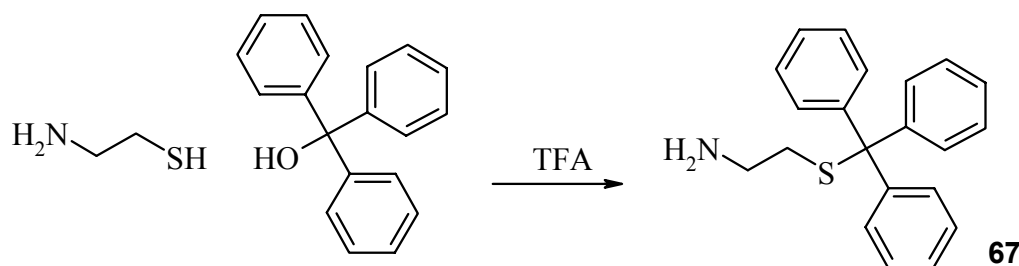


Abb. 62: Synthese von S-Triptylcysteamin (**67**) aus Trt-OH, Cysteamin und TFA.

Da sich **67** nicht wie beschrieben durch Waschen mit Essigester von Resten von Trt-OH reinigen ließ, wurde das Rohprodukt zunächst durch Ausschütteln mit NaCl-Lsg und NaHCO₃-Lsg neutralisiert. In einer Kieselgelfiltration konnte das Trt-OH mit Hexan/Essigester 9/1 ausgewaschen werden. **67** wurde anschließend mit Chloroform/Methanol 9/1 eluiert, eingedampft, in das Hydrochlorid überführt und lyophilisiert.

Die geschützten RGD-Multimeren wurden nach dem Abspalten vom Harz als Rohprodukt (**M1***-**M3***) bzw. nach HPLC-Reinigung (**M4***-**M9***) als C-terminale Komponente zur Fragmentkupplung eingesetzt. Dazu wurden **M1***-**M9*** mit HATU/HOAt/Collidin 2 h voraktiviert und anschließend mit Tritylcysteamin umgesetzt. Zunächst wurde mit einem leichten Überschuss HATU und HOAt und einem doppelten Überschuss an Tritylcysteamin gearbeitet. Da einige der Kupplungen gemäß HPLC-MS-Analytik unvollständig waren, wurde auf zwei Äquivalente HATU und HOAt sowie vier Äquivalente Tritylcysteamin erhöht. Die Kupplungsprodukte wurden mit 95 % TFA und TIPS entschützt und HPLC-getrennt. Die Ausbeuten der Endverbindungen betragen, ausgehend von den geschützten Verbindungen **M1***-**M9***, nach HPLC-Trennung 2-48 %.

Folgende Verbindungen wurden synthetisiert:

- | | |
|-----------|--|
| Monomere | M1C <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas-N-mercaptoethyl |
| | M2C <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂ -N-mercaptoethyl |
| | M3C <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃ -N-mercaptoethyl |
| Dimere | M4C [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -Dab-N-mercaptoethyl |
| | M5C [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂]-Dab-N-mercaptoethyl |
| | M6C [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃]-Dab-N-mercaptoethyl |
| Tetramere | M7C {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -Dab} ₂ -Dab-N-mercaptoethyl |
| | M8C {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -Dab} ₂ -Dab-N-mercaptoethyl |
| | M9C {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃] ₂ -Dab} ₂ -Dab-N-mercaptoethyl |

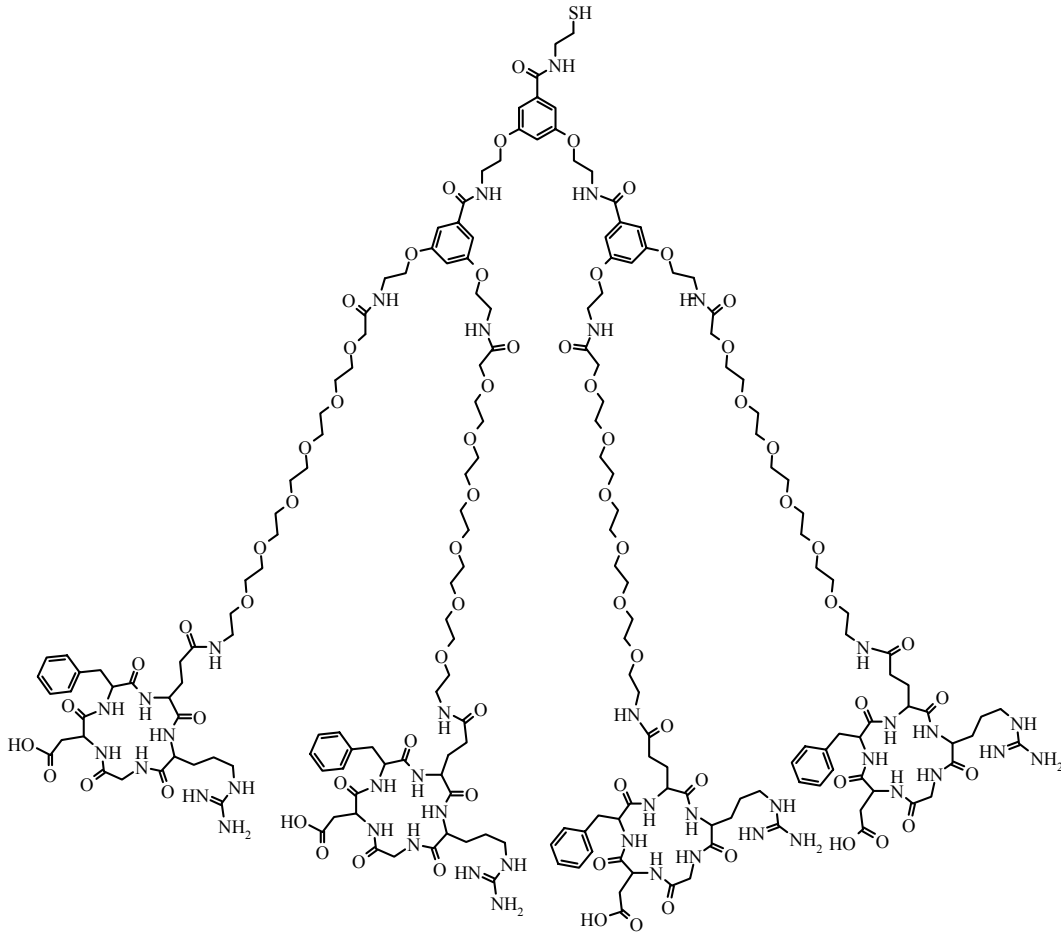


Abb. 63: Das Tetramer **M7C**.

Die Fragmentkupplungen mit S-Tritylcysteamin wurden für die einzelnen Verbindungen nicht optimiert und verliefen z. T. unvollständig. Wegen der geringen Substanz- und Lösungsmittelmengen traten auch präparative Schwierigkeiten auf. Teilweise wurden die Zielverbindungen in Mengen von < 1 mg erhalten und konnten somit bei *Merck Biomaterial* nicht ausreichend getestet werden. Die Synthese dieser Verbindungen wurde dennoch nicht wiederholt, da mit dem zwischenzeitlich entwickelten Tricystein ein optimierter Anker für Titanoberflächen und mit dem „alles-am-Harz-Konzept“ eine verbesserte Synthesemethode für die verzweigten Verbindungen zur Verfügung stand. Die Synthese der sich daraus ergebenden Tricysteinmultimere ist im Kapitel 6.9 beschrieben.

Es wurde auch versucht, die geschützten Peptide **M1***-**M9*** mit H-Tyr(tBu)-OtBu zu koppeln um Radioiod-markierbare Verbindungen zu erhalten. Diese Kupplungen führten jedoch zu noch geringeren Ausbeuten als mit S-Tritylcysteamin und wurden

nicht weiter verfolgt. Die Suche nach einer Alternative führte schließlich zur Synthese der Aminoxy-Multimeren (Kap. 6.10.3).

6.8.2 Evaluierung

Das Monomer **M1C**, das Dimer **M4C** und das Tetramer **M7C** wurden zusammen mit dem Kontrollpeptid **EMD 73 450** auf verschiedenen Oberflächen getestet. Zunächst wurden die Anbindung dieser Peptide auf einer BSA-beschichteten Oberfläche untersucht.

Im ELISA^[2] wurde die Anwesenheit der RGD-Peptide auf dem BSA nachgewiesen (Abb. 64). Die Werte der Verbindungen untereinander unterscheiden sich nicht signifikant, lediglich die des Monomers **M1C** sind etwas geringer. Ein quantitativer Vergleich zwischen Monomer und Tetramer bzgl. der tatsächlich immobilisierten Peptidmenge ist mit dem ELISA nicht möglich, da zu viele spekulative Annahmen bezüglich Bindungswalenz und Platzbedarf des Antikörpers gemacht werden müssten.

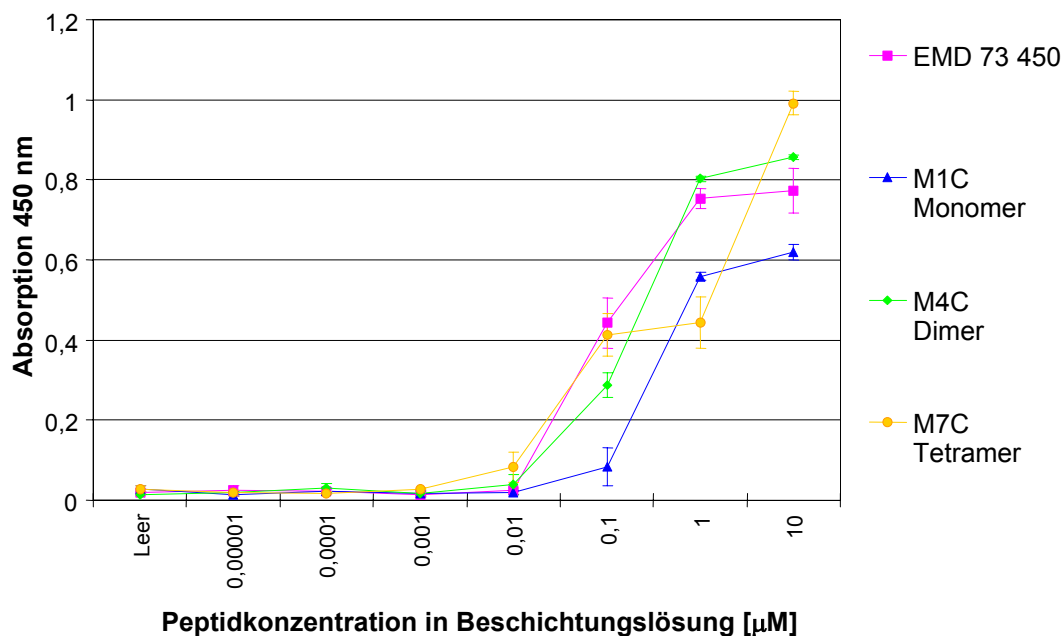


Abb. 64: ELISA einer mit **M1C**, **M4C**, **M7C** und **EMD 73 450** funktionalisierten BSA-Oberfläche.

In der Zelladhäsion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Peptiden (Abb. 65). Damit spiegelt sich die Tendenz der Ergebnisse des entsprechenden ELISA in der Zelladhäsion wider. Die maximale Zelladhäsionsrate für die Kontrolle **EMD 73 450** ist in diesem Versuch vergleichsweise gering; sie erreicht üblicherweise Werte von ca. 70-100 % (Abb. 13).

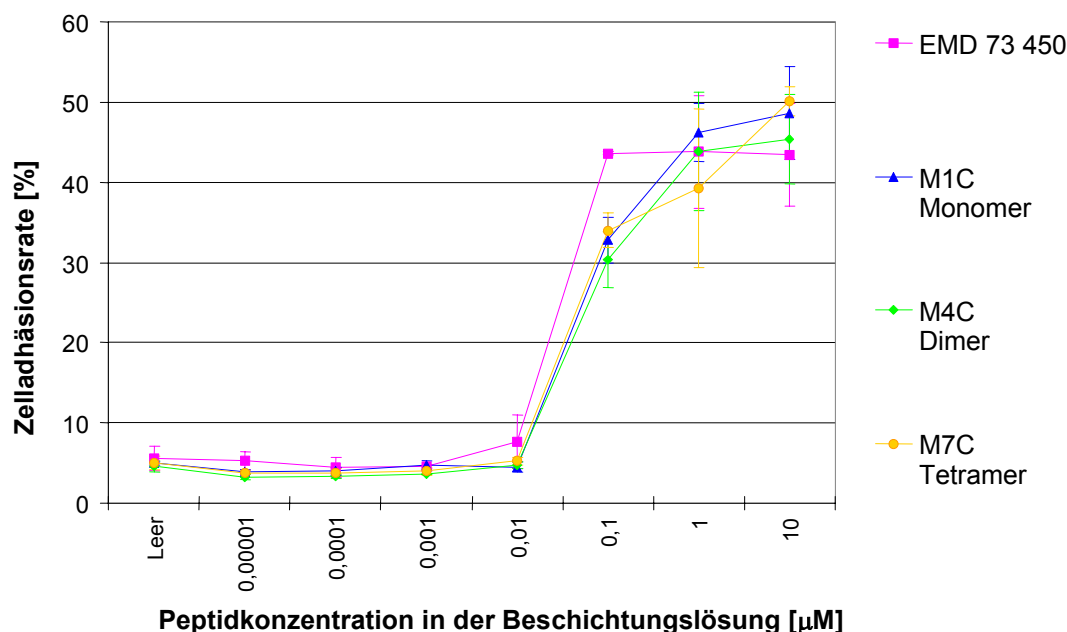


Abb. 65: Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten an eine mit **M1C**, **M4C**, **M7C** und **EMD 73 450** funktionalisierten BSA-Oberfläche.

Auf Titan zeigte sich im ELISA ein deutlicher Unterschied zwischen dem Monomer **M1C** und dem Tetramer **M7C** (Abb. 66). Unter der Annahme, dass der ELISA von der Materialoberfläche unabhängig ist, wird auf Titan relativ mehr Tetramer als Monomer gebunden, verglichen mit BSA. Möglicherweise stehen dem sterisch anspruchsvolleren Tetramer auf der Titanoberfläche vergleichsweise mehr Anbindungsmöglichkeiten zur Verfügung als auf dem Maleinimid-funktionalisierten BSA. Für eine weitergehende Untersuchung der Zelladhäsion auf Titan stand nicht genügend Peptid zur Verfügung.

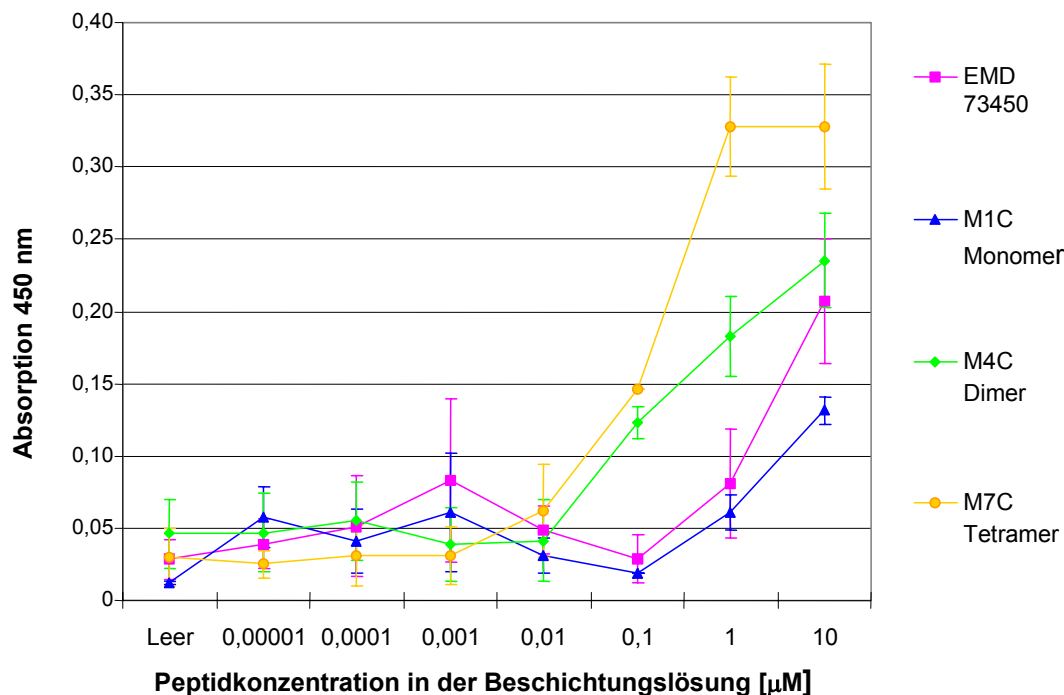


Abb. 66: ELISA von mit **M1C**, **M4C**, **M7C** und **EMD 73 450** beschichteten Titanplättchen.

Weiterhin wurde PMMA-Knochenzement (*Palacos®*, Merck Biomaterial) mit diesen Verbindungen beschichtet (Abb. 67). Der Mechanismus der Anbindung ist unklar. Im ELISA wurden tendenziell die gleichen Werte wie auf Titan gemessen. Auch hier ist der Wert im ELISA für das Tetramer **M7C** höher als für das Monomer **M1C**. Die Absolutwerte des ELISA bei höheren Peptidkonzentrationen liegen deutlich über den Werten, die auf Titan bestimmt wurden.

Auf dem mit **M1C**, **M4C**, **M7C** und **EMD 73 450** beschichtetem PMMA-Material wurden die Adhäsion von humanen Chondrozyten untersucht (Abb. 68). Das Tetramer **M7C** stimuliert die Chondrozytenadhäsion wesentlich besser als das Monomer **M1C**. Damit spiegelt sich der Trend der Ergebnisse des entsprechenden ELISA in der Zelladhäsion wider.

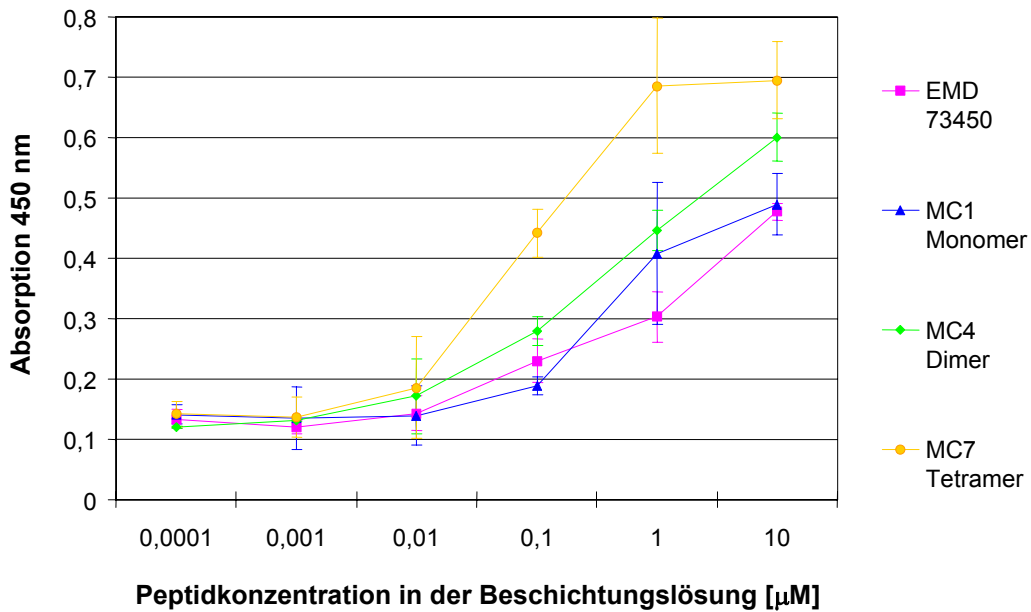


Abb. 67: ELISA von mit *M1C*, *M4C*, *M7C* und *EMD 73 450* beschichtetem PMMA-Knochenzement (*Palacos*®, Merck Biomaterial).

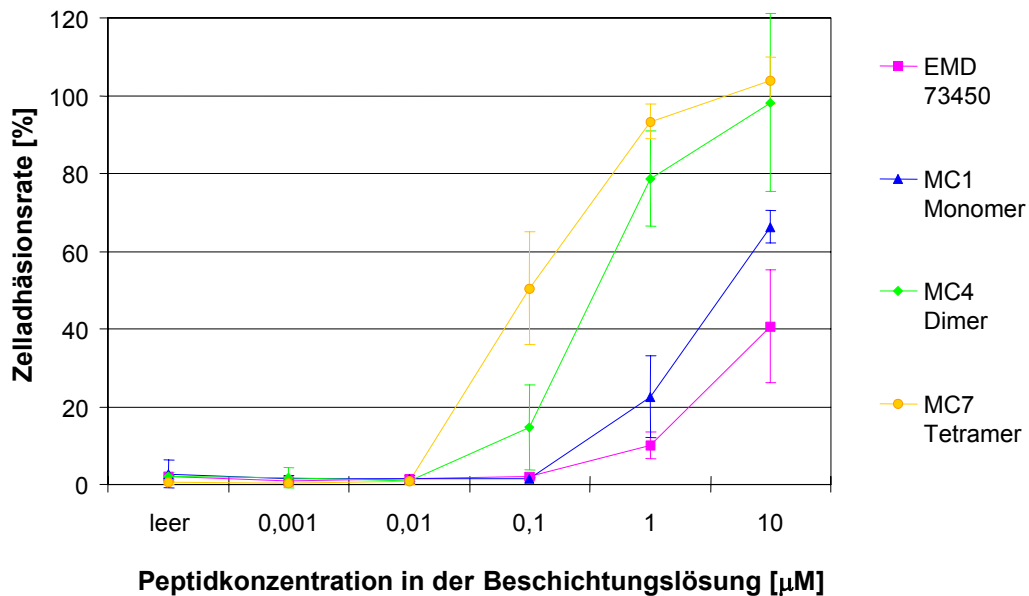


Abb. 68: Adhäsion humaner Chondrocyten an mit *M1C*, *M4C*, *M7C* und *EMD 73 450* beschichteten PMMA-Knochenzement (*Palacos*®, Merck Biomaterial).

Auf welche Ursache die erhöhte Zahl adhärenz Chondrocyten im Falle der Tetramer-beschichteten Oberfläche letztendlich zurückgeht kann aus diesen Versuchen nicht beantwortet werden. Denkbar wären eine Erhöhung der lokalen Konzentration der RGD-Einheiten, aber auch Erhöhung (maximal Vervierfachung) der allgemeinen RGD-Konzentration auf der Oberfläche wenn man annimmt, dass das Tetramer ähnlich gut an die PMMA-Oberfläche bindet wie das Monomer. Eine polyvalente Anbindung des Tetramers ist hier eher unwahrscheinlich: Der Maximalabstand zwischen zwei RGD-Einheiten im Tetramer **M7C** beträgt bei vollkommen gestreckten Spacermolekülen ca. 50 Å. In dieser unrealistischen Konformation würde diese Distanz nur knapp den Abmessungen der Integrin-Kopfgruppe und damit in erster Näherung auch der Entfernung zwischen den zentral gelegenen RGD-Bindungsstellen zweier Integrine entsprechen.

6.9 Multimere RGD-Peptide mit Tricysteinanker (Tricystein-Multimere)

Die vielversprechenden Zelladhäsions-Ergebnissen von mit Cysteamin-Multimeren beschichteten PMMA- und Titan-Oberflächen einerseits und die unbefriedigenden Ausbeuten bei der Synthese der Cysteamin-Multimeren andererseits motivierte die Entwicklung ähnlicher, synthetisch besser zugängliche RGD-Multimere. Dafür sollte die während der Synthese der Cysteamin-Multimeren entwickelte „alles-am-Harz-Strategie“ verwendet werden. Da das wirtschaftliche Interesse an einer Beschichtung von Titan größer war als das einer Beschichtung von PMMA, bot sich die Verwendung des für die Titanbeschichtung optimierten Tricysteinankers an.

6.9.1 Synthese

Der Tricysteinanker wurde entsprechend Kap. 6.6.1 am TCP-Harz aufgebaut. Für die Kupplungen wurde Collidin als Base verwendet, um eine Racemisierung des Fmoc-Cys(Trt)-OH zu vermeiden.^[411] Als Verzweigungseinheit wurde zunächst Bis-Teoc-Dab-OH an den Tricysteinanker gekuppelt. Unter den Bedingungen der Teoc-

Entschützung wurde jedoch das gesamte Peptid vom Harz abgespalten. Diese Abspaltung war bei der Verwendung von Bis-Teoc-Dab-OH (**59**) als erste Aminosäure am TCP-Harz nicht zu beobachten. Wahrscheinlich ist die Bindung der Carboxylgruppe der Benzoesäure an die Tritylgruppe durch sterische Abschirmung und Konjugation mit dem elektronenreichen Dialkoxy-Benzolsystem viel stabiler als die Bindung der Cystein-Carboxylgruppe (vergleiche die Stabilität des Methylesters Bis-Fmoc-Dab-OMe **55**). Die Dab-Verzweigungseinheit wurde durch Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (**27**) ersetzt, welches in der Peptid-Festphasensynthese der MAPs eingesetzt wird.^[332] Die Kupplungen von **27** (2.5 Äquivalente) wurden mit TBTU/HOBt/DIPEA durchgeführt, zum Aufbau der Tetramere und des Oktamers als Doppelkupplungen. Die Kupplungen mit der *spacer*-Aminosäure Fmoc-Hegas-OH (**50**) (2.5 Äquivalente) erfolgten mit TBTU/HOBt/Collidin. Die Fragmentkupplung mit den Cyclopeptiden **Z3*** bzw. **Z4*** (jeweils 1.5 Äquivalente) wurde mit PyBOP/HOBt/Collidin ohne Voraktivierung durchgeführt. Nach jedem Kupplungsschritt mit Fmoc-Hegas oder Cyclopeptid wurde mit Kaiser-Test und/oder HPLC-MS auf Vollständigkeit der Kupplung überprüft und gegebenenfalls Doppelkupplungen durchgeführt. Die Tricystein-Multimeren und ihre Vorläufermoleküle sind wegen der drei S-Tritylschutzgruppen im Anker sehr unpolar und müssen vor der HPLC-Analytik geschützt werden. Nach der letzten Kupplung wurden die Tricystein-Multimeren mit 95 % TFA und TIPS vom TCP-Harz abgespalten und geschützt und anschließend HPLC-gereinigt. Die höheren Homologen **T8** - **T10** mussten wegen des entstandenen komplexen Produktgemisches doppelt HPLC-gereinigt werden. Eine HPLC-Trennung auf der Stufe der geschützten Peptide, analog zu **M6***, **M8*** und **M9***, war selbst mit einer C₄-RP-Säule wegen der Unpolarität von **T8*** - **T10*** nicht möglich. Die Verbindungen **T1-T12** wurden nach HPLC-Trennung in Ausbeuten von 2-40 % erhalten.

Folgende Verbindungen wurden synthetisiert:

Monomere	T1 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas-CCC-OH
	T2 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂ -CCC-OH
	T3 <i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃ -CCC-OH
Dimere	T4 [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K-CCC-OH
	T5 [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -K-CCC-OH
	T6 [<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃] ₂ -K-CCC-OH
Tetramere	T7 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K} ₂ -K-CCC-OH
	T8 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂] ₂ -K} ₂ -K-CCC-OH
	T9 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas ₃] ₂ -K} ₂ -K-CCC-OH
Oktamer	T10 {[<i>cyclo</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K} ₂ -K} ₂ -K-CCC-OH
Negativkontrollen	T11 <i>cyclo</i> (-RADfE-)-Hegas-CCC-OH
	T12 {[<i>cyclo</i> (-RADfE-)-Hegas] ₂ -K} ₂ -K-CCC-OH

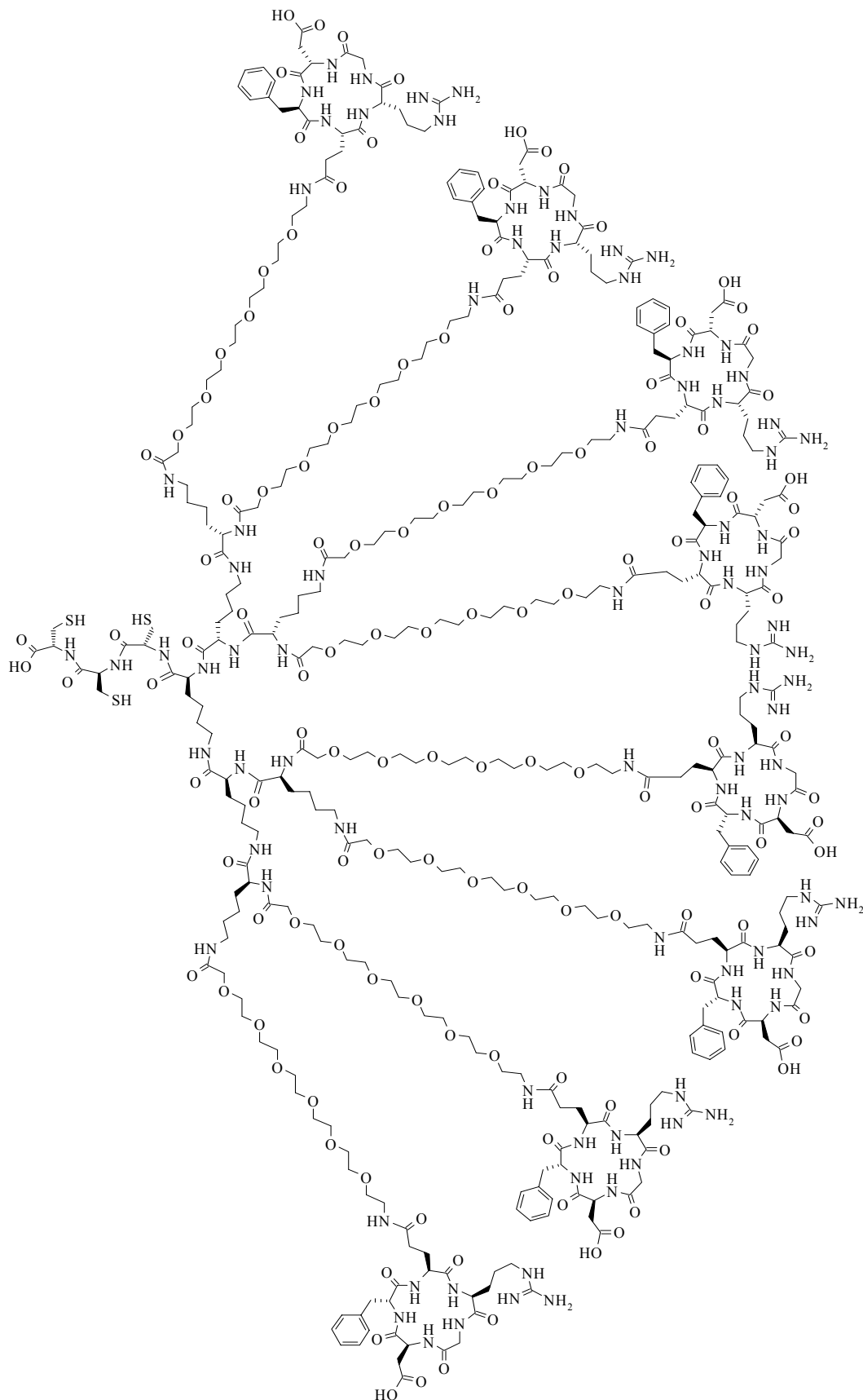


Abb. 69: Das Oktamer T10.

6.9.2 Evaluierung

Die Peptide **T1-T12** wurden zunächst zusammen mit **EMD 73 450** auf einer BSA-beschichteten Oberfläche getestet. Im ELISA^[2] liegen die Werte der monomeren Verbindungen **T1-T3** unter denen des Kontrollpeptids **EMD 73 450** (Abb. 70). Die Werte für die höheren Homologen **T4-T10** sind teilweise kleiner oder ähnlich dem Kontrollpeptid. In der Tendenz entsprechen die Werte denen der verzweigten Cysteaminpeptide (Abb. 70). Die Negativkontrollen **T11** und **T12** zeigen die entsprechenden Werte.

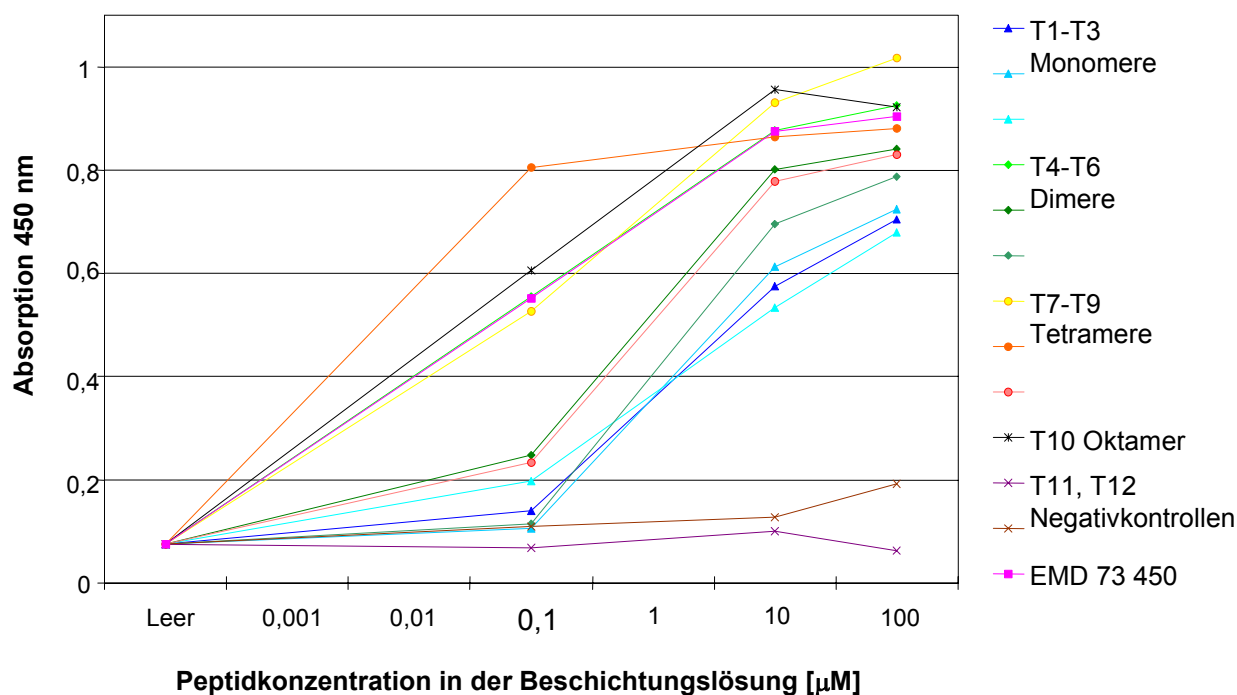


Abb. 70: ELISA einer mit **T1-T12** und **EMD 73 450** funktionalisierten BSA-Oberfläche. Die Fehlerbalken der Standardabweichung (i. d. R. Werte zwischen 0.01-0.07) wurden zur besseren Übersicht weggelassen.

In der Zelladhäsionsrate der Verbindungen **T1-T10** auf BSA gibt es einen deutlichen Unterschied zwischen monomeren und verzweigten Peptiden (Abb. 71): Während die Monomeren **T1-T3** die Zelladhäsion ähnlich effektiv stimulieren wie das Kontroll-

peptid **EMD 73 450**, sind die Werte für die verzweigten Verbindungen **T4-T10** nur etwa halb so groß. Damit wird die Tendenz der Werte des ELISA nicht wiedergegeben.

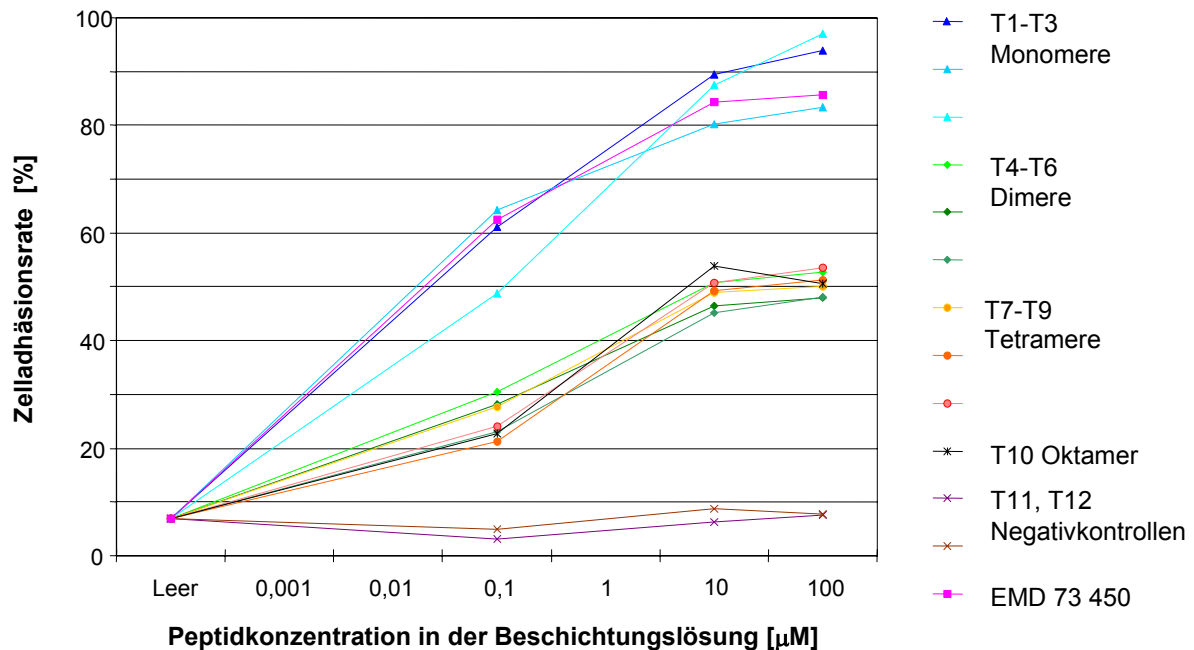


Abb. 71: Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten an eine mit **T1-T12** und **EMD 73 450** funktionalisierten BSA-Oberfläche. Die Fehlerbalken der Standardabweichung (i. d. R. Werte von 1-6) wurden zur besseren Übersicht weggelassen.

Theoretisch sollte die Zelladhäsionsrate mit **T1**, **T4** und **T7** der mit den analogen Peptide **M1C**, **M4C** und **M7C** entsprechen (Abb. 65). Dies trifft nur für **T4** und **T7** zu. Der von **T1** abweichende niedrige Wert für **M1C** könnte damit begründet werden, dass auch der Wert für und **EMD 73 450** in Abb. 65 niedriger als z. B. in Abb. 13 liegt. Die geringere Effektivität der verzweigten Peptide **T4-T10** wird möglicherweise ähnlich wie bei den verzweigten Peptiden **M4C** und **M7C** durch deren verminderte Anbindung an den SMPB-Linker verursacht.

Auf Titan zeigte sich im ELISA ein deutlich höherer Wert für das Oktamer **T10** als für das Monomer **T1** (Abb. 72). Diese Tendenz entspricht der bei den Cysteaminpeptiden auf Titan (Abb. 66). Der Unterschied zwischen **T1** und **T10** ist hier weniger ausge-

prägt, da der Absolutwert für **T1** aufgrund des für Titan optimierten Tricysteinankers viel höher liegt.

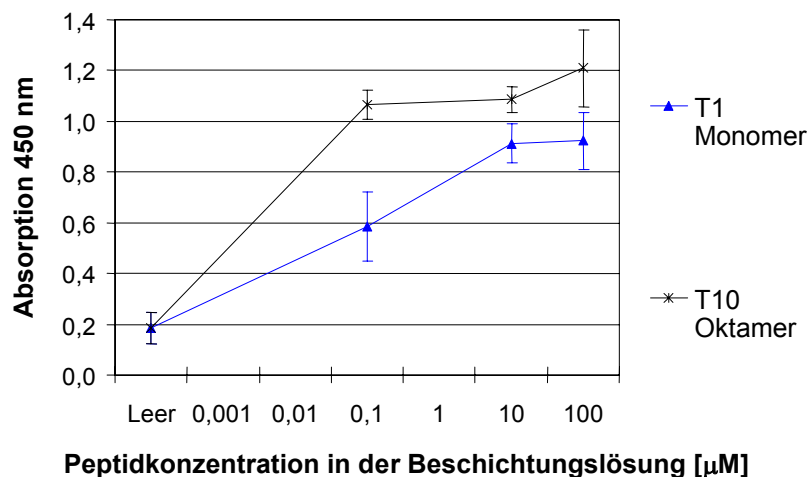


Abb. 72: ELISA von mit **T1**, **T10** und **EMD 73 450** beschichteten Titanplättchen.

Die Werte der Zelladhäsionsrate für die Verbindungen **T1** und **T10** auf Titan (Abb. 73) entsprechen dem Bild der Werte des ELISA. Das Oktamer **T10** erreicht dabei bereits bei einer Konzentration von 10 µM in der Beschichtungslösung sogar einen Absolutwert von 87 % Zelladhäsionsrate, was mit der Adhäsionsrate von **EMD 73 450** auf BSA vergleichbar ist!

Die anderen Tricystein-Multimere **T2** - **T9** werden zu Zeit noch bei *Merck Biomaterial* getestet. Vorläufig stellt das oktamere Tricystein-Multimer **T10** das effizienteste in unserer Arbeitsgruppe synthetisierte Peptid zur Stimulierung der Zelladhäsion auf Titan dar. In der Literatur sind bislang keine ähnlich optimierten Verbindungen für die Stimulierung der Zelladhäsion auf Titan erwähnt.

Weiterhin werden die Tricystein-Multimeren in der Arbeitsgruppe von *Prof. Spatz* (Universität Heidelberg) auf nanostrukturierten Goldoberflächen getestet. Durch die Multimeren wird eine zweite Ebene der räumlichen Diversität eingeführt. Von diesen komplex strukturierten zelladhäsiven Oberflächen erhofft man sich Erkenntnisse über das Integrinclustern und das Zelladhäsionsverhalten.

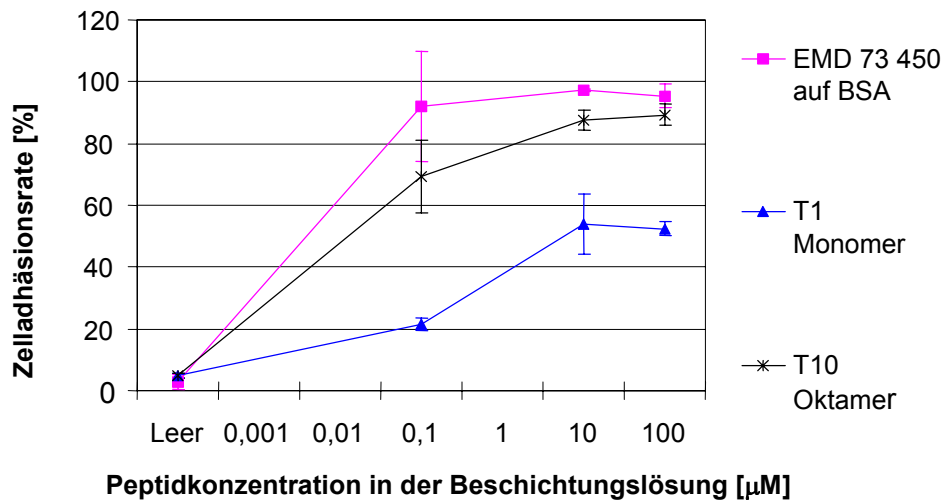


Abb. 73: Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten an Titanplättchen, welche mit T1, T10 und EMD 73 450 beschichtet wurden.

6.10 Multimere RGD-Peptide für die Tumordiagnostik (Aminoxy-Peptide)

6.10.1 Targeting mit (RGD)-Peptiden

Wirkstoffe, z. B. Chemotherapeutika müssen oft in hohen Dosen verabreicht werden, damit am erwünschten Zielorgan eine physiologisch wirksame Anreicherung erzielt wird. Das führt zu Nebenwirkungen in den anderen Bereichen des Organismus und zu allgemeinen Belastungen bei der Metabolisierung dieser Verbindungen, zumeist in der Leber. Eine Lösung für diese Probleme würden idealerweise Wirkstoffe darstellen, welche die erkrankten Bereiche gezielt ansteuern. Dieses sog. *targeting* der gewünschten Bereiche wurde mit Antikörpern für Oberflächenstrukturen der Zielzellen erfolgreich entwickelt.^[412-415] Einige dieser Antikörper sind bereits klinisch zugelassen oder befinden sich in fortgeschrittenen klinischen Studien.^[416-419] Eine attraktive Anwendung des *targetings* mit Antikörpern stellt deren Konjugation mit weiteren Wirkstoffen, z. B. mit Calicheamicin,^[420] oder mit Radionukliden dar.^[421-423] Letzteres könnte für bildgebende Verfahren (*imaging*) in der Tumordiagnostik oder zur Radiotherapie verwendet werden. Eine Therapie mit Antikörper besitzt jedoch

inhärente Nachteile: Neben der Immunogenität, die eine mehrfache Gabe von Antikörpern einschränken kann, wirkt die unspezifische Aufnahme (und der Abbau) in Organe wie Leber, Milz und Knochenmark sowie das relativ hohe Molgewicht, was das Eindringen in die schlecht vaskularisierten Tumorbereiche erschwert, limitierend.^[424] Eine attraktive Alternative stellen kleine Peptide dar, die mit Rezeptoren oder Oberflächenstrukturen der Zielzellen wechselwirken.^[424-426] Peptide können einfach synthetisiert werden und relativ leicht mit verschiedenen Wirkstoffen oder Radionukliden funktionalisiert werden. Die schnelle Metabolisierung der Peptide kann durch die Verwendung von D-Aminosäuren, Cyclisierung, Modifizierung von N- und C-Terminus oder weitergehender Veränderungen der Peptidbindungen verringert werden. Eine Reihe von Rezeptoren und Oberflächenstrukturen von Tumorzellen und deren umgebende, neoangiogenetische Strukturen sind als Zielmoleküle für kleine Peptide bekannt, z. B. die Somatostatin-Rezeptoren,^[427] Integrine,^[56, 428] Myeloma M-Protein,^[429] Urokinase,^[430] Aminopeptidase N^[431] und P,^[432] Prostata-spezifisches Antigen,^[433] VEGF,^[434] E-Selectin,^[435] MMPs,^[436] Bradykinin^[437] und andere.^[424] Für viele weitere spezifischen Tumorstrukturen konnten durch Phagendisplay und kombinatorische Synthese Peptidliganden entwickelt werden, ohne dass die Zielstruktur genau bekannt ist.^[424]

Am meisten Aufmerksamkeit haben bisher die Somatostatinrezeptorliganden und die integrinadressierenden RGD-Peptide gefunden. Von den Somatostatinanaloga wird Octreoscan® [¹¹¹In-Diethylenaminpentaacetat(DTPA)]-Octreotid (disulfidverbrücktes phe-Cys-Phe-trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)) bereits routinemäßig zur nicht-invasiven Diagnostik verschiedener Tumoren eingesetzt. Inzwischen wurden auf diesem Gebiet verbesserte Verbindungen zum *imaging* und auch zur Endoradiotherapie entwickelt.^[427] Weiterhin werden Konjugate von Somatostatinanaloga mit Antitumor-Wirkstoffen wie Taxol,^[438] Methotrexat^[439] und Doxorubicin^[440, 441] erforscht.

Auf dem Gebiet der RGD-Peptide wurden Konjugate mit Doxorubicin^[442, 443] und Tachyplesin^[444] beschrieben. Weiterhin wurden zum *targeting* RGD-Konjugate mit DNA,^[445, 446] Liposomen,^[447, 448] Proteinen^[345, 449-451] und viralen Vektoren^[452] verwendet. Für bildgebende Verfahren wurden RGD-Peptide mit Eisenpartikeln zum Magnetresonanz-*imaging* (MRI),^[453] mit Farbstoffen zum Fluoreszenz-*imaging*^[454]

und mit Radionukliden wie ^{99m}Tc , ^{188}Re , ^{111}In , ^{125}I und ^{18}F für die Scintigraphie, SPECT (*single photon emission computer tomography*) und PET (*positron emission tomography*) funktionalisiert.^[350, 455-463] Es wurden auch bereits Radioiod-markierbaren RGD-Mimetika am murinen Modell erfolgreich im Tumor-*imaging* eingesetzt.^[78, 464]

In der Nuklearmedizin stehen grundsätzlich unterschiedliche Radionuklide zur Verfügung. Die Auswahl des Radionuklids erfolgt in Abhängigkeit der gewünschten Eigenschaften wie Strahlungsart (α , β^+ , β^- , γ , Auger), Strahlungsintensität, Halbwertszeit und Verfügbarkeit. Als diagnostische Verfahren sind die Tomographie-Methoden SPECT und insbesondere PET besonders aussagekräftig. PET erlaubt neben einer hohen räumlichen Auflösung auch die Möglichkeit der Quantifizierung des akkumulierten Radioisotops.^[465, 466] Die wichtigsten Radioisotope dafür sowie eine Auswahl weiterer, z. B. in der Therapie eingesetzter Radionuklide sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Für die nichtinvasive Bildgebung eingesetzte Radioisotope sowie eine Auswahl weiterer wichtiger Radionuklide.

Isotop	$t_{1/2}$	Strahlung	Energie [keV]	Verwendung	Markierungsmethode
^{11}C	20 min	β^+	960	PET	Alkylierung mit $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, $\text{S}_{\text{N}}2$ mit $^{11}\text{CN}^-$
^{18}F	1.8 h	β^+	635	PET	Substitutionsreaktion von F^- oder „ F^{+} “
^{124}I	4.2 d	β^+ (25%)	294	PET	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{68}Ga	68 min	β^+ (88%)	1899	PET	Komplexierung
^{123}I	13 h	γ	159	SPECT	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{99m}Tc	6 h	γ	140	SPECT	Komplexierung
^{111}In	2.8 d	γ , Auger	247	SPECT	Komplexierung
^{125}I	8 d	β^-	364	Szintigraphie	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{131}I	8.0 d	γ , β	606	Radiotherapie	$\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$
^{177}Lu	6.7 d	β	490	Radiotherapie	Komplexierung
^{188}Re	17 h	γ , β	2118	Radiotherapie	Komplexierung
^{90}Y	2.7 d	β^-	2270	Radiotherapie	Komplexierung

Für PET-Untersuchungen werden hauptsächlich die Positronenstrahler ^{11}C -Kohlenstoff, ^{18}F -Fluor und ^{124}I -Iod eingesetzt. Das ^{11}C -Kohlenstoffisotop hat eine sehr geringe Halbwertszeit ($t_{1/2} = 20$ min), was eine schnelle Synthese zur Einführung dieses Isotops erfordert. Diese erfolgt häufig durch Methylierung mit [^{11}C]Methyliodid oder durch nukleophile Substitution mit [^{11}C]Cyanid. ^{18}F -Fluor ist ein optimaler PET-Tracer, da das Isotop ein 100 %iger Positronenstrahler ist und eine Halbwertszeit ($t_{1/2} = 1.8$ h) hat, die in vielen Fällen ausreichend ist für Markierung und Detektion, den Organismus aber nicht zu langer Strahlenbelastung aussetzt. Fluor kann durch nukleophile Substitution mit NaF (insbesondere nach Komplexierung des Natriumions, z. B. mit Kryptofix® 222) oder in einer Schiemann-Reaktion mit [B^{18}FF_3] $^-$ sowie durch elektrophile aromatische Substitution z. B. mit Acetylhypofluorid eingeführt werden.^[462] Oft werden auch [^{18}F]-markierte prosthetische Gruppen, wie 2- ^{18}F -Fluorpropionsäure oder 4- ^{18}F -Fluorbenzoesäure in einer Acylierungsreaktion eingesetzt.^[457] ^{124}I -Iod ist lediglich zu 25 % ein Positronenstrahler und wird hauptsächlich in der Forschung verwendet. Das Isotop kann durch elektrophile aromatische Substitution in ortho-Position zu einer phenolischen OH-Gruppe (z. B. mithilfe von Chloramin T oder nach der Iodogen®-Methode^[467]) oder durch ipso-Substitution von aromatischen Silyl- und Stannylderivaten^[468] eingeführt werden.

Zu den γ -Strahlern, die in der SPECT eingesetzt werden, gehören vor allem ^{123}I od, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ hnetium und ^{111}In dium. Die Technetium-Markierung (und allgemein die Markierung mit den verschiedenen dreiwertigen radioaktiven Metallkationen) wird durch Komplexierung mit mehrzähligen Liganden wie z. B. 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-tetraessigsäure (DOTA) erreicht, die über einen Linker mit der biologisch aktiven Verbindung verknüpft sind.

6.10.2 Aufgabenstellung und Syntheseplanung

Zusammen mit G. Thumshirn sollten in Kooperation mit der Nuklearmedizin des Klinikums Rechts der Isar (München) radiomarkierbare multimere *cyclo*(-RGDfX)-Derivate entwickelt werden. Von den Multimeren RGD-Peptiden wird durch polyvalente Anbindung an die Zielzellen ein verbessertes *targeting* und somit ein höheres

Tumor/Organ-Verhältnis der in den Organismus eingebrachten Radioaktivität erwartet, verglichen mit den bisher verwendeten monomeren RGD-Peptiden. Die radiomarkierten RGD-Multimere sollten bezgl. ihrer potenziellen Verwendung für die am Klinikum vorhandenen SPECT- und PET-Technologie untersucht werden. Als Radionuklid wurde Iod gewählt, welches mit seinen verschiedenen Isotopen vielseitig einsetzbar ist und auch relativ leicht in Moleküle eingebaut werden kann (s. o.). Es wurde zunächst nur ein Vorläufer-Molekül (*precursor*) hergestellt, welches dann erst unmittelbar vor der Untersuchung zur radioaktiven Verbindung umgesetzt werden sollte. Neben einer schnellen und effizienten Umsetzung des *precursors* sollte das entstehende Produkt stabil und eindeutig definiert sein. Aus dem letztgenannten Grund wurde nur eine Iodierungsstelle in das Molekül eingebaut, um keine unterschiedlichen Iodierungsprodukte zu erhalten. Tyrosin ist das am häufigsten für die Radioiodierung von Peptiden verwendete *precursor*-Molekül und kann bequem nach den o. g. Methoden definiert in ortho-Stellung zur phenolischen OH-Gruppe iodiert werden. Da diese Produkte aber im Organismus einer enzymatischen Deiodierung unterliegen können, sollten die zu stabileren Produkten führenden stannylsubstituierten Aromaten verwendet werden. Stannylaromaten können darüber hinaus mit höheren Ausbeuten iodiert werden als die analogen Silylaromaten.^[468] Als RGD-Peptid sollte ein den Tricystein-Multimeren analoges Konstrukt aus Lysin-Verzweigungseinheiten, Hegas-*spacern* und *cyclo(-RGDfE-)*-Peptiden verwendet werden. Anstelle eines Ankers sollte der Stannylaromat zur Radioiodierung eingebaut werden. Stannylaromaten sind jedoch nur mäßig stabil und können nicht entsprechend der „alles-am-Harz-Strategie“ von Anfang an im Multimer enthalten sein. Aufgrund der schlechten Ergebnisse bei der Kupplung von Tritylcysteamin an das RGD-Multimer sollte hier der Aromat nicht über eine Peptidkupplung, sondern durch Oximligation eingeführt werden. Die Oximbildung aus einer Aminooxy-Komponente und einem Aldehyd oder Methylketon erfolgt unter schwach sauren Bedingungen ohne Kupplungsreagenz und verläuft chemoselektiv. Sie kann mit vollentschützten, HPLC-gereinigten Peptiden durchgeführt werden und man benötigt idealerweise keine abschließende HPLC-Trennung des Ligationsprodukts. Die Oximligation hat ihre Effizienz, Selektivität und vielseitige Verwendbarkeit bei der Synthese von verschiedenen, auch radioaktiv markierten Proteinkonjugaten,^[469, 470]

TASP(*template assembled synthetic protein*)-Konstrukten,^[471, 472] cyclischen Peptiden,^[473] Glycopeptiden^[474] und von DNA- und RNA-Konjugaten^[475, 476] unter Beweis gestellt. Vor kurzem wurde von *Boturyn et al.* über eine Oximligation von monomerem Aminoxyessigsäure-funktionalisierten *cyclo(-RGDfK-)* mit RNA berichtet.^[477]

6.10.3 Synthese

Der Stannylaromat **69** wurde in einer Stille-artigen Reaktion aus *p*-Iodbenzaldehyd (**68**) und Hexamethyldizinn mit Tetrakis(triphenylphosphin)palladium(0) als Katalysator analog zu Lit.^[470] in einem einzigen Schritt synthetisiert (Abb 74). Die Bedingungen der Stille-Kupplungen sind dabei so mild, dass die reaktive Aldehydgruppe toleriert wird.

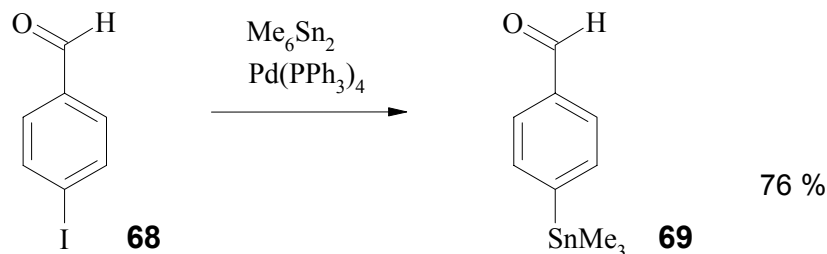


Abb. 74: Einstufige Synthese von *p*-Trimethylstannylbenzaldehyd (**69**).

Die Reaktion verläuft in guter Ausbeute. Der Aldehyd **69** fällt nach Chromatographie als farbloses Öl an, welches bei -18 °C gelagert werden kann. Das Produkt kann durch die typische Isotopenverteilung (¹¹⁶Sn 14.5 %, ¹¹⁷Sn 7.7 %, ¹¹⁸Sn 24.2 %, ¹¹⁹Sn 8.6 %, ¹²⁰Sn 32.6 %, ¹¹⁶Sn 14.5 %) mittels ESI-MS sowie durch Kopplungen mit ¹¹⁷Sn und ¹¹⁹Sn im ¹H- und ¹³C- NMR leicht identifiziert werden.

Die Aminoxy-Peptide wurden analog zu den Tricystein-Peptiden am TCP-Harz synthetisiert (Kap. 6.9). Zur Harzbelegung wurde Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH (**70**) (Dpr: L-Diaminopropionsäure; Aoa: Aminoxyessigsäure) verwendet. Diese Aminosäure trägt analog zu den weiter vorne beschriebenen Anker-molekülen die gewünschte Funktionalität bereits in der Seitenkette. (Abb. 75)

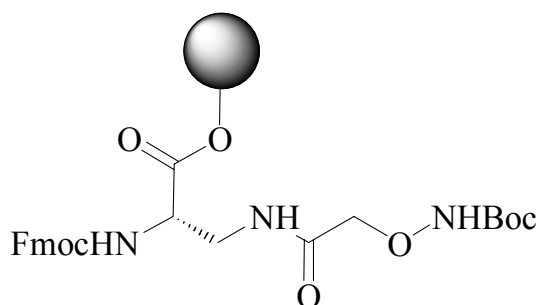


Abb. 75: *Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH (70), immobilisiert am TCP-Harz.*

Die Aminosäure **70** wurde von *F. Wahl* und *M. Mutter* in die Peptidsynthese eingeführt^[473] und ist mittlerweile kommerziell erhältlich.

Die fertigsynthetisierten Aminoxy-RGD-Peptide wurden mit AcOH/DCM/TFE unter Erhalt der Schutzgruppen vom TCP-Harz abgespalten und unter sorgfältigem Ausschluss von Aceton (Nebenprodukt im ESI-MS M+40) mit 95 % TFA entschützt und HPLC-gereinigt.

Die Oximligation wurde mit einem dreifachen Überschuss von **68** bzw. **69** in 90 % Acetonitril bei pH 3-4 (ca. 0.01 % TFA) durchgeführt. Die Umsetzung war quantitativ. Der überschüssige Aldehyd konnte durch Etherfällung vollkommen aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden (Abb. 76). RGD-Peptide ohne Aminoxy-gruppe zeigten mit Aldehyden keine Reaktion.

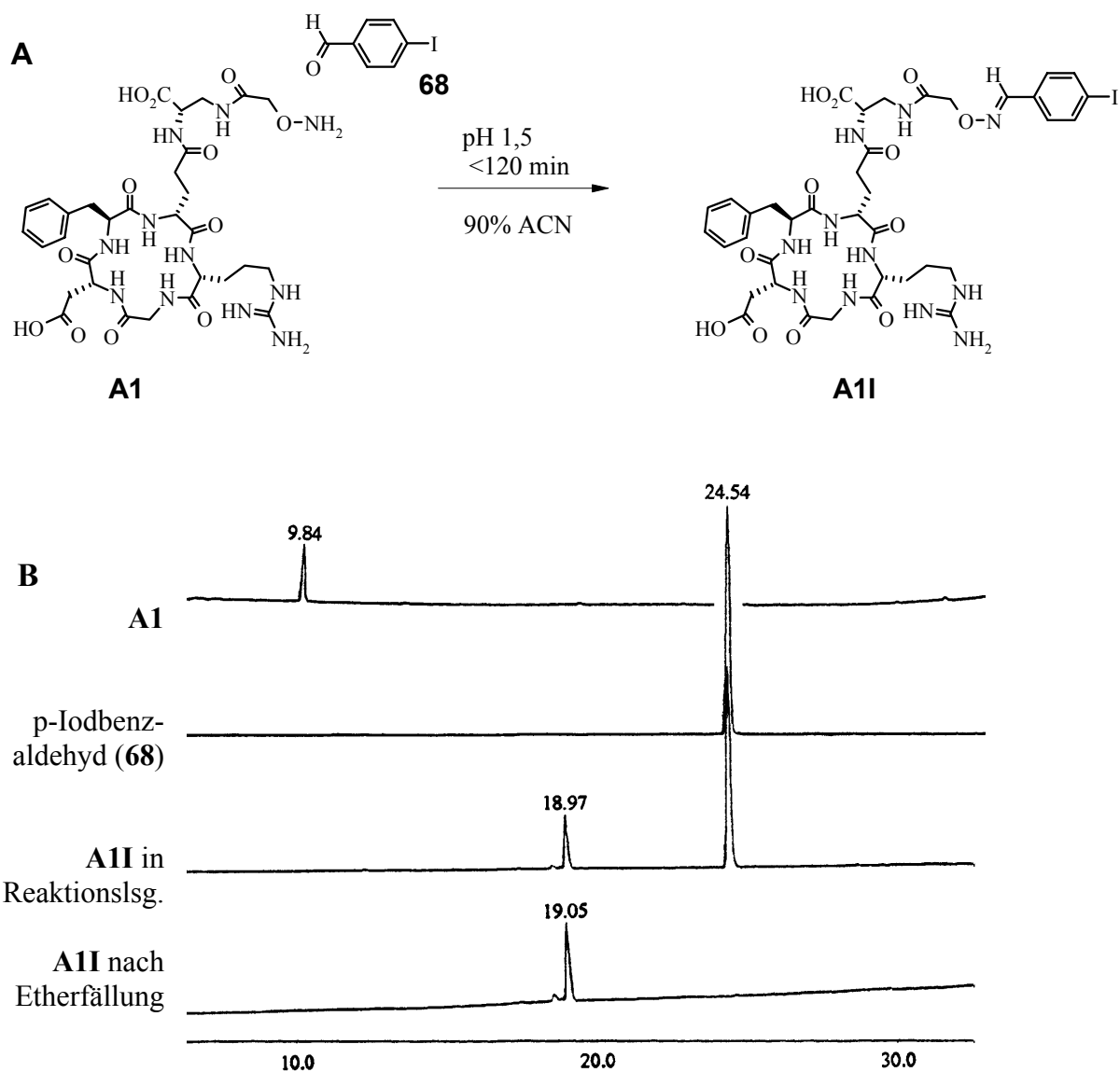


Abb. 76: **A** chemoselektive Reaktion des Aminoxypeptids **A1** mit *p*-Iodobenzaldehyd (**68**) zum cyclo(-RGDfE)-Dpr[Hya(O-*p*-Iodobenzaldehydoxim)] (**A1I**). **B** Der Aldehyd lässt sich laut HPLC-Analyse^a durch Etherfällung vollständig aus dem Reaktionsgemisch entfernen. Hya = Hydroxyacetyl.

^aGradient 5-80 % Acetonitril, 0.1% TFA, 30 min, siehe Kap. 8.1.

Im Fall der Trimethylstannylverbindung **69** zeigte sich besonders nach mehreren Stunden in der Reaktionslösung gemäß analytischer HPLC ein Nebenprodukt. Es konnte durch HPLC-MS als Destannylierungsprodukt identifiziert werden. Die Bildung des Nebenproduktes ließ sich durch rasches Arbeiten minimieren (ca 10 %), aber nicht vermeiden. Möglicherweise sind die in der Literatur beschriebenen Tri-*n*-butylstannyl-

Derivate in wässrigen sauren Lösungen stabiler.^[468] Für die Radiomarkierung störte das Nebenprodukt nicht, da das radioaktive Iod in großem *Unterschuss* zur Stannylkomponente eingesetzt wird und die radiomarkierte Verbindung nochmals HPLC-gereinigt wird.

Insgesamt wurden folgende Aminoxy-Verbindungen synthetisiert:

- Monomere **A1** *cyclo(-RGDfE-)-Dpr(Aoa)*
A2 *cyclo(-RGDfE-)-Ahx-Dpr(Aoa)*
A3 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-Dpr(Aoa)*
A4 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-Dpr(Aoa)*
- Dimere **A5** *[cyclo(-RGDfE-)-Ahx]₂-K-Dpr(Aoa)^a*
A6 *[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]₂-K-Dpr(Aoa)^a*
- Tetramere **A7** *{[cyclo(-RGDfE-)-Ahx]₂K}₂-K-Dpr(Aoa)^a*
A8 *{[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]₂K}₂-K-Dpr(Aoa)^a*

^aDie Synthese, Konjugation und Charakterisierung dieser Analoga wurde von Georgette Thumshirn durchgeführt.^[478]

Von den Verbindungen **A1-A8** wurden die Konjugationsprodukte mit p-Iodbenzaldehyd **A1I-A8I** und mit p-Trimethylstannylbenzaldehyd **A1S-A8S** hergestellt.

6.10.4 Evaluierung

Die Konjugationsprodukte mit p-¹²⁷Iodbenzaldehyd wurden zunächst als nichtradioaktive Referenzen für die korrespondierenden ¹²³I-, ¹²⁵I- oder ¹³¹I-markierten Verbindungen im Rezeptorassay auf ihre Affinität gegenüber dem αvβ3-Integrin untersucht (Tab. 10).

Tabelle 10: Inhibierungsverhalten der *p*-Iodbenzaldehyd-Konjugate **A11-A8I** im Rezeptorassay.

Nr.	Peptid	IC ₅₀ [nM] αvβ3 (Vn)
A11	<i>c</i> (-RGDfE-)-Dpr[Hya ^a (O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)]	10
A21	<i>c</i> (-RGDfE-)-Ahx-Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)]	10
A31	<i>c</i> (-RGDfE-)-Hegas-Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)]	20
A41	<i>c</i> (-RGDfE-)-Hegas ₂ -Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)]	7
A51	[<i>c</i> (-RGDfE-)-Ahx] ₂ -K-Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)] ^b	0.9
A61	[<i>c</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K-Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)] ^b	3
A71	{[<i>c</i> (-RGDfE-)-Ahx] ₂ -K} ₂ -K-Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)] ^b	5
A81	{[<i>c</i> (-RGDfE-)-Hegas] ₂ -K} ₂ -K-Dpr[Hya(O- <i>p</i> -Iodbenzaldehydoxim)] ^b	0.2

^aHydroxyacetyl, ^bvon Georgette Thumshirn synthetisiert

Es lässt sich erkennen, dass durch die Konjugation die Affinität nicht beeinträchtigt wird. Der Trend zu den um ca. eine Größenordnung kleineren IC₅₀-Werten der verzweigten Derivate entspricht etwa den mit den multimeren RGD-Peptiden **M1-M10** erhaltenen Resultaten.

Die Radiomarkierung der Stannylverbindungen mit ¹²⁵I (*R. Haubner*) sowie die anschließende Bestimmung der Biodistribution, der Pharmakokinetik und die Untersuchung der *in-vivo* Stabilität der Konjugate (*T. Poethko*) wurden in der Arbeitsgruppe Radiochemie/Radiopharmazeutische Chemie (*H.-J. Wester*) der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik der TUM (*Prof. Schwaiger*) durchgeführt. Für die *in vivo*-Untersuchungen wurden tumortragende Nacktmäuse (M21- und M21L-Melanome) verwendet. Während die Zelllinie M21 den αvβ3-Integrinrezeptor stark exprimiert,^[455, 479] dient das M21-L Tumormodell aufgrund seiner schwachen αvβ3-Expression als Negativkontrolle.^[479]

Das Monomer **A3S** und das Tetramer **A8S** wurden nach der Iodogen®-Methode mit ¹²⁵I markiert und die Biodistribution der daraus resultierenden Verbindungen **A3¹²⁵I** und **A8¹²⁵I** wurde untersucht.

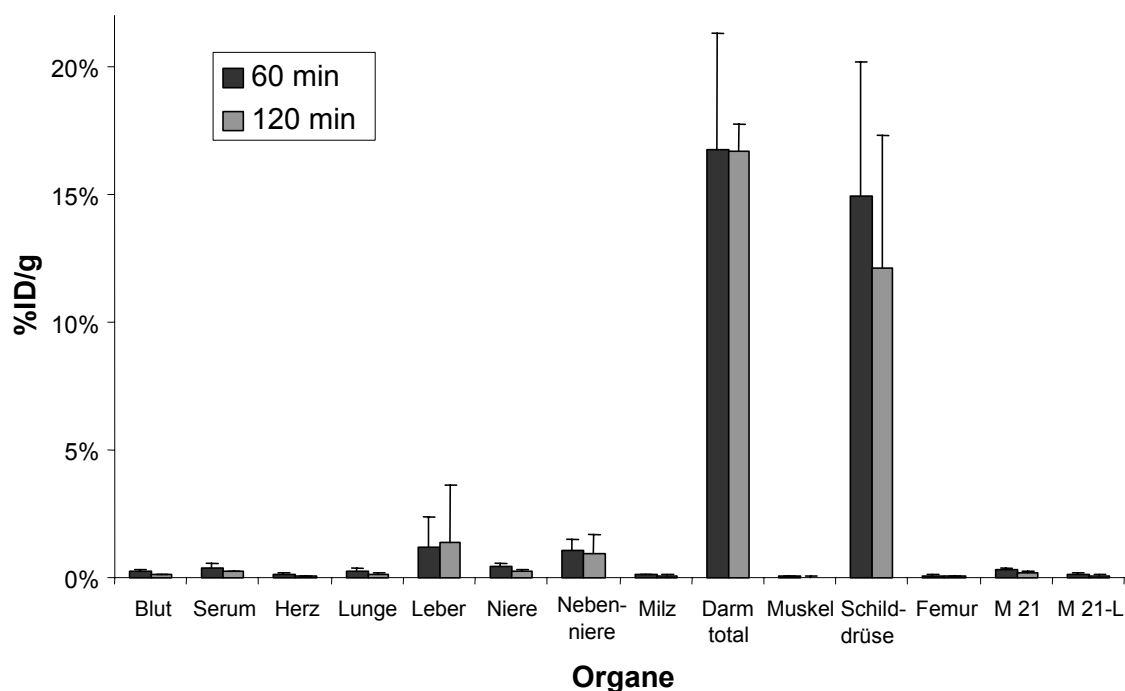


Abb. 77: Biodistribution des Monomers $A3^{125}I$ in der Nacktmaus.

1 h und 2 h nach Applikation von $A3^{125}I$ findet eine Aktivitätsanreicherung hauptsächlich in der Schilddrüse (SD), dem Darm und der Leber statt. Die Anreicherung von Radioiodid in der Schilddrüse ist typisch für *in vivo* instabile Iod-Verbindungen, da entstehendes Radioiodid rasch von der Schilddrüse aufgenommen wird (vgl. Schilddrüsentherapie). Die Deiodierungsrate *in vivo* ist aber aufgrund der Gesamtaktivitätsaufnahme in der Schilddrüse von 3 % ID (Schilddrüse = 0.002 g) als vergleichsweise gering zu bewerten. Der hohe Wert für die Leber deutet auf eine hepatobiliäre Aufnahme und Ausscheidung hin. Die Anreicherung im Tumor ist vergleichsweise gering. Dies zusammen mit einer nicht übermäßig raschen Gesamtkörperausscheidung spiegelt sich in z. T. geringen Tumor/Organ-Verhältnissen wider. Während nach 1 h ein Tumor/Blut-Verhältnis von lediglich 1.4 ± 0.6 beobachtet wurde erreichen die Tumor/Organ-Verhältnisse von Herz (2.7 ± 1.4), Milz (2.8 ± 1.2), Muskel (5.2 ± 2.0), Femur (3.4 ± 1.3) und M21-L (2.3 ± 0.9) höhere Werte (Abb. 78).

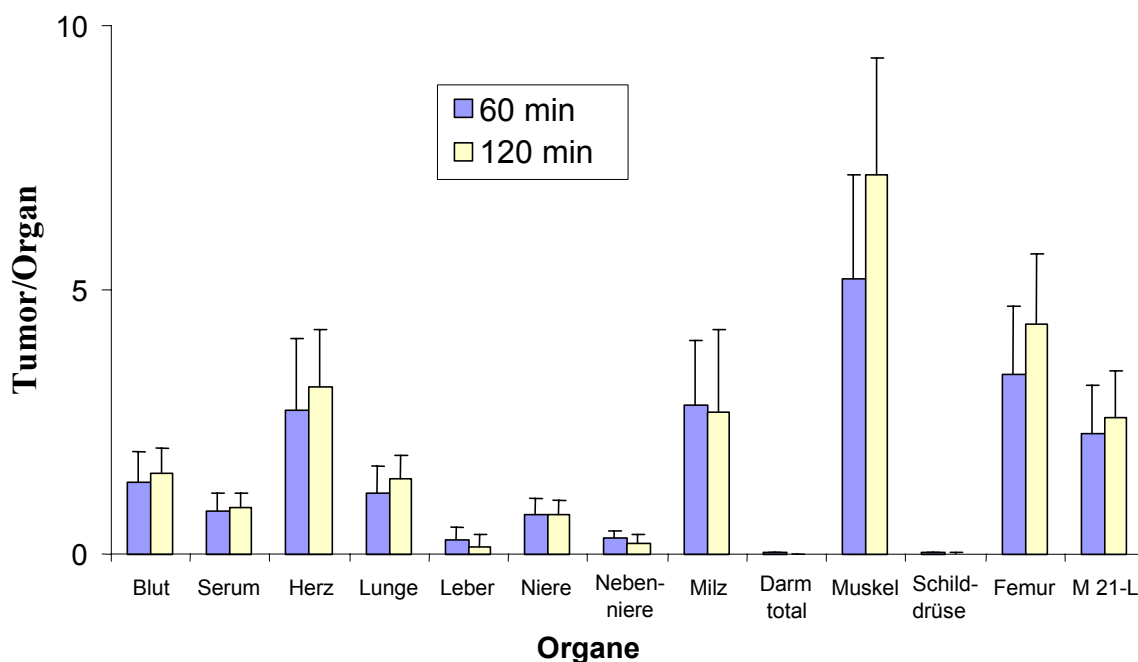


Abb. 78: Tumor/Organverhältnisse von $A3^{125}I$ in der Nacktmaus.

Insgesamt sind die Werte für $A3^{125}I$ bezügl. Anreicherung und Biodistribution zwar besser als die in einem Adenoma-Karzinom für *cyclo(-RGD[3- ^{18}F]f[NMe]V-)* von *Ogawa et al.* publizierten Ergebnisse,^[462] aber schlechter als die von *Haubner et al.* publizierten Werte für *cyclo(-RGD[3- ^{125}I]yV-)* und *cyclo(-RGDf[3- ^{125}I]Y-)*.^[455] Eine verbesserte renale Exkretion konnte durch den in $A3^{125}I$ enthaltenen hydrophilen PEG-Spacer nicht erreicht werden.

Durch *in vivo*-Studien zur Bestimmung der Metabolisierung konnte gezeigt werden, dass $A3^{125}I$ und damit die Oximbindung im Organismus im untersuchten Zeitrahmen (2 h) metabolisch stabil ist.

Das Tetramer $A8^{125}I$ weist gegenüber dem Monomer eine ca. fünffach höhere Tumoranreicherung auf. Die Aufnahme in den Darm und die Leber ist vergleichsweise gering. Der relativ hohe Wert für die Niere ist unter dem Aspekt der renalen Exkretion mehr als temporäre Anreicherung denn als echte Akkumulation zu betrachten (Abb 79 und 80).

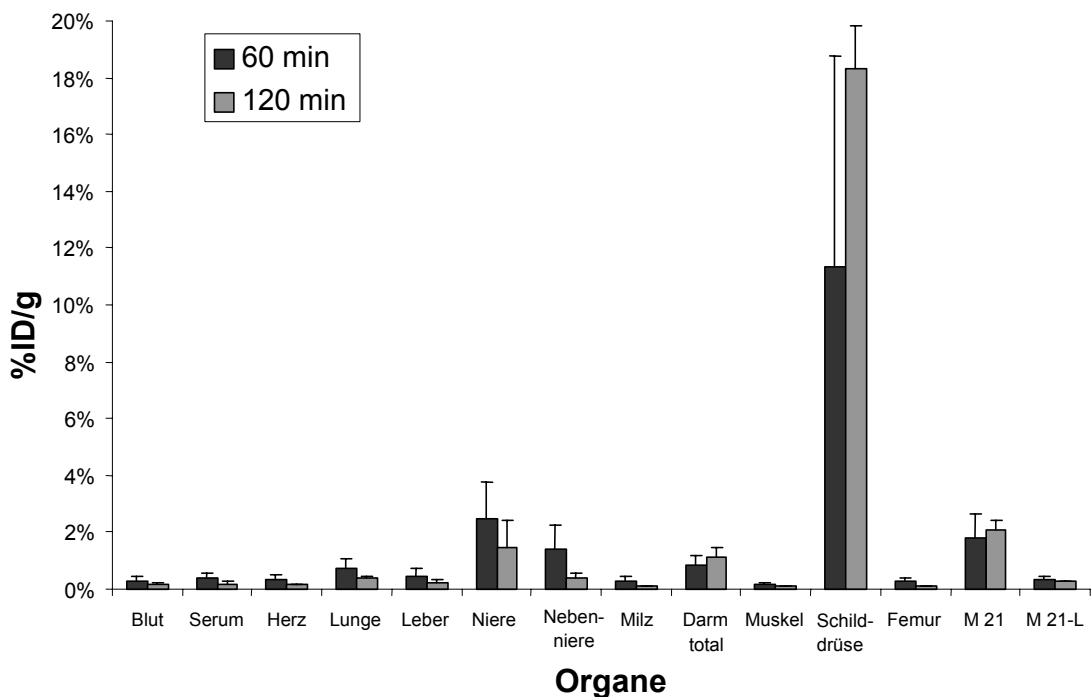


Abb. 79: Biodistribution des Tetramers $A8^{125}I$ in der Nacktmaus.

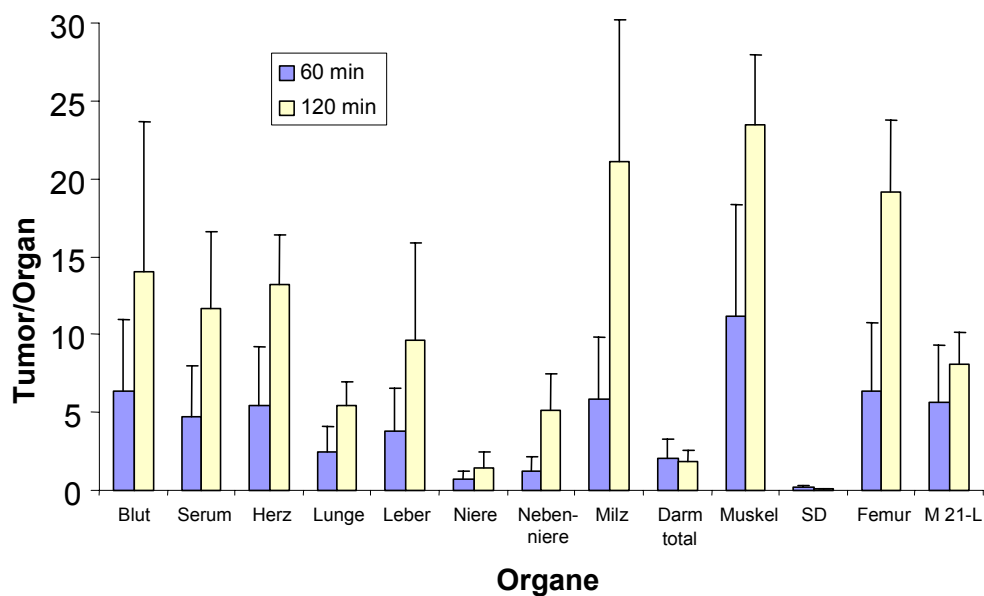


Abb. 80: Tumor/Organverhältnisse von $A8^{125}I$ in der Nacktmaus.

Unter der Berücksichtigung der Faustregel, dass Tumor/Organ-Verhältnisse >3 eine *in vivo* Detektion von Tumoren mit bildgebenden Verfahren ermöglichen, kann aufgrund der vorliegenden Tumor/Organ-Verhältnisse bei 120 min auf eine kontrastierende Darstellung mittels SPECT (^{123}I) oder PET (^{124}I) geschlossen werden (Abb. 80). Der potenzielle Einsatz von **A8¹²⁵I** für die Bildgebung erscheint ebenso vor dem Hintergrund eines Biodistributionsvergleichs mit einem vor kurzem publizierten RGD-Dimer $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-E-[*cyclo*(-RGDfK-)]₂ (**71**) (Abb. 81) in einem Ovarialkarzinom vielversprechend.^[350] Zusammen mit dem in Anreicherung und Biodistribution in etwa vergleichbaren glycosylierten RGD (2- ^{18}F -)Propionyl-SAA-*cyclo*(-RGDfK-) (**72**) (Abb. 81) stellt Verbindung **A8¹²⁵I** momentan die beste bekannte Substanz auf der Basis von RGD-Peptiden für bildgebende Verfahren dar.

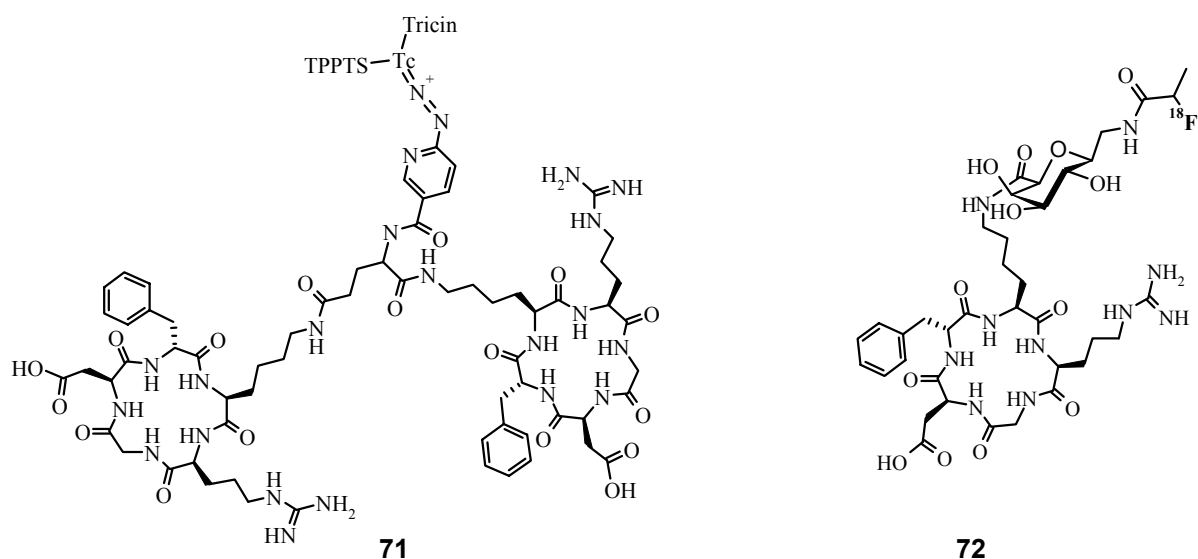


Abb. 81: RGD-Dimer **71** von Janssen et al.,^[350] glycosyliertes *cyclo*(-RGDfK-)-Derivat **72** von Haubner et al.^[45]

TPPTS: Trinatrium-Triphenylphosphin-3-3'-3''-Trisulfonat; Tricin: *N*-tris-(hydroxymethyl)-methylglycin.

Ob die verbesserte Tumoranreicherung des Tetramers **A8I** auf einer polyvalenten Anbindung an die Zielzelle (Abb. 24 A), auf kinetischen Effekten der Anbindung (Abb. 24 Fall Z2), auf eine veränderten Endocytose des RGD-Tetramers^[344, 445, 480] oder auf einem durch das PEG-reiche Gerüst veränderten pharmakokinetischen Profil

beruht,^[427] konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht beantwortet werden. Hierzu wird momentan von *G. Thumshirn* ein tetrameres Referenzpeptid synthetisiert, welches drei *cyclo(-RADfE-)* und ein *cyclo(-RGDfE-)* enthält. *In vitro-* und *in vivo-* Studien mit dieser Verbindung werden zu den oben genannten Fragen schlüssige Antworten liefern.

Auf der Basis der Oximligation wurde inzwischen von *T. Poethko et al.* ein neues, effizientes Verfahren zur Markierung der Aminoxy-RGD-Peptide mit ¹⁸F-Aldehyden entwickelt und zur Patentierung angemeldet.^[481] ¹⁸F-markierte Aminoxy-RGD-Peptide **A1-A8** sowie weitere von *G. Thumshirn* synthetisierte Analoga werden derzeit in einer umfangreichen Studie im oben beschriebenen Tumormodell getestet.

Die Oximligation der Verbindungen **A1-A8** ist nicht auf eine Anwendung als Tumor-tracer beschränkt. Denkbar ist jede mögliche Konjugation mit aldehyd- und keto-derivatisierten Molekülen oder Oberflächen. Die Funktionalisierung dieser RGD-Multimeren mit Farbstoffmolekülen wird von *G. Thumshirn* und die Funktionalisierung von Polyoxazolinen mit diesen RGD-Peptiden wird von *S. Cesana* (Arbeitsgruppe *Dr. R. Jordan*, TU München) bearbeitet.

6.11 RGD-Heterodimere

Neben dem RGD-Peptid sind viele weitere Adhäsionspeptide (und -glycoside) beschrieben.^[57] Diese können Liganden für Integrine, aber auch andere Zelladhäsionsrezeptoren sein. Von einigen dieser Liganden ist bekannt, dass sie analog zu RGD-Peptiden die Adhäsion von Zellen an künstlichen Materialien stimulieren können. Der Vorteil dieser anderen Liganden liegt darin, dass sie in einigen Fällen selektiv die Adhäsion einer bestimmten Zelllinie stimulieren^[270] oder auch die Zelladhäsion und Proliferation von bestimmten Zellen wie z. B. Nervenzellen erst ermöglichen.^[482] Für einen Überblick zu dieser Thematik sei auf eine im Rahmen dieser Arbeit verfasste Publikation hingewiesen.^[57] In einigen Fällen wurde von RGD-vermittelter Zelladhäsion berichtet, die durch die zusätzliche Verwendung weiterer Zelladhäsionssequenzen quantitativ (Zellzahl, Zellspreitung)^[180, 483, 484] und qualitativ

(Ausbilden von FAs)^[317, 485] gesteigert werden konnte. Die Rolle der Zelloberflächen-Proteoglykane, insbesondere der Syndecane, ihre Beteiligung an der Bildung von FAs und der Adhäsions-induzierten Signaltransduktion, wurden in jüngerer Zeit verstärkt untersucht.^[131, 152, 317, 485, 486]

Tabelle 11: Weitere Zelladhäsionssequenzen, die potenziell die Adhäsion von Osteoblasten stimulieren.

Sequenz	Ursprung	Rezeptor	Verwendung
YIGSR	Laminin, B1-Kette ^[487]	67-kD Laminin-Rezeptor ^[487, 488] in Knochenzellen ^[489] und Chondrocyten ^[490]	Adhäsion von Fibroblasten ^[491, 492] und Neuronen ^[304]
FHRRKA	BSP ^[180]	Zelloberflächen-Proteoglykan ^[180]	Adhäsion von Osteoblasten ^[180, 181, 444]
(WQ)PPRARI	Fibronectin ^[317, 493]	Zelloberflächen-Proteoglykan, ^[317] $\alpha 4\beta 1$ -Integrin ^[493]	Adhäsion von Fibroblasten ^[71]
GFOGER	Collagen I ^[494, 495]	$\alpha 1\beta 1$ - und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin ^[494, 495]	
IKVAV	Laminin, A-Kette ^[496]	110 kD-Rezeptor ^[497]	Adhäsion von Chondrocyten ^[490] und Nervenzellen ^[496]
HAVDI	(N)-Cadherin ^[498, 499]	(N)-Cadherin	Adhäsion von Nervenzellen, ^[498, 499] Proliferation von Osteoblasten ^[500] und Osteoclasten ^[501]
GRGDSP	Fibronectin ^[49]	$\alpha 5\beta 1$ -Integrin	Adhäsion vieler Zelltypen, u.a. Osteoblasten ^[57]
RKKRRQRRR	HIV Tat Protein ^[71]	$\alpha v\beta 5$ -Integrin ^[71]	Adhäsion von Muskelzellen, ^[71] Transfektion ^[502]
KQAGDV	Fibrinogen, γ -Kette ^[307]	$\alpha 5\beta 1$ - ^[307] und $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin ^[503]	Adhäsion, Migration und Proliferation von SMCs ^[504]
KRSR	Konsensussequenz Proteoglykan-binder Proteine ^[505]	Zelloberflächen-Proteoglykane ^[117, 505]	Adhäsion von Osteoblasten ^[506-508]
VGVPAG	Elastin ^[509]	67-kD Laminin-Rezeptor ^[509]	Adhäsion und Migration von SMCs ^[504]
PRRARV	Fibronectin ^[510]	Zelloberflächen-Proteoglykane ^[510]	Adhäsion von Macrophagen ^[510]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, durch die Verwendung einer zusätzlichen Zelladhäsionssequenz die RGD-stimulierte Adhäsion von Osteoblasten zu verstärken. Diese weiteren Zelladhäsionssequenzen waren entweder als Liganden für Zelloberflächenrezeptoren der Osteoblasten beschrieben oder wurden bereits zur Adhäsion von Osteoblasten verwendet (Tabelle 11)

Diese zwölf weiteren Adhäsionssequenzen wurden jeweils zusammen mit einem RGD-Cyclopeptid in einem Molekül als sog. Heterodimere konzipiert. Dadurch besteht die Möglichkeit, verschiedene Zelladhäsionsrezeptoren benachbart zu binden, was der natürlichen Situation in FAs entspricht. Die Dimensionen der verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren sind zum größten Teil nicht bekannt und die *spacer* (Hegas) der heterodimeren Verbindungen sind möglicherweise zu kurz für eine simultane Bindung der Zelloberflächenrezeptoren. Die Bindung der Liganden an die Rezeptoren ist jedoch nicht starr, sondern stellt ein Gleichgewicht zwischen Anbindung und Abdissoziation dar. Somit wäre zumindest eine zeitnahe abwechselnde Anbindung benachbarter Rezeptoren denkbar.

Heterodimere Verbindungen können analog zu den Homodimeren mit verzweigten Aminosäuren, aber mit orthogonalen Schutzgruppen in der Verzweigungseinheit hergestellt werden. Hier wurden sie einfach als lineare Peptide an der Festphase mit N-terminalem Cyclopeptid und C-terminaler weiterer Adhäsionssequenz synthetisiert. Die Ankergruppe – Thiol der Cysteinseitenkette – befindet sich in der Mitte des Peptidstrangs (Abb. 82). Gleichzeitig wurden Heterodimere ohne Ankergruppe synthetisiert. Von diesen Peptiden kann eine gleichzeitige oder sequenzielle Bindung an verschiedene Oberflächenrezeptoren erwartet werden,^[511] die sich z. B. in einer effektiveren Ablösung adhärer Tumorzellen von den entsprechenden Substraten zeigen sollte.

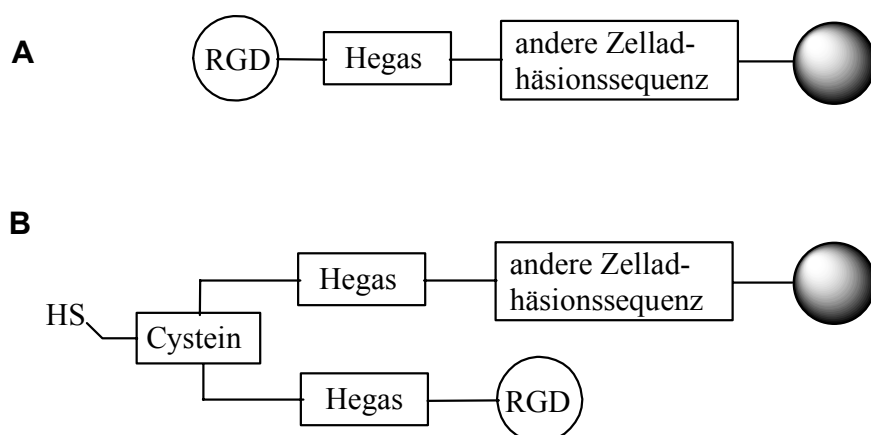


Abb. 82: Schematische Darstellung der am TCP-Harz aufgebauten heterodimeren Zelladhäsionspeptide. **A** ohne Ankergruppe **B** mit Thiolanker.

6.11.1 Synthese

Die zwölf weiteren Adhäsionssequenzen wurden am TCP-Harz unter Standardbedingungen (TBTU/HOBt/DIPEA) aufgebaut. Für die Synthese der Heterodimeren mit Anker **H1-H12** wurde daran Fmoc-Hegas-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH und nochmals Fmoc-Hegas-OH (jeweils TBTU/HOBt/Collidin) gekuppelt. Die Fragmentkupplung mit 1.5 eq teilgeschütztem Cyclopeptid **Z3*** erfolgte mit PyBOP/HOBt/Collidin. Für die Synthese der löslichen Heterodimeren ohne Anker **HL1-HL12** wurde das Cyclopeptid direkt nach der ersten Hegas-Aminosäure angekuppelt. Die Peptide wurden mit 95 % TFA und TIPS vom Harz abgespalten und entschützt und nach Etherfällung HPLC-gereinigt. Die Verbindungen **H1-H12** wurden in 21-38 % (**H7**: 4 %) Ausbeute und die Verbindungen **HL1-HL12** in 22-50 % (**HL7**: 6 %) Ausbeute erhalten. Die Ursache für die geringe Ausbeute von **H7** und **HL7** ist unklar, da die gravimetrisch bestimmte Harzbelegung vergleichbar mit denen der anderen Sequenzen war und kein signifikantes Nebenprodukt auftrat.

H1 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-YIGSR-OH*

H2 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-FHRRIKA-OH*

H3 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-PPRARI-OH*

H4 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-GFOGER-OH*
H5 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-IKVAV-OH*
H6 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-HAVDI-OH*
H7 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-GRGDSP-OH*
H8 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-RKKRRQRRR-OH*
H9 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-KQAGDV-OH*
H10 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-KRSK-OH*
H11 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-VGVAPG-OH*
H12 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-PRRARV-OH*

HL1 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-YIGSR-OH*
HL2 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-FHRRIKA-OH*
HL3 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-PPRARI-OH*
HL4 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-GFOGER-OH*
HL5 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-IKVAV-OH*
HL6 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-HAVDI-OH*
HL7 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-GRGDSP-OH*
HL8 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-RKKRRQRRR-OH*
HL9 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-KQAGDV-OH*
HL10 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-KRSK-OH*
HL11 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-VGVAPG-OH*
HL12 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-PRRARV-OH*

6.11.2 Evaluierung

Die heterodimeren RGD-Peptide mit Thiol-Anker wurden auf BSA immobilisiert. Die ELISA-Untersuchungen^[2] der BSA-Oberflächen weisen erwartungsgemäß für alle Peptide sehr ähnliche Werte auf (Abb. 83). Die aus dem Trend herausstehenden Werte für **H8** sind wahrscheinlich eher auf Unregelmäßigkeiten im Assay als auf die Reaktion des Antikörpers mit der basische Sequenz von **H8** zurückzuführen. Die maximale im ELISA detektierbare Belegung scheint bei 10 µM bereits erreicht zu sein.

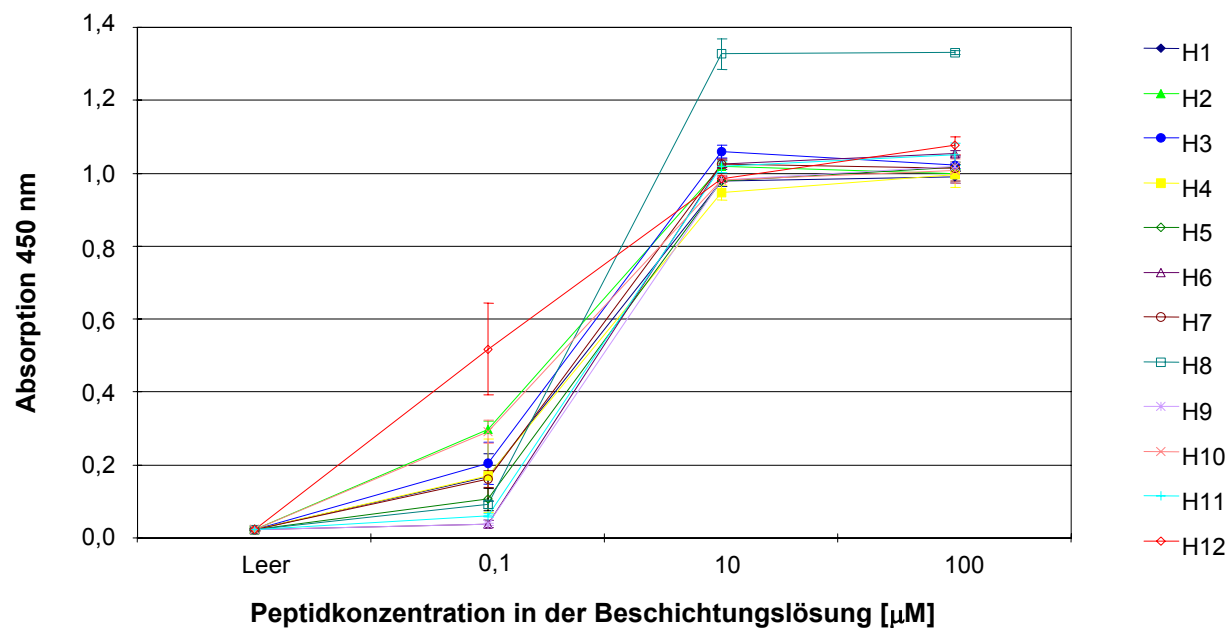


Abb. 83: ELISA von mit **H1-H12** funktionalisierten BSA-Oberflächen.

Die Werte für die Osteoblastenadhäsion ähneln den Ergebnissen des ELISA. Bei einer Peptidkonzentration von 10 µM wird die in diesem System maximale Zelladhäsionsrate erreicht (Abb. 84).

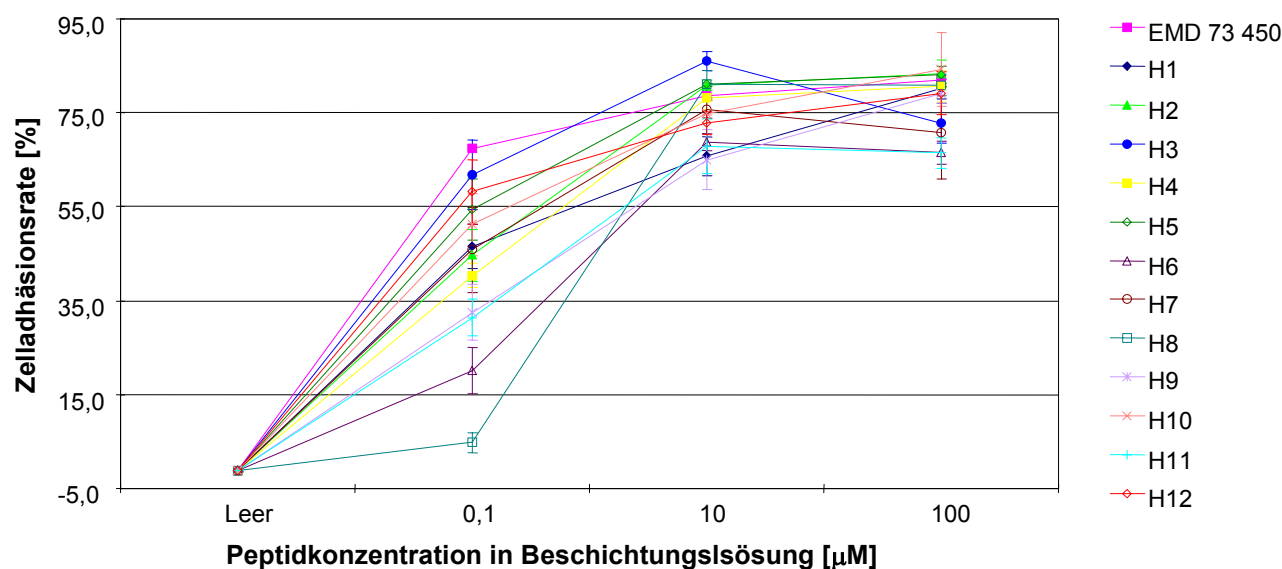


Abb. 84: Adhäsion von MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten an mit **H1-H12** und **EMD 73 450** beschichtete BSA-Oberflächen.

Zwischen den einzelnen Peptiden und dem Kontrollpeptid **EMD 73 450** gibt es keine signifikanten Unterschiede. Bei einer Peptidkonzentration von 0.1 μM weichen die Werte der Zelladhäsionsraten für die einzelnen Peptide stark voneinander ab, liegen aber alle unter dem Werte des Kontrollpeptids **EMD 73 450**. Dem Kontrollpeptid am nächsten kommen die Peptide **H3**, **H5**, **H10** und **H12**. Zwei dieser Peptide (**H3** und **H12**) besitzen interessanterweise die sehr ähnlichen Fibronectin-Sequenzen PRRARV und PRRARI. Insgesamt lässt sich aber eine im Vergleich zum Kontrollpeptid verstärkte Zelladhäsion nicht feststellen. Möglicherweise ist die Wirkung der anderen Zelladhäsionspeptide schwächer als die des hochaffinen RGD-Cyclopeptids. Für grundlegende Studien zur stimulierten Zelladhäsion mittels dieser anderen Peptide müssten diese wahrscheinlich isoliert ohne den Einfluss des RGD-Peptids getestet werden.

Die löslichen Verbindungen **HL1-12** wurden von *U. Reuning* (Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar, München) im Zelladhäsionsassay getestet: Zunächst werden 96-*well-plates* mit verschiedenen ECM-Molekülen beschichtet (Fibronectin, Collagen I, Laminin, Vitronectin). Dazu werden Ovarialkarzinomzellen (OVMZ-6) zusammen mit den Peptiden gegeben. Die Zahl der nach 2 h adhärenierten Zellen wird kolorimetrisch bestimmt.

Im Vergleich zur Negativkontrolle *cyclo(-RADfV-)* (**73**) ist in allen Fällen die Adhäsion an Vitronectin (deutlich) und an Collagen I (weniger ausgeprägt) verringert. Im Wesentlichen weisen die Werte für die Hetrodimeren damit die selben Werte wie das Kontrollpeptid *cyclo(-RGDfV-)* **2** auf (Abb. 85).

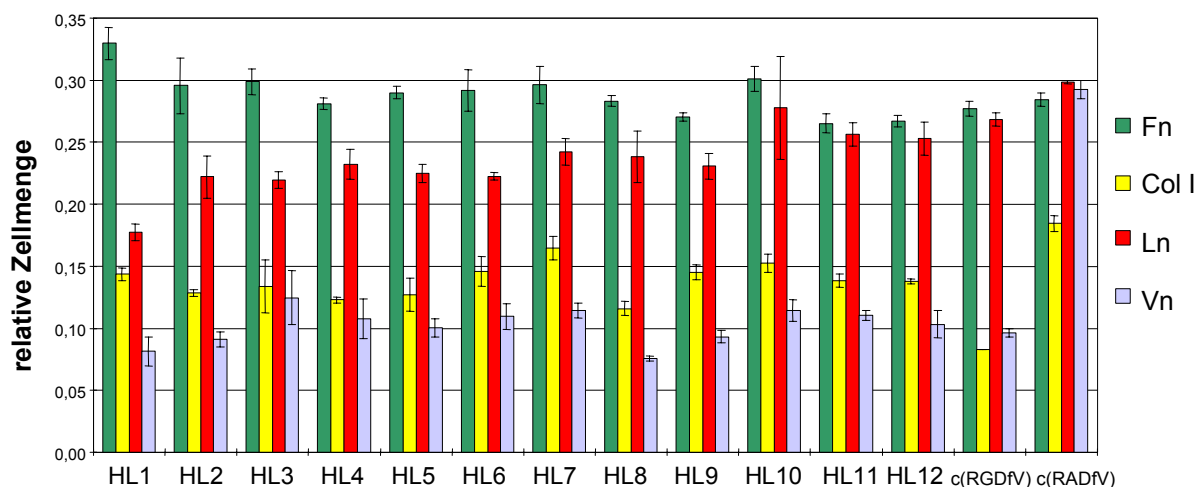


Abb. 85: Adhäsion von OVMZ-6 Ovarialkarzinomzellen an verschiedene ECM-Protein-Oberflächen nach Inkubation mit **HL1-HL12** bzw. mit den Kontrollpeptiden *cyclo(-RGDfV-)* (2) und *cyclo(-RADfV-)* (73).

Ähnlich wie bei **H1-H12** scheint die Aktivität der Heterodimeren vom RGD-Cyclopeptid dominiert zu sein. Für das Peptid **HL1** mit der Laminin-Sequenz kann man eine leicht verstärkte Zellablösung von Laminin erkennen, jedoch könnte dieser Effekt auch auf die Variabilität dieses assays zurückzuführen sein. Möglicherweise müsste, analog zu Zelladhäsion, zunächst die anderen Zelladhäsionspeptide isoliert und evtl. auch in höheren Konzentrationen testen (das RGD-Cyclopeptid ist eine optimierte superaktive Verbindung, während die anderen Sequenzen nichtoptimierte Primärsequenzen darstellen!).

6.12 SNS-Peptide

In Untersuchungen zur Stimulierung der Adhäsion von Chondrocyten auf Calciumphosphat mit RGD-Peptiden konnte die Effektivität des RGD-Phosphonatpeptids gezeigt werden.^[285] Die durch Wachstumsfaktoren induzierte Proliferation der Chondrocyten auf diesen Oberflächen wird durch die RGD-Beschichtung verstärkt, allerdings wird gleichzeitig die Migration der Chondrocyten angeregt, sodass diese an

den Rand des Calciumphosphat-Träger wandern bzw. diesen verlassen. *Pasco et al.* berichten von einem 20er Peptid aus Collagen IV, das die Adhäsion von HAT-144-Melanomzellen über die β_3 -Untereinheit des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins vermittelt und die Migration von Leukocyten verlangsamen kann.^[512, 513] Das Peptid lässt sich unter weitgehender Erhaltung der Aktivität zu einem 12er Peptid CNYYSNSYSFWL verkürzen; essenziell ist ein zentrales SNS-Motiv.^[514]

Um das SNS-Peptid im Zelladhäsionsassay auf BSA bei *Merck Biomaterial* zu testen, sollten SNS-Peptide synthetisiert werden, die an verschiedenen Stellen einen Thiolanker enthalten.

6.12.1 Synthese und Evaluierung

Das SNS-Peptid H-CNYYSNSYSFWL-OH **SNS1**, das mit dem Cystein bereits einen Thiolanker enthält wurde nach Fmoc-Strategie am TCP-Harz aufgebaut. Weiterhin wurden zwei Peptide synthetisiert, die zwischen Peptid und einem C- bzw. N-terminalen Thiolanker einen *spacer* besitzen: Das Peptid Mp-Hegas-AbuNYYSNSYSFWL-OH **SNS2** wurde analog **SNS1** aufgebaut, wobei jedoch das Cystein durch die alkyllanalogue 2-Aminobuttersäure ersetzt wurde. Die 3-Mercaptopropionsäure (Mp) wurde als S-Trityl-3-Mercaptopropionsäure eingeführt. Zur Synthese des Peptids AcAbuNYYSNSYSFWL-Hegas-C-OH **SNS3** wurde zunächst AcAbuNYYSNSYSFWL-OH nach Fmoc-Strategie am TCP-Harz aufgebaut und unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen vom Harz abgespalten. Das Fragment wurde mit HATU/HOAt/Collidin an am TCP-Harz synthetisiertes H-Hegas-Cys(Trt)-TCP gekuppelt (Synthese analog Kap. 6.4.1). Die Peptide wurden mit 95 % TFA und TIPS entschützt und HPLC-gereinigt: Das Peptid **SNS3** fiel als ein Gemisch zweier schwer trennbarer Isomeren an. Die Entstehung der Isomere ist wahrscheinlich auf die Racemisierung des Leucins bei der Fragmentkupplung zurückzuführen. Die SNS-Peptide wurden in Ausbeuten von 5-14 % erhalten.

SNS1 H-CNYYSNSYSFWL-OH

SNS2 Mp-Hegas-AbuNYYSNSYSFWL-OH

SNS3 AcAbuNYYSNSYSFWL-Hegas-C-OH

Die Peptide **SNS1-SNS3** wurden bei *Merck Biomaterial* auf BSA-Oberflächen immobilisiert und auf ihre Fähigkeit zur Stimulierung der Zelladhäsion untersucht. Gegenüber MC3T3 E1-Maus-Osteoblasten zeigten die SNS-Peptide keine Adhäsionsaktivität.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Entwicklung monomerer und multimerer RGD-Peptide für die Erzeugung zelladhäsiver Biomaterialien und zur Tumordiagnose. Als Integrin-Liganden wurden die in unserer Arbeitsgruppe entwickelten, für das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin selektiven und hochaffinen Cyclopentapeptide der Formel *cyclo(-RGDfX-)* (X = variable Aminosäure) verwendet.

Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin kann die Adhäsion von Knochenzellen vermitteln und ist somit ein interessantes *target* für die integrinvermittelte Zelladhäsion auf Biomaterialien. Über die Seitenkette der Aminosäure X können die RGD-Peptide auf verschiedenen Biomaterialien immobilisiert werden. So wurde z. B. das Peptid *cyclo(-RGDfK-)* **Z1** über die Aminofunktion der Lysinseitenkette mit dem bioabbaubaren Polymer Amino-PEG-co-PLA verknüpft. Die Adhäsion humaner Osteoblasten auf dem ansonsten anti-adhäsiven Material konnte so erfolgreich stimuliert werden (Arbeitsgruppe Prof. Göpferich, Universität Regensburg).

Komplexere, lineare und verzweigte multimere RGD-Peptide mit Ankergruppe wurden nach der Peptid-Festphasensynthese (Fmoc-Strategie) aufgebaut. Dazu wurden zunächst Synthesen entwickelt, wonach die festphasenkompatiblen Bausteine *cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]* **Z3***, die *spacer*-Aminosäure 20-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure **50** (Fmoc-Hegas-OH) und die Verzweigungseinheit Bis-(N,N'-Teoc)-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure **59** in hohen Ausbeuten und größeren Mengen hergestellt werden konnten.

Nach der Methode der Peptid-Festphasensynthese konnte eine Vielzahl monomerer RGD-Peptide mit verschiedenen Ankern und *spacern* durchgängig an der Festphase aufgebaut werden. So wurden z. B. RGD-Peptide mit Mono-Thiolanker synthetisiert, die für die RGD-Funktionalisierung von Polyoxazolinen (Arbeitsgruppe Dr. Jordan, TU München) und von Nano-Goldpunkten (Arbeitsgruppe Prof. Spatz, Universität Heidelberg) verwendet werden. Verschiedene RGD-Peptide mit Mono-Thiolanker wurden auf dem bioabbaubaren Polymer Amino-PEG-co-PLA immobilisiert, wodurch

hohe Adhäsionsraten von Osteoblasten erzielt werden konnten (Arbeitsgruppe *Prof. Göpferich*, Universität Regensburg).

Weiterhin wurden nach diesem Verfahren RGD-Peptide mit sauren Ankergruppen zur integrinvermittelten Zelladhäsion auf Calciumphosphatoberflächen synthetisiert. Mit dem optimierten Peptid *cyclo(-RGDfE-)-E@S@S* (@S = Phosphoserin) **P16** steht eine relativ kleine, einfach zu synthetisierende Verbindung zur Verfügung, die die Adhäsion von Maus-Osteoblasten auf einer Calciumphosphatoberfläche vergleichbar gut stimuliert wie ein bisher verwendetes, komplexeres RGD-Phosphonatpeptid (Testungen *Merck Biomaterial*).

Das Peptid mit Tricysteinanker *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CCC-OH* **S4** konnte, verglichen mit dem entsprechenden Peptid mit Monothiolanker, auf Titanoberflächen die Adhäsionsrate von Osteoblasten von 20 % auf 55 % steigern (*Merck Biomaterial*).

Mithilfe der Verzweigungseinheit **59** wurde ein Satz von mono-, di- und tetrameren RGD-Peptiden mit jeweils ein bis drei Hegas-*spacern* und ein Oktamer mit einem Hegas-*spacer* synthetisiert. Zumindest die Verbindungen mit drei Hegas-*spacern* sollten von den Abmessungen her theoretisch in der Lage sein, mehrere Integrine gleichzeitig polyvalent zu binden. Die verzweigten RGD-Peptide weisen im Integrinaffinitäts-*assay* am isolierten $\alpha\beta3$ -Rezeptor niedrigere IC_{50} -Werte als die entsprechenden monomeren Verbindungen auf. Der Grund dafür ist unklar. In der Inhibierung der Zelladhäsion als Testsystem zur polyvalenten Ligandenbindung konnte keine Wirkungsverstärkung durch die multimeren RGD-Peptide festgestellt werden (*Merck KGaA*). Möglicherweise wirkt der Verlust von Konformationenergie, besonders im *spacer*, einer gespreizten Molekülform und damit einer polyvalenten Anbindung entgegen.

Die teilgeschützten verzweigten RGD-Peptide wurden in einer Fragmentkupplung in Lösung mit einem Thiol-Ankermolekül verknüpft. Das Tetramer **M7C** konnte, immobilisiert auf PMMA, die Adhäsion von Chondrocyten effektiv stimulieren und Zelladhäsionsraten von ca. 100 % (Monomer: ca. 60 %) erzielen (*Merck Biomaterial*).

Wegen der schlechten Ausbeute der Fragmentkupplung wurde ein dem o. g. entsprechender Satz von verzweigten RGD-Peptiden mit Anker komplett an der Festphase aufgebaut. Aus synthetischen Gründen wurde als Verzweigungseinheit Bis-Fmoc-

Lysin verwendet, als Anker kam der für Titan optimierte Tricysteinanker zum Einsatz. In ersten Versuchen konnten mit dem Oktamer **T10** auf Titan Adhäsionsraten von Osteoblasten von 90 % (Monomer 55 %) erzielt werden (*Merck Biomaterial*). Eine polyvalente Integrinbindung des Oktamers ist aufgrund der *spacer*-Länge unwahrscheinlich, möglicherweise beruhen die höheren Adhäsionsraten dieser Verbindung auf einer lokal erhöhten Konzentration von RGD-Peptiden.

Das $\alpha\beta3$ -Integrin ist auf angiogenetischem Gewebe (aktivierte Endothelzellen und SMCs) hochexprimiert und somit ein vielversprechender Marker für tumorinduzierte Angiogenese. Zusammen mit *G. Thumshirn* wurden radiomarkierbare RGD-Peptide entwickelt. Es wurden mono- und multimere Peptide entsprechend den o. g. Peptiden an der Festphase synthetisiert, anstelle des Tricysteinankers wurde eine Gruppe mit Aminooxy-Funktion eingeführt. An die vollständig geschützten Peptide konnte über Oximligation *p*-Trimethylstannylbenzaldehyd **69** chemoselektiv an die Aminooxygruppe angebunden werden. Nach Radioiod-Destannylierung wurden Biodistributionsstudien in tumortragenden Nackmäusen durchgeführt (*Nuklearmedizin, Klinikum Rechts der Isar, München*). Das Tetramer **A8I** zeigt im Vergleich zur entsprechenden monomeren Verbindung **A4I** eine höhere Tumoranreicherung und verbessertes Exkretionsverhalten. Mit den monomeren und verzweigten Aminooxy-RGD-Peptiden stehen Verbindungen zur Verfügung, die mit beliebigen aldehyd- oder ketonfunktionalisierten Oberflächen chemoselektiv konjugiert werden können. Eine darauf beruhende Methode zur Konjugation mit *p*- ^{18}F -Benzaldehyd wurde zum Patent angemeldet.

In einem weiteren Projekte wurden heterodimere Peptide synthetisiert, die neben der RGD-Sequenz eine zweite Zelladhäsionssequenz enthalten. Diese Peptide zeigten in der Osteoblastenadhäsion (*Merck Biomaterial*) und in der inhibierten Adhäsion von Ovarialkarzinomzellen an verschiedene ECM-Proteine (*Frauenklinik, Klinikum Rechts der Isar, München*) keine über den Effekt des RGD-Peptids hinausgehende Wirkung. Möglicherweise müssen die weiteren Zelladhäsionspeptide (Primärsequenzen aus verschiedenen Zelladhäsionsproteinen) zunächst einzeln untersucht und optimiert werden.

8 Experimentaltteil

8.1 Allgemeine experimentelle Bedingungen

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert. N-Methylpyrrolidon (NMP) wurde von der Firma *BASF-AG* bezogen und ohne weitere Destillation eingesetzt. Falls erforderlich wurden wasserfreie Lösungsmittel von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* und *Merck* bezogen oder nach den gängigen Methoden absolutiert.

Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen *Aldrich*, *Fluka*, *Lancaster* und *Merck* bezogen und entsprachen mindestens der Qualität „zur Synthese“. Geschützte Aminosäuren und Kupplungsreagenzien stammten von der Firma *Advanced Chem-Tech*, *Alexis*, *Applied Biosystems*, *Bachem*, *Merck*, *MultiSynTech* und *NovaBiochem* und *PerSeptive Biosystems*. TCP-Harz wurde von der Firma *PepChem Tübingen* bezogen.

Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle und R_f -Wert-Bestimmungen erfolgten auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumplatten der Firma *Merck* mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen. Die Identifizierung der einzelnen Substanzflecke erfolgte anhand UV-Absorption bei 254 nm sowie durch Eintauchen der DC-Platten in 3 %ige ethanolische Ninhydrin-Lösung oder 5 %ige ethanolische Phosphomolybdänsäure mit Cer(IV)sulfat in Schwefelsäure/Wasser gefolgt von anschließender Wärmebehandlung.

Flashsäulenchromatographie wurde mit 30 - 100 fachem Überschuß an Kieselgel 60 (Korngröße 0.040 – 0.063 mm, 230 - 400 mesh ASTM) der Firma *Merck* durchgeführt. Teilweise wurden die Rohsubstanzen in Dichlormethan gelöst und auf Kieselgel 60 (Korngröße 0.063 – 0.200 mm, 20 - 230 mesh ASTM) der Firma *Merck* aufgezogen. Die Trennungen wurden bei 1.2 bar Überdruck durchgeführt.

Die **Festphasen-Peptidsynthese** wurde in Schüttelgefäßen aus Glas (Masse Harz > 1g) bzw. in 20 mL-, 10 mL- oder 5 mL-Kunststoffspritzen mit PP-Fritten der Firma *Vetter Laborbedarf* (Tübingen) durchgeführt. Die Kunststoffspritzen wurden zur Durchmischung der Harzsuspension mit ca 15 rpm rotiert.

Analytische und präparative HPLC wurde an folgenden Geräten und Säulen durchgeführt:

- (A) Gerät *Amersham Pharmacia Äkta Basic 10 F*, Pumpensystem P-900, Detektionssystem UV-900, Autosampler A 900.
Säulenmaterial: *Omincrom-YMC-ODS-A 120 5-C₁₈* (120 Å, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm), analytisch.
- (B) Gerät *Beckman*: System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, Detektormodul 166. Säulenmaterial: *Omincrom-YMC-ODS-A 120 5-C₁₈* (120 Å, 5 µm, 250 mm × 20 mm), semipräparativ.
- (C) Gerät *Amersham Pharmacia Äkta Basic 100 F*, Pumpensystem P-900, Detektionssystem UV-900.
Säulenmaterial: *Omincrom-YMC-ODS-A 120 10-C₁₈* (120 Å, 10 µm, 250 mm × 20 mm), semipräparativ.
- (D) Gerät *Waters*: Pumpensystem 1525, UV-Detektiossystem 2487
Säulenmaterial: *Omincrom-YMC-ODS-A 120 5-C₁₈* (120 Å, 5 µm, 250 mm × 20 mm), semipräparativ.

Die Detektion erfolgte jeweils bei 220 nm bzw. bei 220 nm und 254 nm. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0.1 % TFA) und ACN (HPLC-grade + 0.1 % TFA) im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile mit einer Gradientenlänge von 30 min verwendet. Im Falle der Anlage (C) wurden gerätebedingt Laufmittelgemische aus Wasser (+ 0.1 % TFA) und ACN / Wasser (90 % ACN / 10 % Wasser, + 0.1 % TFA) anstelle von ACN (+ 0.1 % TFA) verwendet. Die Flussraten betragen 1 mL/min (analytisch) und 8 mL/min (semipräparativ).

ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ gemessen, ggf. in Kombination mit dem **HPLC**-System *Hewlett Packard* HP 1100 (Säulenmaterial: *YMC* ODS-A 120-3C₁₈ (3 µm, 125 mm × 2 mm), Flußrate 0.2 mL/min). Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0.1 % Ameisensäure) und ACN (+ 0.1 % Ameisensäure) im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 15 min verwendet. Die ESI-Spektren werden in der Form „X (Y) [m + Z⁺]“ bzw. bei mehrfacher Ladung in der Form „X (Y) [m + nZ⁺]/n“ angegeben. Dies entspricht der Detektion der Molekülmasse X mit der Intensität Y %, die dem Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls m mit dem Kation Z⁺ bzw. dem Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls mit n Kationen Z⁺ geteilt durch die Zahl der Ladungen entspricht.

MALDI-Massenspektren wurde an einem Biflex III-Gerät der Firma *Bruker* aufgenommen. Als Matrix diente α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CCA).

Die **NMR**-Spektren wurden mit den Geräten AC250 und DMX500 der Firma *Bruker* bei 300 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme stammen von Bruker oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Für die Messungen wurden in der Regel 5 - 20 mg Substanz in 0.5 mL deuteriertem Lösungsmittel (CDCl₃ oder DMSO-d₆) gelöst. Interner Standard für die chemischen Verschiebungen von ¹H und ¹³C war das Lösungsmittelsignal von DMSO-d₅ für ¹H (δ = 2.49 ppm) und DMSO-d₆ für ¹³C (δ = 39.5 ppm) bzw. CHCl₃ für ¹H (δ = 7.24 ppm) und CDCl₃ für ¹³C (δ = 77.0 ppm). Die ¹³C-Spektren wurden mit ¹H-Breitbandentkopplung aufgenommen.

8.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1 (Standardvorschrift zur Beladung von TCP-Harz mit der ersten Aminosäure)

1-10 g TCP-Harz (Beladung ca. 1.0 - 0.9 mmol Chlor / g Harz) werden in ein tariertes Schüttelgefäß eingewogen. Pro Gramm Harz werden 1.5 eq Fmoc-Aminosäure (AS)-Derivat in 15 - 20 mL trockenem DCM gelöst. Als Base werden 2.5 eq DIPEA, bezogen auf eingesetztes Fmoc-AS-Derivat, verwendet. 1/3 der DIPEA-Menge wird zur Fmoc-AS-Lösung in DCM gegeben. Diese Lösung gibt man direkt zum trockenen TCP-Harz. Nach 5 min Schütteln wird das restliche DIPEA zugegeben. Nach weiteren 60 min Schütteln werden pro Gramm Harz 0.5-1.0 mL Methanol (HPLC-grade) zugegeben, um unumgesetzte Tritylchlorid-Gruppen zu *cappen*. Das Harz wird nach weiteren 15-20 min abgefrittet, einmal mit DCM, dreimal mit NMP und dreimal mit DCM gewaschen. Danach wäscht man zweimal mit reinem Methanol, wobei sich das Harz zusammenballt. Nach Trocknen des Harzes im Exsikkator über Blaugel lässt sich die Harzbeladung ungefähr gravimetrisch nach folgender Formel bestimmen:

$$n = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(M_{AS} - M_{HCl}) \cdot m_2}$$

n	Belegungsdichte [mmol AS / g belegtes Harz]
m ₁	Einwaage des unbeladenen Harzes [g]
m ₂	Einwaage des beladenen Harzes [g]
M _{AS}	Molmasse der Fmoc-AS [g / mol]
M _{HCl}	36,46 g / mol

AAV 2 (Festphasensynthese des linearen Peptids)

Die Kupplung von Aminosäuren folgt dem in Schema 1 beschriebenen Weg. Im Schritt 5 werden die Kupplungslösungen **a** oder **b** eingesetzt

a: 2.5 eq Fmoc-AS (bezogen auf freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), 2.5 eq HOBt, 2.5 eq TBTU und 7 eq DIPEA werden in 10-15 mL NMP/g Harz gelöst und in das Schüttelgefäß gegeben.

b: 2.5 eq Fmoc-AS (bezogen auf freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), 2.5 eq HOAt, 2.5 eq HATU und 25 eq 2,4,6-Collidin werden in 10 mL NMP/g Harz gelöst und in das Schüttelgefäß gegeben.

c: 2.5 eq Fmoc-AS (bezogen auf freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), 2.5 eq HOBt, 2.5 eq TBTU und 25 eq 2,4,6-Collidin werden in 10 mL NMP/g Harz gelöst und in das Schüttelgefäß gegeben.

d: 2.5 eq Fmoc-AS (bezogen auf freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), 2.5 eq HOBt, 2.5 eq TBTU und 9.5 eq DIPEA werden in 10-15 mL NMP/g Harz gelöst und in das Schüttelgefäß gegeben.

Schema 1: *Festphasen-Peptidsynthese nach der Fmoc-Strategie*

	Reagenzien	Operation	Zeit [min]
1	NMP	Waschen	1×3
2	20 % Piperidin / NMP	Fmoc-Abspaltung	1×5
3	20 % Piperidin / NMP	Fmoc-Abspaltung	1×10
4	NMP	Waschen	5×1
5	AAV 2a / b	Kuppeln	1×45
6	NMP	Waschen	4×1

Die Vollständigkeit der Kupplung wird anhand des Kaiser-Tests (AAV 3) kontrolliert. Fällt dieser positiv aus, sind die Schritte 5-6 zu wiederholen.

AAV 3 (Kaiser-Test)

Eine kleine Menge Harz wird in einer 2mL-Kunststoffspritze mit PP-Fritte 3x 1 min mit DCM gewaschen. Das Harz wird in ein kleines Reagenzglas überführt und es werden dazu jeweils 2 Tropfen von folgenden Lösungen gegeben:

1. 3 % Ninhydrin in Ethanol
2. 5 % Phenol in Ethanol
3. 2 mL 1 mM KCN in 98 mL Pyridin

Das Gemisch wird auf 60 °C erhitzt. Tritt innerhalb von 2 min eine Blaufärbung auf, so ist die Kupplung nicht vollständig.

AAV 4 (Abspalten des Peptids vom TCP-Harz unter Erhalt der Schutzgruppen)

Vor der Abspaltung des Peptids wird die letzte Fmoc-Schutzgruppe entfernt (Schritte 2-3 aus Schema 1).

a: Die Abspaltung des Peptids erfolgt nach Schema 2.

Schema 2: *Abspalten des Peptids vom Harz*

	Reagenzien	Operation	Zeit [min]
1	NMP	Waschen	5x1
2	DCM	Waschen	5x1
3	AcOH / TFE / DCM 3:1:6	Abspalten	1×60
4	AcOH / TFE / DCM 3:1:6	Abspalten	3×10

Die Filtrate aus den Schritten 3 und 4 werden eingeeengt und lyophilisiert.

b: Die Abspaltung erfolgt analog **a**, jedoch wird als Reagenz in den Schritten 3 und 4 Hexafluorisopropanol / DCM 1:4 verwendet.

AAV 5 (Cyclisierung)

Das lineare Peptid-Acetat wird in hoher Verdünnung ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ M) in frisch destilliertem DMF gelöst. Nach Zugabe von 3 eq DPPA und 5 eq NaHCO₃ als feste Base wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des NaHCO₃ wird die Lösung bei 40 °C im Hochvakuum stark eingeeengt, das Cyclopeptid in Wasser gefällt und so lange mit Wasser gewaschen, bis die Diphenylphosphorsäure komplett entfernt

ist (keine Schaumbildung mehr an der Frittenunterseite). Das Peptid wird im Hochvakuum getrocknet.

AAV 6 (Abspaltung der Z- bzw. der Benzylschutzgruppe)

1 mmol Z-geschütztes Peptid wird in 30 mL N,N-Dimethylacetamid gelöst. Nach Zugabe von 0.5 – 1 g Katalysator (5 % Pd / C) wird die Suspension 4 h unter H₂-Atmosphäre gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bei 40 °C im Hochvakuum wird der Rückstand in 50 mL Acetonitril / Wasser 9 / 1 aufgenommen und der Katalysator zunächst durch eine Fritte der Porosität 4, anschließend durch ein Mikrofilter der Porengröße 0.45 µm abfiltriert. Nach Einengen des Filtrates wird das Peptid lyophilisiert.

AAV 7 (Abspaltung der Pbf-, OtBu- und Trt-Schutzgruppen)

a: Mit TFA-labilen Schutzgruppen geschütztes Peptid wird in einer Mischung von 95 % TFA und 5 % Wasser gelöst. Nach 3 h wird das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 40 °C abdestilliert. Das Peptid wird in einer geringen Menge Essigsäure gelöst, mit Ether gefällt und im Exsikkator getrocknet.

b: Die Vorschrift ist analog zu Vorschrift a, jedoch erfolgt die Abspaltung mit einer Mischung von 90 % TFA, 3 % Wasser und 7 % TIPS.

AAV 9 (Fragmentkupplung am Harz)

a (Kupplung mit HATU, HOAt und 2,4,6-Collidin): 1.5 eq Carbonsäurefragment (bezogen auf die Menge freien N-Terminus am Harz), 1.45 eq HATU, 1.5 eq HOAt und 10 eq 2,4,6-Collidin werden in soviel NMP gelöst, dass die Konzentration des

Carbonsäurefragments 0.2 mM beträgt. Nach 2 h wird die Lösung zum Harz gegeben. Man lässt 12 h bei Raumtemperatur reagieren.

b (Kupplung mit PyBOP, HOBt und 2,4,6-Collidin): 1.5 eq Carbonsäurefragment (bezogen auf die Menge freien N-Terminus am Harz), 1.5 eq HATU, 1.5 eq HOAt und 15 eq 2,4,6-Collidin werden in soviel NMP gelöst, dass die Konzentration des Carbonsäurefragments 0.2 mM beträgt. Die Lösung wird zum Harz gegeben. Man lässt 12 h bei Raumtemperatur reagieren.

AAV 10 (Fragmentkupplung in Lösung)

a (Kupplung mit HATU, HOAt und 2,4,6-Collidin): 0.2 mmol Carbonsäurefragment, 0.4 mmol HATU, 0.4 mmol HOAt und 3 mmol 2,4,6-Collidin werden in 0.7 mL DMF gelöst. Nach 2 h werden 0.8 mmol S-Tritylcystein*HCl zugegeben. Man lässt 12 Stunden rühren.

b (Kupplung mit EDCI, HOBt und DIPEA): 0.2 mmol Carbonsäurefragment, 0.22 mmol Aminfragment, 0.22 mmol EDCI*HCl, 0.22 mmol HOBt und 0.8 mmol DIPEA werden in 1 mL DMF gelöst. Man lässt 12 h rühren.

AAV 11 (Abspalten des Peptids vom TCP Harz und Entfernung der Pbf-, OtBu-, Trt- und Boc-Schutzgruppen)

Die Abspaltung des Peptids erfolgt nach Schema 3 mit einer Lösung aus TFA / Wasser 95 / 5. Vor dem Aufziehen der Abspaltlösung werden pro 100 mg Harz ca. 100 μ L TIPS in die Spritze aufgezogen.

Schema 2: *Abspalten des Peptids vom Harz und Entfernung der Schutzgruppen*

	Reagenzien	Operation	Zeit [min]
1	NMP	Waschen	5x1
2	DCM	Waschen	5x1
3	95 % TFA, TIPS	Abspalten	3x2

Die vereinigten Filtrate aus Schritt 3 werden noch 3 h unter gelegentlichem Schütteln stehengelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel im Hochvakuum bei 40 °C abdestilliert. Der Rückstand wird in einer geringen Menge Essigsäure gelöst, mit Ether gefällt und im Exsikkator getrocknet.

AAV 12 (Abspaltung der Teoc-Schutzgruppe)

a: 0.1 mmol mit Bis-Teoc-Dab belegtes TCP-Harz (bezogen auf Dab), 2 mmol TBAF (1 M in THF, 2 ml) und 4 mL frisches DMSO werden in einen Kolben gegeben. Der Kolben wird am Rotationsverdampfer unter langsamem Rotieren ohne Vakuum 2 h bei 50 °C gehalten. Das Gemisch wird in eine Spritze mit Fritte überführt, das Lösungsmittel abgesaugt und das Harz nach folgendem Schema gewaschen: 3x1 min DMSO, 5x1 min DCM, 2x1 min Methanol. Das Harz wird im Exsikkator über Blaugel getrocknet.

b: wie a, aber mit 4 mmol TBAF und 8 mL DMSO.

c: wie a, aber mit 8 mmol TBAF und 16 mL DMSO.

AAV 13 (Oximligation von Aminoxy-Peptid und Aldehyd)

1 µmol Peptid werden mit 1 mL einer 0.01 M Lösung von Aldehyd in 90 % ACN / H₂O (pH4, TFA) gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird mit dreimal 5 mL Diethylether gewaschen und aus ACN / Wasser lyophilisiert.

8.3 Synthese der Bausteine und Aminosäuren

8.3.1 Synthese der Cyclopeptide

cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fK-] (**Z1***) und *cyclo*(-RGDfK) (**Z1**)

Z1* wird durch eine kombinierte Festphasen-Lösungssynthese hergestellt. Dazu wird nach AAV 1 und AAV 2a das lineare Peptid H-D(OtBu)fK(Z)R(Pbf)G-OH **34** an der Festphase hergestellt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt nach AAV 4. Das lineare Peptid wird nach AAV5 in Lösung cyclisiert, die Z-Schutzgruppe wird nach AAV 6 abgespalten. Ausbeute **Z1*** 67 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 19.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 856.4 (61) [m -tBu⁺+2H⁺], 912.3 (100) [m +H⁺], 934.3 (27) [m +Na⁺].

Z1 wird aus **Z1*** durch Abspaltung der Schutzgruppen nach AAV 7a hergestellt. Ausbeute **Z1** nach HPLC-Reinigung 34 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (5-60 % in 30 min) $R_t = 11.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 604.4 (100) [m +H⁺], 626.5 (25) [m +Na⁺], 642.4 (18) [m +K⁺].

cyclo[-R(Pbf)AD(OtBu)fK-] (**Z2***) und *cyclo*(-RADfK) (**Z2**)

Z2* und **Z2** werden analog zu Verbindung **Z1*** und **Z1** synthetisiert.

Ausbeute **Z2*** 59 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 19.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 870.6 (21) [m -tBu⁺+2H⁺], 926.5 (100) [m +H⁺], 948.5 (12) [m +Na⁺].

Ausbeute **Z2** nach HPLC-Reinigung 28 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (5-60 % in 30 min) $R_t = 10.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 618.5 (100) [m +H⁺], 640.4 (18) [m +Na⁺], 656.4(10) [m +K⁺].

cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-] (**Z3***) und *cyclo*(-RGDfE) (**Z3**)

Synthese von **Z3*** und **Z3** nach der kombinierten Festphasen-Lösungssynthese:

Z3* und **Z3** werden analog zu Verbindung **Z1*** und **Z1** mit folgenden Modifikationen synthetisiert: die Fmoc-Entschützung des Glutamats wird auf 2x5 min verkürzt und die Kupplung von Fmoc-D-Phe-OH wird nach AAV2c durchgeführt.

Ausbeute **Z3*** 58 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 21.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 857.5 (75) $[m-tBu^++2H^+]$, 913.4 (100) $[m+H^+]$, 935.5 (15) $[m+Na^+]$.

Ausbeute **Z3** nach HPLC-Reinigung 31 %.

HPLC (5-60 % in 30 min) $R_t = 13.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 322.4 (17) $[m+H^++K^+]$, 605.4 (100) $[m+H^+]$.

Synthese von **Z3*** durch Cyclisierung am Harz:

Das TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Glu(OH)-ODmab belegt, woran das lineare Peptid H-R(Pbf)GD(OtBu)fE(TCP)-ODmab nach AAV 2a aufgebaut wird. Die Dmab-Schutzgruppe wird analog dem Fließschema von AAV 2, aber mit 2 %iger Hydrazinlösung in DMF anstelle von Piperidin abgespalten. Die Cyclisierung am Harz wird nach AAV 2a durchgeführt. Wegen der großen Mengen der bei dieser Reaktion entstandenen Nebenprodukte werden die Reaktionsprodukte nach AAV 11 vom Harz abgespalten und gleichzeitig die permanenten Schutzgruppen entfernt.

Ausbeute **Z3** nach HPLC-Reinigung 15 % (bezogen auf die Harzbelegung).

Ausbeute *cyclo*(-RGDfERGDfE-) **Z5** nach HPLC-Reinigung 4 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (5-60 % in 30 min) $R_t = 15.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 416.9 (32) $[m+2H^++K^+]/3$, 605.7 (100) $[m+2H^+]/2$, 624.5 (13) $[m+H^++Na^+]/2$, 1209.6 (9) $[m+H^+]$.

Ausbeute *cyclo*(-RGDfEGDfE-) **Z6** nach HPLC-Reinigung 4 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (5-60 % in 30 min) $R_t = 16.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 364.9 (44) $[m+2H^++K^+]/3$, 546.6 (32) $[m+H^++K^+]/2$, 1053.5 (100) $[m+H^+]$.

cyclo[-R(Pbf)AD(OtBu)fE-] (**Z4***) und ***cyclo***(-RADfE) (**Z4**)

Z4* und **Z4** werden analog zu Verbindung **Z3*** und **Z3** synthetisiert.

Ausbeute **Z4*** 48 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (10-90 % in 30 min) $R_t = 21.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 857.5 (75) $[m-tBu^++2H^+]$, 913.4 (100) $[m+H^+]$, 935.5 (15) $[m+Na^+]$.

Ausbeute **Z4** nach HPLC-Reinigung 28 % (bezogen auf die Harzbelegung).

HPLC (5-60 % in 30 min) $R_t = 13.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 322.4 (17) $[m+H^++K^+]$,

***cyclo*[RGDfK(Ac)] (Z7)**

60 mg teilentschütztes Peptid **Z1*** werden in 3 mL DMF (wasserfrei) gelöst und mit 0.5 mL Essigsäureanhydrid, 1 mL Pyridin und einer Spatelspitze DMAP versetzt und 30 min gerührt. Die Lösungsmittel werden im Hochvakuum entfernt und der Rückstand nach AAV 7a entschützt.

Man erhält nach HPLC-Reinigung 23 mg **Z7** (Ausbeute 53 %).

HPLC (5-70 % in 30 min) $R_t = 13.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 343.1 (10) $[m+H^++Na^+]/2$, 646.5 (100) $[m+H^+]$, 668.4 (9) $[m+Na^+]$.

***cyclo*[-RGDfE(N-propyl)] (Z8)**

80 mg (0.088 mmol) teilentschütztes Peptid **Z3*** werden nach AAV 10b mit 1-Propylamin gekuppelt. Die Lösungsmittel werden im Hochvakuum entfernt und der Rückstand nach AAV 7a entschützt.

Man erhält nach HPLC-Reinigung 22 mg **Z8** (Ausbeute 39 %).

HPLC (5-70 % in 30 min) $R_t = 16.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 646.6 (100) $[m+H^+]$.

8.3.2 Synthese von Bis-N,N'-Teoc-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure, Bis-Teoc-Dab-OH (59)

2-(N-Teoc)-Aminoethylbromid (57)

Zu einer Lösung von 43.39 g (211.74 mmol) 2-Aminoethylbromid*HBr und 22.44 g (211.74 mmol) Na_2CO_3 in 80 mL Wasser wird eine Lösung von 20.0 g (70.58 mmol) 2-Trimethylsilyl-p-nitrophenylcarbonat (Teoc-ONp) in 160 mL *t*BuOH gegeben und man lässt 12 h bei Raumtemperatur rühren. Das *t*BuOH wird im Vakuum entfernt und

das Reaktionsgemisch mit 500 mL Ether extrahiert. Der Ether wird mit siebenmal 70 mL 1 N NaOH, mit zweimal 50 mL 1 M KHSO₄, mit 50 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält 18.4 g reines **57** als farbloses Öl (Ausbeute 97 %).

$R_f = 0.47$ (Hexan/Essigester 9:1). **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.10$ (bs, 1H, NH); 4.12 (m, 2H, CH₂O); 3.53 (m, 2H, CH₂N); 3.41 (m, 2H, CH₂Br); 0.94 (m, 2H, CH₂Si); 0.00 (s, 9H, SiMe₃). **¹³C-NMR** (62.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 156.5$ (NHCO₂); 63.3 (CH₂O); 42.6 (CH₂NH); 32.5 (CH₂Br); 17.7 (CH₂Si); -1.5 (SiMe₃).

Bis-N,N'-Teoc-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäuremethylester (58)

Zu einer Lösung von 3.01 g (17.89 mmol) 3,5-Dihydroxybenzoesäure in 150 mL DMF (wasserfrei) werden 12.00 g (44.73 mmol) Bromid **57** und 12.36 g (89.45 mmol) K₂CO₃ gegeben. Man lässt 12 h bei 50 °C Rühren. Das DMF wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 400 mL Ether aufgenommen. Die Etherphase wird mit zweimal 70 mL 1 N NaOH, mit 50 mL ges. NH₄Cl-Lsg. und 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird das Rohprodukt an 300 g Kieselgel (Hexan/Essigester 1:1) chromatographiert. Man erhält 6.47 g reines **58** und 2.97 g Mischfraktion als farbloses Öl. Chromatographie der Mischfraktion an 150 g Kieselgel (Hexan/Essigester 1:1) ergibt 1.30 g reines **58** und 1.53 g Mischfraktion mit einem Reinheitsgrad > 90 %. Man erhält insgesamt 7.77 g reines **58** (Ausbeute 80 %) und 1.53 g Mischfraktion (Ausbeute ca 15 %).

$R_f = 0.36$ (Hexan/Essigester 1:1). **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃) $\delta = 7.14$ (d, J = 2.3 Hz, 2H, H_{ar}); 6.59 (t, J = 2.3 Hz, 1H, H_{ar}); 5.08 (bs, 2H, NH); 4.15 (m, 4H, CH₂OCONH); 4.01 (t, J = 5.2 Hz, 4H, CH₂OC_{ar}); 3.86 (s, 3H, OMe); 3.54 (q, 4H, J = 5.2, CH₂N); 0.94 (m, 4H, CH₂Si); 0.00 (s, 18H, SiMe₃). **¹³C-NMR** (62.9 MHz, CDCl₃) $\delta = 166.5$ (CO₂Me); 159.5 (C_{ar}O); 156.5 (NHCO₂); 132.1 (C_{ar}CO₂), 108.0, 106.5 (CH_{ar}); 67.3 (CH₂OC_{ar}); 63.2 (CH₂OCONH); 52.2 (OMe); 40.3 (CH₂NH); 17.7 (CH₂Si); -1.5 (SiMe₃). **HPLC** (10-100 % in 30 min) $R_t = 28.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 487.3 (100) [m-EtSiMe₃+ H⁺] oder [m-2Et-CO₂+H⁺], 543.1 (38) [m+H⁺], 565.4 (83) [m+Na⁺], 1085.1 (46) [2m+H⁺], 1107.3 (100) [2m+Na⁺].

Bis-N,N'-Teoc-3,5-di-(2-aminoethoxy)-benzoesäure (59)

7.00 g (12.9 mmol) Methylester **58** werden in 150 mL Methanol und 26 mL 5 N NaOH 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Methanol wird im Vakuum entfernt und das Reaktionsgemisch mit 400 mL Ether versetzt, mit 2 g KHSO₄ und 32 mL 4 M HCl angesäuert und ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit dreimal 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingeengt und mit Hexan versetzt. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt. Man erhält 6.74 g **59** als farblosen Feststoff (Ausbeute 99 %).

$R_f = 0.24$ (Hexan/Essigester 1:1, 10 mL + 2 Tropfen AcOH). **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 7.20$ (bt, $J = 5.3$, 2H, NH); 7.03 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, H_{ar}); 6.71 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H, H_{ar}); 4.06-3.97 (m, 8H, CH₂O); 3.32 (q, 4H, $J = 5.3$, CH₂N); 0.90 (m, 4H, CH₂Si); 0.00 (s, 18H, SiMe₃). **¹³C-NMR** (62.9 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 167.1$ (C=O₂Me); 159.7 (C_{ar}O); 156.6 (NHCO₂); 133.0 (C_{ar}CO₂), 108.0, 105.8 (CH_{ar}); 66.9 (CH₂OC_{ar}); 61.8 (CH₂OC(=O)NH); 39.9 (CH₂NH); 17.6 (CH₂Si); -1.3 (SiMe₃). **HPLC** (10-100 % in 30 min) $R_t = 25.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 429.2 (100) [m-EtSiMe₃+H⁺] oder [m-2Et-CO₂+H⁺], 473.1 (70) [m-2Et+H⁺], 528.9 (46) [m+H⁺], 551.2 (32) [m+Na⁺], 1079.0 (45) [2m+Na⁺].

8.3.3 Synthese von Diazoessigsäure-tert.-butylester (43)**Azidoessigsäure-tert.-butylester (45)**

Die Synthese wird nach *Vollmar et al.* durchgeführt.^[392] 27.3 g (0.14 mol) Bromessigsäure-tert.-butylester und 13.0 g (0.20 mol) Natriumazid werden in 50 mL Aceton/Wasser 3:2 14 h unter Rückfluss erhitzt. Das Aceton wird im Vakuum entfernt und der Rückstand mit dreimal 70 mL Ether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 21.7 g **45** als farblose Flüssigkeit (Ausbeute 99 %).

$R_f = 0.51$ (Hexan/Essigester 9:1). **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃) $\delta = 3.45$ (s, 2 H, CH₂CO₂); 1.51 (s, 9 CMe₃).

Glycin-*tert.*-butylester (46)

Die Synthese wird modifiziert nach *Vollmar et al.* durchgeführt.^[392] 21.7 g (0.14 mol) Azid **45** wird in 200 mL Ethanol/Chloroform 4:1 gelöst und mit 3.0 g Hydrierkatalysator (Pd/C, 5 %) 24 unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Die Reaktionsmischung wird über Celite filtriert und das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 200 mL Ether aufgenommen und mit zweimal 50 mL 1 N KHSO₄-Lsg extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit 250 mL 2 N NaOH basisch gemacht und mit einmal 150 mL und zehnmal 50 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 4.4 g **46** als gelbliches Öl (Ausbeute 22 %).

$R_f = 0.44$ (Methanol/Chloroform 9:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) $\delta = 3.31$ (s, 2H, CH₂CO₂); 1.47 (s, 9 H, CMe₃).

Diazoessigsäure-*tert.*-butylester (43)

Die Synthese wird modifiziert nach *Skinner et al.* durchgeführt.[# 315] Zu 4.40 g (33.7 mmol) Amin **46** wird unter Eiskühlung eine Lösung von 80 mg Natriumacetat in 3.1 mL Wasser und 0.93 mL konz. Schwefelsäure gegeben. Es werden 3.8 g Eis zugefügt, unter Rühren 2.32 g Natriumnitrit in 4 mL Wasser zugetropft und noch 10 min gerührt. Das Reaktionsgemisch wird mit zweimal 20 mL DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Gemisch wird aufgrund der Leichtflüchtigkeit nur stark eingengt. Man erhält 4.50 g **43** als gelbe Flüssigkeit (Ausbeute 94 %, ¹H-NMR).

$R_f = 0.39$ (Hexan/Essigester 15:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) $\delta = 4.57$ (s, 2H, CHCO₂); 1.43 (s, 9H, CMe₃).

8.3.4 Synthese von 14-(N-Fmoc)-amino-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure (49)

14-Hydroxy-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure-*tert.*-butylester (47)

Die Synthese wird nach *Jullien et al.* durchgeführt.^[391] Zu einer Lösung von 16.40 g (84.41 mmol) Tetraethylenglycol in 40 mL DCM (wasserfrei) werden 1.00 g Diazoessigsäure-*tert.*-butylester (enthält ca. 13 % DCM (¹H-NMR), *Aldrich*) (5.99 mmol) und 3 Tropfen BF₃·OEt₂ (destilliert, säurefrei, *Fluka*) gegeben. Nach Abklingen der Stickstoffentwicklung werden nochmals 3 Tropfen BF₃·OEt₂ zugegeben. Dieser Vorgang wird bei starker Stickstoffentwicklung ggf. wiederholt. Danach wird ein Trockenrohr aufgesetzt und bei Raumtemperatur 8 h gerührt. Zum Reaktionsgemisch werden 200 mL Essigester zugegeben, die organische Phase viermal mit 50 mL ges. NaCl-Lsg gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an 220 g Kieselgel (Chloroform/Methanol 15:1) chromatographiert. Man erhält 1.40 g **47** als farbloses Öl (Ausbeute 76 %).

R_f = 0.47 (Chloroform/Methanol 9:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.97 (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.70-3.54 (m, 16 H, OCH₂CH₂O); 2.69 (bs, 1H, OH); 1.42 (s, 9H, *tert*Bu). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): δ = 169.6 (C=O₂*t*Bu); 81.4 (OCMe₃); 72.5, 70.9-70.3, 68.9 (CH₂OCH₂); 61.4 (CH₂OH); 28.0 (CH₃).

14-(O-*p*-Tosyl)-Hydroxy-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure-*tert.*-butylester (74)

Zu einer Lösung von 1.13 g (3.66 mmol) Hydroxyverbindung **51**, 117 mg (1.22 mmol) Trimethylamin·HCl und 5.1 mL (36.64 mmol) Triethylamin in 20 mL DCM (wasserfrei) werden bei 0 °C 1.05 g (5.50 mmol) *p*-Tosylchlorid in 10 mL DCM innerhalb von 10 min zugetropft. Die Kühlung wird entfernt und man lässt noch 1 h rühren. Nach Zugabe von 200 mL Essigester wird die organische Phase mit zweimal 40 mL 1 N H₂SO₄, mit 40 mL ges. NaHCO₃-Lsg. und mit 40 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde an 100 g Kieselgel (Hexan/Essigester 2:3) chromatographiert. Man erhält 1.52 g **74** als rötliches Öl (Ausbeute 90 %).

R_f = 0.61 (Chloroform/Methanol 20:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 7.74 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{ar}); 7.29 (d, 2H, J = 8.2 Hz, H_{ar}); 4.10 (t, 2H, J = 5.0 Hz, CH₂OTs); 3.96

(s, 2H, OCH₂CO₂); 3.70-3.50 (m, 14 H, OCH₂CH₂O); 2.39 (s, 3H, Me); 1.42 (s, 9H, OtBu). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): δ = 169.5 (C=O₂tBu), 144.7, 133.0, 129.7, 127.8 (C_{ar}); 81.4 (OCMe₃); 70.6-70.4, 69.1, 68.9, 68.5 (OCH₂); 28.0 (CH₃ tBu); 21.5 (CH₃ Ts).

14-Azido-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure-tert.-butylester (75)

Zu einer Lösung von 700 mg (1.51 mmol) Tosylat **74** in 10 mL DMF (wasserfrei) werden 127 mg (2.11 mmol) NaN₃ gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wird im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand in 75 mL Essigester aufgenommen und mit zweimal 15 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Das Lösungsmittel wird mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird an 80 g Kieselgel (Hexan/Essigester 3:2) chromatographiert. Man erhält 461 mg **75** als farbloses Öl (Ausbeute 91 %).

Synthese von **75** nach *Handa et al.*:^[395] Unter Argonatmosphäre werden zu einer Lösung von 700 mg (1.51 mmol) Tosylat **74** in THF (wasserfrei) 0.28 mL (2.11 mmol) TMSN₃ und 3 mL TBAF-Lsg (0.7 M in THF, 2.1 mmol) gegeben und man lässt 24 h bei Raumtemperatur rühren. Zum Reaktionsgemisch werden 15 mL ges. NaCl-Lsg gegeben und mit zweimal 75 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt an 80 g Kieselgel (Hexan/Essigester 3:2) chromatographiert. Man erhält 503 mg **75** als farbloses Öl (Ausbeute 99 %).

R_f = 0.41 (Hexan/Essigester 1:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.96 (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.67-3.59 (m, 14 H, OCH₂CH₂); 3.33 (t, J = 4.9 Hz, 2H, CH₂N₃); 1.42 (s, 9H, OtBu). ¹³C-NMR ¹³C (62.9 MHz, CDCl₃): δ = 169.5 (C=O₂tBu); 81.4 (OCMe₃); 70.6-70.5, 69.9, 68.9 (OCH₂); 50.6 (CH₂N₃); 28.0 (CH₃).

14-Amino-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure-tert.-butylester (48)

462 mg (1.38 mmol) Azid **75** werden in 20 mL Ethanol und 20 mL Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 100 mg Katalysator (5 % Pd/C) wird das Gemisch 4 h unter H₂-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wird über einen HPLC-Mikrofilter (Porengröße 0.45 μm) abfiltriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird

in 60 mL Essigester aufgenommen und mit zweimal 40 mL 1 N KHSO₄-Lsg extrahiert. Die Wasserphase wird mit K₂CO₃ basisch gemacht und mit dreimal 40 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 394 mg reines **48** als farbloses Öl (93 %).

$R_f = 0.51$ (Chloroform/Methanol 6/1, 10 mL + 1 Tropfen Ammoniumhydroxid). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.96$ (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.69-3.55 (m, 12 H, OCH₂CH₂O); 3.46 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂); 2.81 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂); 1.77 (bs, 2H, NH₂); 1.42 (s, 9H, OtBu). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.6$ (CO₂tBu); 81.5 (OCMe₃); 73.3, 70.6-70.2, 68.9 (OCH₂); 41.7 (CH₂NH₂); 28.0 (CH₃).

14-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure-tert.-butylester (76)

Zu einer Lösung von 269 mg (0.875 mmol) Amin **48** in 5 mL Dioxan und 5 mL 10 % Na₂CO₃-Lsg. werden bei 0 °C 249 mg (0.963 mmol) Fmoc-Chlorid in 5 mL Dioxan innerhalb von 10 min zugetropft. Es wird noch 2 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wird mit dreimal 30 mL Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit 30 mL ges. NH₄Cl-Lsg und 30 mL NaCl-Lsg gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird an 120 g Kieselgel (Hexan/Essigester 1:3) chromatographiert. Man erhält 126 mg **76** als farbloses Öl, welches nach einiger Zeit zu einem farblosen Feststoff erstarrt (Ausbeute 27 %).

$R_f = 0.24$ (Hexan/Essigester 1/2). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.74$ (d, J = 7.3 Hz, 2H, H_{ar}); 7.58 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H_{ar}); 7.37 (m, 2H, H_{ar}); 7.29 (m, 2H, H_{ar}); 5.48 (bs, 1H, NH); 4.38 (d, J = 6.9 Hz, 1H, CHCH₂), 4.20 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CHCH₂); 3.97 (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.69-3.50 (m, 14 H, OCH₂CH₂); 3.37 (m, 2H, CH₂NH); 1.44 (s, 9H, OtBu). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.6$ (CO₂tBu); 156.5 (NHCO₂); 144.0, 141.3, 127.6, 127.0, 125.0, 119.9 (C_{ar}); 81.5 (OCMe₃); 70.6-70.0, 68.9 66.5 (OCH₂); 47.2 (CH); 41.7 (CH₂NH); 28.1 (CH₃).

14-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12-tetraoxa-tetradecansäure (49)

86 mg (0.162 mmol) *tert.*-Butylester **76** werden in 4 mL TFA/Wasser 9:1 gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die TFA wird im Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt in 40 mL Chloroform aufgenommen und mit zweimal 20 mL ges. NaCl-Lsg gewaschen. Das Lösungsmittel wird mit Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum entfernt. Man erhält 77 mg **49** als farbloses Öl (Ausbeute 100 %).

$R_f = 0.23$ (Chloroform/Methanol 4:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.72$ (d, J = 7.3 Hz, 2H, H_{ar}); 7.58 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H_{ar}); 7.36 (m, 2H, H_{ar}); 7.28 (m, 2H, H_{ar}); 5.64 (bs, 1H, NH); 4.37 (d, J = 6.9 Hz, 1H, CHCH₂), 4.20 (t, J = 6.9 Hz, 2H, CHCH₂); 4.09 (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.71-3.40 (m, 16 H, OCH₂CH₂). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.2$ (C=O₂H); 156.6 (NHCO₂); 143.9, 141.2, 127.6, 127.0, 125.0, 119.8 (C_{ar}); 70.9-70.2, 68.8 66.6 (OCH₂); 47.1 (CH); 40.7 (CH₂NH). ESI-MS *m/z* (%) 474.0 (8) [m+H⁺], 496.2 (100) [m+Na⁺], 512.0 (63) [m+K⁺], 518 (64) [m-H⁺+2Na⁺].

8.3.5 Synthese von 20-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure, Fmoc-Hegas-OH (50)**20-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert.*-butylester (51)**

Zu einer Lösung von 23.7 g (83.94 mmol) Hexaethylenglycol in 150 mL DCM (wasserfrei) werden 3.95 g Diazoessigsäure-*tert.*-butylester (ca. 13 % DCM (NMR), Aldrich) (25.51 mmol) und 3 Tropfen BF₃·OEt₂ (destilliert, säurefrei, Fluka) gegeben. Nach Abklingen der Stickstoffentwicklung werden nochmals 4 Tropfen BF₃·OEt₂ zugegeben. Dieser Vorgang wird bei starker Stickstoffentwicklung ggf. wiederholt. Danach wird ein Trockenrohr aufgesetzt und bei Raumtemperatur 8 Stunden gerührt. Zum Reaktionsgemisch werden 450 mL Essigester zugegeben, die organische Phase mit fünfmal 50 mL ges. NaCl-Lsg gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält 8.90 g **51** als gelbliches Öl, welches gemäß ¹H-NMR ca. 12 % Di-*tert.*-butylester enthält (Ausbeute 78 %). Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt.

$R_f = 0.58$ (Chloroform/Methanol 9:1). $^1\text{H-NMR}$ ^1H (250 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.98$ (s, 2H, OCH_2CO_2); 3.70-3.52 (m, 24 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); 2.51 (bs, 1H, OH); 1.44 (s, 9H, *Ot*Bu). **ESI-MS** m/z 369.1 (100) [$m+\text{H}^+$].

20-(O-p-Tosyl)-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-tert.-butylester (77)

Zu einer Lösung von 22.6 g („57 mmol“) Rohprodukt **51**, 1.09 g (11.4 mmol) Trimethylamin*HCl und 23.8 mL (171.0 mmol) Triethylamin in 150 mL DCM (wasserfrei) werden bei 0 °C 10.87 g (57.0 mmol) p-Tosylchlorid in 50 mL DCM innerhalb von 10 min zugetropft. Die Kühlung wird entfernt und man lässt noch 1 h rühren. Danach werden 500 mL Essigester zugegeben und die organische Phase mit zweimal 100 mL 1 N H_2SO_4 , mit 100 mL ges. NaHCO_3 -Lsg. und mit 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Man erhält 36 g Rohprodukt **77** als rötliches Öl, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wird.

$R_f = 0.48$ (Chloroform/Methanol 20:1)

20-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-tert.-butylester (78)

Zu einer Lösung von 36.0 g („57 mmol“) Tosylat **77** in 100 mL DMF (wasserfrei) werden 5.55 g (85.5 mmol) NaN_3 gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wird im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand in 300 mL Essigester aufgenommen und mit dreimal 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Das Lösungsmittel wird mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum entfernt und das Rohprodukt wird an 80 g Kieselgel (Hexan/Essigester 3:2) chromatographiert. Man erhält 27 g Rohprodukt **78** als rötliches Öl, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wird.

$R_f = 0.53$ (Chloroform/Methanol 20:1). Der Fleck des Azids ist schwer zu erkennen. Man prüft auf vollständigen Umsatz des Tosylats (UV-aktiv, $R_f = 0.48$)

20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-tert.-butylester (52)

27 g („57 mmol“) Azid **78** werden in 80 mL Ethanol und 80 mL Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 2.0 g Katalysator (5 % Pd/C) wird das Gemisch 12 h unter H₂-Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in 200 mL Essigester aufgenommen und mit einmal 100 mL und zweimal 50 mL 1 N KHSO₄-Lsg extrahiert. Die Wasserphase wird mit K₂CO₃ basisch gemacht und mit einmal 100 mL und zweimal 50 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 15.03 g **52** als rötliches Öl (Ausbeute 70 % über drei Stufen).

$R_f = 0.20$ (Chloroform/Methanol 4:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 3.89$ (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.60-3.42 (m, 20 H, OCH₂CH₂O); 3.37 (t, J = 5.2 Hz, 2H, CH₂CH₂NH₂); 2.72 (m, CH₂NH₂); 1.58 (bs, 2H, NH₂); 1.33 (s, 9H, OtBu). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 169.4$ (C=O₂tBu); 81.1 (OCMe₃); 73.1, 70.4-70.0, 68.8 (OCH₂); 41.5 (CH₂NH₂); 27.8 (CH₃). ESI-MS m/z (%) 340.3 (62) [m-tBu⁺+2H⁺], 396.2 (100) [m+H⁺], 418.2 (7) [m+Na⁺].

20-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-tert.-butylester (79)

Zu Lösung von 9.00 g (22.76 mmol) Amin **52** in 50 mL THF und 50 mL 10 %iger NaHCO₃-Lsg. werden bei 0 °C 6.18 g (23.89 mmol) FmocCl in 50 mL THF innerhalb von 10 min zugetropft. Man lässt noch 30 min bei Raumtemperatur rühren. Das THF wird im Vakuum entfernt und die Reaktionslösung mit 200 mL Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mit zweimal 50 mL ges. NaCl-Lsg gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 13.72 g Rohprodukt **79** als rötliches Öl, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wird.

$R_f = 0.57$ (Chloroform/Methanol 9:1). HPLC (5-100 % in 30 min) $R_t = 20.0$ min. ESI-MS m/z (%) 340.4 (84) [m-Fmoc-tBu⁺+2H⁺], 562.2 (100) [m-tBu⁺+2H⁺], 584.4 (92) [m-tBu⁺+H⁺+Na⁺], 618.1 (11) [m+H⁺], 640.2 (46) [m+Na⁺].

20-(N-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure (50)

13.72 g *tert.*-Butylester **79** werden in 50 mL TFA/Wasser 9/1 gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die TFA wird im Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt in 200 mL Ether und 100 mL DCM aufgenommen und mit fünfmal 70 mL ges. NaHCO₃-Lsg ausgeschüttelt. Das Ausschütteln ist wegen der Gefahr der Bildung einer Suspension vorsichtig durchzuführen. Die vereinigten basischen wässrigen Phasen werden unter kräftigem Rühren mit 3 g KHSO₄ und 6 N HCl (ca. 15 mL) angesäuert, bis das Produkt ausölt. Die wässrige Phase wird mit einer Mischung aus 200 mL Ether und 100 mL DCM extrahiert. Die gesamte Extraktionsprozedur wird wiederholt. Danach wird die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 12.49 g **50** als schwach gelbes Öl (Ausbeute 98 % über zwei Stufen).

$R_f = 0.30$ (Chloroform/Methanol 4:1). ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): $\delta = 9.72$ (bs, 1H, CO₂H); 7.73 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H_{ar}); 7.58 (d, J = 7.0 Hz, 2H, H_{ar}); 7.37 (m, 2H, H_{ar}); 7.29 (m, 2H, H_{ar}); 5.54 (bs, 1H, NH); 4.39 (d, J = 6.8 Hz, 1H, CHCH₂), 4.19 (t, J = 6.8 Hz, 2H, CHCH₂); 4.13 (s, 2H, OCH₂CO₂); 3.62-3.24 (m, 24 H, OCH₂CH₂). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.2$ (C=O₂H); 156.6 (NHCO₂); 143.9, 141.2, 127.6, 127.0, 125.0, 119.8 (C_{ar}); 70.9-70.2, 68.8 66.6 (OCH₂); 47.1 (CH); 40.7 (CH₂NH). HPLC (10-60 % in 30 min) $R_t = 28.1$ min. ESI-MS m/z (%) 340.4 (21) [m-Fmoc+H⁺], 562.4 (6) [m+H⁺], 584.6 (100) [m+Na⁺], 600.4 (55) [m+K⁺], 606.5 (50) [m-H⁺+2Na⁺].

8.3.6 Synthese von N-Fmoc-D-Tyr[OP(OBzl)OH]-OH (66)**N-Fmoc-D-Tyr[OP(OBzl)₂]-OH (65)**

Eine Lösung von 2.64 g (6.53 mmol) N-Fmoc-D-Tyr(OH)-OH in 25 mL THF (wasserfrei) wird mit 660 mg (6.53 mmol) N-Methylmorpholin und 984 mg (6.53 mmol) TBDMSCl versetzt und 15 min gerührt. Zum Reaktionsgemisch werden 4.51 g (13.06 mmol) Dibenzyl-diisopropylphosphoramidit und 1.39 g (18.59 mmol) Tetrazol

zugegeben und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung auf 0 °C gebracht, mit 2.5 mL 70 % *tert.*-Butylhydroperoxid versetzt und weitere 2 h bei 0 °C rühren gelassen. Zum Reduzieren des Oxidationsmittels werden 33 mL Na₂SO₃-Lsg. zugefügt und 30 min rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wird mit dreimal 35 mL Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit dreimal 30 mL 5 %iger KHSO₄-Lsg. und 30 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand an 300 g Kieselgel (Chloroform/Methanol 6:1) chromatographiert. Man erhält 4.07 g **65** als farbloses Öl (Ausbeute 94 %).

HPLC (10-100 % in 30 min) R_t = 25.7 min. **ESI-MS** *m/z* (%) 664.0 (20) [m+H⁺], 686.2 (42) [m+Na⁺], 1326.9 (100) [2m+H⁺], 1348.8 (47) [2m+Na⁺], 1365.1 (15) [2m+K⁺].

N-Fmoc-D-Tyr[OP(OBzl)OH]-OH (66)

4.07 g (6.14 mmol) **65** und 1.84 g (12.28 mmol) NaI werden in 50 mL Aceton gegeben und 2 h unter Rückfluss erhitzt und eine weitere h bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Aceton/Ether 1:1 gewaschen. Das Rohprodukt wird in Wasser gelöst und die Lösung mit 2 N HCl auf pH 1 angesäuert. Der Niederschlag wird mit kaltem Wasser (pH 3) und Ether gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Man erhält 2.8 g **66** als schwachgelben Feststoff (Ausbeute 80 %).

¹H-NMR (250 MHz, DMSO) δ = 12.75 (bs, 1H, CO₂H); 7.86 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H_{ar} Fmoc); 7.72 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, NH); 7.38 (m, 2H, H_{ar} Fmoc), 7.32 (m, 5H, H_{ar} Benzyl), 7.27 (m, 2H, H_{ar} Fmoc), 7.20 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{ar} Tyr), 7.09 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H_{ar} Tyr), 4.92 (d, J = 5.9 Hz, 2H, POCH₂), 4.02-4.22 (m, 4H, H_α, CH₂CH Fmoc), 3.03 (m, 1H, H_{β1}), 2.75 (m, 1H, H_{β2}). **HPLC** (10-100 % in 30 min) R_t = 19.3 min. **ESI-MS** *m/z* (%) 574.0 (5) [m+H⁺], 596.1 (69) [m+Na⁺], (612.1) [m+K⁺], 1147.0 (9) [2m+H⁺], 1169.0 (40) [2m+Na⁺], 1185.1 (100) [2m+K⁺].

8.3.7 S-Tritylcysteamin Hydrochlorid (67)

3.44 g (55.49 mmol) Cysteamin und 10.36 g (39.79 mmol) Tritylalkohol werden in 50 mL TFA gelöst und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird

im Vakuum entfernt und der Rückstand in 200 mL Essigester aufgenommen. Die organische Phase wird mit dreimal 100 mL ges. NaHCO₃-Lsg gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Es werden 30 g Kieselgel zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Kieselgel wird mit Hexan/Essigester 9:1 eluiert, bis im Eluat kein Tritylalkohol mehr nachweisbar ist (DC-Kontrolle), anschließend wird das Produkt mit Chloroform/Methanol 4:1 eluiert. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand wird in *t*BuOH gelöst, mit 1N HCl auf pH 1.5 angesäuert und lyophilisiert. Man erhält 10.86 g **67** als farbloses Pulver (Ausbeute 75 %).

R_f = 0.35 (Chloroform/Methanol 4:1, 10 mL + 3 Tropfen DIPEA). **¹H-NMR** (250 MHz, DMSO): δ = 8.17 (bs, 3H, NH); 7.39-7.28 (m, 15H, H_{ar}); 2.5 (m, 4H, CH₂). **¹³C-NMR** (62.9 MHz, CDCl₃): δ = 144.3, 129.4, 128.0, 126.8 (C_{ar}); 66.9 (C-Ph); 39.1 (CH₂NH₂); 31.4 (CH₂S). **HPLC** (10-100 % in 30 min) R_t = 18.6 min. **ESI-MS** *m/z* (%) 243 (100) [Trt⁺].

8.3.8 p-Trimethylstannylbenzaldehyd (**69**)

Unter Argonatmosphäre wird eine Lösung von 400 mg (1.72 mmol) p-Iodbenzaldehyd, 0.46 mL (2.24 mmol) Hexamethyldizinn und 196 mg (0.17 mmol) Tetrakis(triphenylphosphan)palladium in 50 mL Toluol 2 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel und überschüssiges Hexamethyldizinn werden im Vakuum abdestilliert und der Rückstand an 70 g Kieselgel (Hexan/Essigester 19/1) chromatographiert. Man erhält 346 mg **69** als farbloses Öl (Ausbeute 76 %).

R_f = 0.32 (Hexan/Essigester 19/1). **¹H-NMR** (250 MHz, CDCl₃) δ = 9.95 (s, 1 H, CHO); 7.77 (d, J = 7.8 Hz, 2 H, H_{ar}); 7.65 (d, J = 7.8 Hz, 2 H, H_{ar}); 0.31 (s, 9 H, SnMe₃; d, J = 53.4 Hz, ¹¹⁷Sn(CH₃)₃; d, J = 55.9 Hz, ¹¹⁹SnMe₃). **¹³C-NMR** δ = 192.40 (CHO), 152.14 (s, Sn-C_{ar}; d, J = 403.9 Hz, ¹¹⁷Sn-C_{ar}; d J = 422.5 Hz, ¹¹⁹Sn-C_{ar}), 136.18 (s, CH_{ar}; d, J(¹¹⁷, ¹¹⁹Sn,C) = 35.3 Hz), 135.99 (CCHO), 128.42 (s, CH_{ar}; d, J(¹¹⁷, ¹¹⁹Sn,C) = 43.6 Hz); -9.63 (s, SnMe₃; d, J = 347.9 Hz, ¹¹⁷SnMe₃; d, J = 348.1 Hz, ¹¹⁹SnMe₃). **HPLC** (10-100 % in 30 min) R_t = 25.7 min.

8.4 Synthese der monomeren RGD-Peptide mit Monothiolanker C1 - C5

TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Cys(Trt)-OH belegt. Ggf. wird das Peptid mit den *Spacer*aminosäuren Fmoc-Ahx-OH (C2) nach AAV 2c bzw. Fmoc-Hegas-OH (C3-C5) nach AAV 2c verlängert. Die Fragmentkupplung mit *cyclo*(-RGDfE-) bzw. *cyclo*(-RADfE-) erfolgt nach AAV 9a. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt. Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

C1 *cyclo*(-RGDfE-)-C-OH: Ausbeute 35 %.

HPLC (5-50 % in 30 min) $R_t = 16.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 708.4 (100) $[m+H^+]$, 1415.3 (7) $[2m+H^+]$ 322.4 (17) $[m+H^++K^+]$.

C2 *cyclo*(-RGDfE-)-Ahx-C-OH: Ausbeute 42 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 16.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 821.5 (100) $[m+H^+]$, 859.4 (7) $[m+K^+]$.

C3 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-OH: Ausbeute 18 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 12.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1029.5 (100) $[m+H^+]$.

C4 *cyclo*(-RADfE-)-Hegas-C-OH: Ausbeute 33 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 17.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1043.6 (100) $[m+H^+]$.

C5 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas₂-C-OH: Ausbeute 33 %.

HPLC (5-50, 30 min) $R_t = 21.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1306.7 (10) $[m-OEt+H^+]$, 1350.7 (100) $[m+H^+]$.

8.5 Synthese der monomeren RGD-Peptide mit saurem Anker

TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Glu(O*t*Bu)-OH bzw. mit Fmoc-Ser(OP(OBzl)OH)-OH belegt. Der saure Anker wird durch Ankuppeln von Fmoc-

Glu(OtBu)-OH (AAV 2a, Doppelkupplung) bzw. Fmoc-Ser(OP(OBzl)OH)-OH (AAV 2d, Doppelkupplung) aufgebaut. Bei Anwesenheit von Phosphoserin wird die Zeit für die Fmoc-Entschützung auf zweimal 5 min reduziert. Zur Synthese der Verbindungen **P1-P5** wird mit der *spacer*-Aminosäure Fmoc-Hegas-OH nach AAV 2c verlängert. Vor der Fragmentkupplung mit *cyclo(-RGDfE-)* nach AAV 9a wird das Harz dreimal 1 min mit 30 % Triethylamin in NMP gewaschen. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt.

Die Cyclopeptide **P18-P20** werden als lineare Peptide H-D(OtBu)fS(OP(OBzl)OH)R(Pbf)G-OH, H-D(OtBu)y(OP(OBzl)OH)VR(Pbf)G-OH bzw. H-D(OtBu)fy(OP(OBzl)OH)Y(OPO(NMe₂)₂)R(Pbf)G-OH am TCP-Harz aufgebaut, nach AAV 4a vom Harz abgespalten, nach AAV 5 cyclisiert und nach AAV 7b entschützt. Im Falle des Tyr(OPO(NMe₂)₂)-Derivats wird die Entschützung auf 12 h verlängert.

Sämtliche Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure. In einigen Fällen wurden die HPLC-Retentionszeiten auf den Anlagen (B) und (C) mithilfe der semipräp.-Säulen ermittelt. Die *m/z*-Werte im ESI wurden z. T. im Negativ-Modus bestimmt, wobei die Masse negativ geladene Ionen (z. B. Molekülmasse minus Proton, *m-H*⁺) detektiert wird.

P1 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EEEE-OH*: Ausbeute 31 %.

HPLC (5-50, 30 min) R_t = 18.1 min. **ESI-MS** *m/z* (%) 797.9 (12) [*m+H*⁺+Na⁺]/2, 1571.8 (100) [*m+H*⁺]. **MALDI** 1571.6 [*m+H*⁺].

P2 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EEEE@S-OH*: Ausbeute 7 %.

HPLC (10-50, 20 min) (B) R_t = 17.4 min. **ESI-MS** *m/z* (%) 1607.7 (100) [*m-H*⁺], 1629.7 (14) [*m-2H*⁺+Na⁺]. **MALDI** 1609.5 [*m+H*⁺].

P3 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EEE@S@S-OH*: Ausbeute 5 %.

HPLC (15-40, 20 min) (B) R_t = 14.9 min. **ESI-MS** *m/z* (%) 1646.1 (100) [*m-H*⁺], 1670.0 (44) [*m-2H*⁺+24⁺]. **MALDI** 1647.4 [*m+H*⁺].

P4 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EE@S@S@S-OH*: Ausbeute 5 %.

HPLC (15-40, 20 min) (B) $R_t = 15.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1708.0 (100) $[m-2H^+ + 24^+]$. **MALDI** 1685.4 $[m+H^+]$.

P5 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-E@S@SEE-OH*: Ausbeute 4 %.

HPLC (10-50, 30 min) (B) $R_t = 16.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1645.9 (89) $[m-H^+]$, 1669.9 (100) $[m-2H^+ + 24^+]$. **MALDI** 1647.3 $[m+H^+]$.

P6 *cyclo(-RGDfE-)-EE@SE-OH* (Nebenprodukt der versuchten Synthese von *cyclo(-RGDfE-)-Hegas- E@SE@SE -OH*): Ausbeute 4 %.

HPLC (15-30, 20 min) (B) $R_t = 13.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1157.6 (100) $[m-H^+]$, 1179.6 (20) $[m-2H^+ + Na^+]$.

P7 *cyclo(-RGDfE-)-E@SE@SE-OH* (Nebenprodukt der versuchten Synthese von *cyclo(-RGDfE-)-Hegas- E@SE@SE -OH*): Ausbeute 8 %.

HPLC (15-30, 20 min) (B) $R_t = 11.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1228.5 (10) $[m-@+H^+]$, 1326.4 (100) $[m+H^+]$, 1350.3 (24) $[m+24^+]$.

P8 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EE@S-OH* (Nebenprodukt der versuchten Synthese von *cyclo(-RGDfE-)-Hegas- @SE@SE@S -OH*): Ausbeute 7 %.

HPLC (5-40, 20 min) (B) $R_t = 16.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1349.7 (100) $[m-H^+]$, 1371.7 (10) $[m-2H^+ + Na^+]$.

P9 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-@SE@SEX-OH* (Nebenprodukt der versuchten Synthese von *cyclo(-RGDfE-)-Hegas- @SE@SE@S -OH*): Ausbeute 4 %.

HPLC (5-40, 20 min) (B) $R_t = 15.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1672.6 (100) $[m+H^+]$, 1696.6 (45) $[m+24^+]$.

P10 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EE@S@SX-OH* (Nebenprodukt der Synthese von *cyclo(-RGDfE-)-Hegas- EE@S@S@S-OH*): Ausbeute 2 %.

HPLC (15-40, 25 min) (B) $R_t = 14.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1671.2 (100) $[m-H^+]$, 1695.1 (31) $[m-2H^+ + 24^+]$.

P11 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-EEEEeEeEEEE-OH*: Ausbeute 21 %.

HPLC (5-90, 30 min) $R_t = 11.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1109.7 (20) $[m+2H^+]/2$, 1120.8 (100) $[m+H^+ + Na^+]/2$, 1128.8 (67) $[m+H^+ + K^+]/2$, 1139.7 (27) $[m+Na^+ + K^+]/2$.

P12 *cyclo(-RADfE-)-Hegas-EEEEeEeEEEE-OH*: Ausbeute 29 %.

HPLC (5-90, 30 min) $R_t = 11.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1116.7 (15) $[m+2H^+]/2$, 1127.9 (100) $[m+H^++Na^+]/2$, 1135.9 (47) $[m+H^++K^+]/2$, 1147.6 (17) $[m+Na^++K^+]$.

P13 cyclo(-RGDfE)-E@SE@S-OH: Ausbeute 7 %.

HPLC (10-60, 20 min) $R_t = 12.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1001.4 (8) $[m-2@+H^+]$, 1099.3 (15) $[m-@+H^+]$, 1197.2 (100) $[m+H^+]$, 1221.1 (34) $[m+24^+]$.

P14 cyclo(-RGDfE)-@SE@S-OH: Ausbeute 7 %.

HPLC (10-50, 30 min) (C) $R_t = 12.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 872.3 (20) $[m-2@+H^+]$, 970.2 (22) $[m-@+H^+]$, 1068.2 (100) $[m+H^+]$, 1092.1 (33) $[m+24^+]$.

P15 cyclo(-RGDfE)-G@SE@S-OH: Ausbeute 4 %.

HPLC 10-45, 30 min) (B) $R_t = 12.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 929.3 (16) $[m-2@+H^+]$, 1027.3 (16) $[m-@+H^+]$, 1125.2 (100), 1149.1 (24) $[m+24^+]$.

P16 cyclo(-RGDfE)-E@S@S-OH: Ausbeute 8 %.

HPLC (10-60, 30 min) (B) $R_t = 12.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 970.2 (9) $[m-@+H^+]$, 1068.2 (17) $[m+H^+]$, 1092.1 (17) $[m+24^+]$, 1106.1 (9) $[m+K^+]$.

P17 cyclo(-RGDfE)-@S@S-OH: Ausbeute 8 %.

HPLC (10-60, 30 min) (B) $R_t = 11.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 743.4 (10) $[m-2@+H^+]$, 841.3 (16) $[m-@+H^+]$, 939.2 (100) $[m+H^+]$, 957.2 (47) $[m+H_2O+H^+]$.

P18 cyclo(-RGDf@S-): Ausbeute 8 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 10.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 545.4 (27) $[m-@+H^+]$, 643.3 (100) $[m+H^+]$, 665.3 (25) $[m+Na^+]$, 1285.3 (19) $[2m+H^+]$.

P19 cyclo(-RGD@yV-): Ausbeute 11 %.

HPLC (5-50, 30 min) $R_t = 9.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 355.4 (21) $[m+H^++K^+]/2$, 671.4 (100) $[m+H^+]$.

P20 cyclo(-RGD@y@Y-): Ausbeute 11 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 7.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 815.3 (100) $[m+H^+]$, 837.3 (35) $[m+Na^+]$, 853.3 (16) $[m+K^+]$.

P22 H-@SE@S-OH: Ausbeute 33 %.

HPLC (5-60, 30 min) (B) $R_t = 5.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 482.1 (100) $[m+H^+]$, 963.0 (55) $[2m+H^+]$, 1001.1 (24) $[2m+K^+]$, 1444.0 (23) $[3m+H^+]$.

P23 H-EEEEeEeEEEE-OH: Ausbeute 37 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 7.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1309.8 (100) $[m+H^+]$, 1331.3 (22) $[m+Na^+]$.

8.6 Synthese der monomeren RGD-Peptide mit Polythiolanker

TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Cys(Trt)-OH belegt. Der Cysteinanker wird mit Fmoc-Cys(Trt)-OH bzw Fmoc-Gly-OH nach AAV 2a verlängert. Danach wird mit den *Spacer*amino-säuren Fmoc-Hegas-OH bzw. Fmoc-Ahx-OH nach AAV 2c verlängert. Die Fragmentkupplung mit *cyclo*(-RGDfE-) bzw. *cyclo*(-RADfE-) erfolgt nach AAV 9a. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt. Die Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt, wobei auch einigen Verbindungen mit enantiomerisierten Cysteinen im Anker isoliert werden können. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

S1 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-C-OH: Ausbeute 18 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 15.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1029.5 (100) $[m+H^+]$.

S2 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CC-OH: Ausbeute 14 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 16.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1132.5 (100) $[m+H^+]$.

S3 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-cC-OH: (Nebenprodukt von **S2**) Ausbeute 4 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 16.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 132.5 (100) $[m+H^+]$.

S4 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CCC-OH: Ausbeute 34 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 16.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1235.5 (100) $[m+H^+]$.

S5 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CcC-OH: (Nebenprodukt von **S4**) Ausbeute 5 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 17.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1235.5 (100) $[m+H^+]$.

S6 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-cCC-OH: (Nebenprodukt von **S4**) Ausbeute 4 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 17.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1235.5 (100) $[m+H^+]$.

S7 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CCCC-OH: Ausbeute 17 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 17.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1338.5 (100) $[m+H^+]$.

S8 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CCCC-OH (Nebenprodukt von **S7**, Gemisch Cysteinisomere): Ausbeute 12 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 17.1 - 17.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1338.5 (100) $[m+H^+]$.

S9 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CGC-OH: Ausbeute 14 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 15.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1189.5 (100) $[m+H^+]$.

S10 cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CGCGC-OH: Ausbeute 12 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 15.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1349.5 (100) $[m+H^+]$.

S11 cyclo(-RGDfE-)-Ahx-CCC-OH: Ausbeute 11 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 15.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1027.4 (100) $[m+H^+]$.

S12 cyclo(-RGDfE-)-Ahx-CCC-OH (Nebenprodukt von **S11**, Gemisch Cysteinisomere): Ausbeute 6 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 15.8-16.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1027.4 (100) $[m+H^+]$.

8.7 Synthese der multimeren RGD-Peptide ohne Anker

Zur Synthese der monomeren Verbindungen **M1-M3** und **M11** wird TCP-Harz nach AAV 1 mit Fmoc-Hegas-OH belegt. Ggf. wird mit Fmoc-Hegas-OH nach AAV 2c einmal (**M2**) bzw. zweimal (**M3**) verlängert. Die Fragmentkupplung mit *cyclo(-RGDfE-)* bzw. *cyclo(-RADfE-)* erfolgt nach AAV 9a. Die Peptide werden nach AAV 4b unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen vom Harz abgespalten. Die

Rohprodukte werden als Edukt für die Fragmentkupplung in Kap. 8.8 eingesetzt oder nach AAV 7b entschützt und durch semipräparative HPLC gereinigt.

Zur Synthese der verzweigten Verbindungen wird TCP-Harz nach AAV 1 mit Bis-Teoc-Dab-OH belegt. Die Teoc-Schutzgruppen werden nach AAV 12a entschützt. Zum Aufbau der tetrameren Verzweigung wird mit Bis-Teoc-Dab-OH nach AAV 2b gekuppelt und anschließend nach AAV 12b entschützt. Die oktamere Verzweigung wird durch nochmaliges Kuppeln von Bis-Teoc-Dab-OH nach AAV 2b synthetisiert und nach AAV 12c entschützt.

Die *Spacer*aminosäure Fmoc-Hegas-OH wird nach AAV 2c eingeführt; entsprechend Kaiser-Test und HPLC-MS-Analytik sind Doppelkupplungen durchzuführen. Für die längeren Homologe wird die Fmoc-Hegas-Kupplung noch einmal (**M5**, **M8**) bzw. zweimal (**M6**, **M9**) wiederholt.

Die Fragmentkupplung mit *cyclo(-RGDfE-)* bzw. *cyclo(-RADfE-)* erfolgt nach AAV 9a; entsprechend HPLC-MS-Analytik sind Doppelkupplungen durchzuführen. Die Peptide werden nach AAV 4b unter Erhalt der permanenten Schutzgruppen vom Harz abgespalten und durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Peptide werden als Edukt für die Fragmentkupplung in Kap. 8.8 eingesetzt oder nach AAV 7b entschützt und durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

M1* *cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas-OH*: Ausbeute 47 % (Rohprodukt).

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 20.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1178.5 (63) $[m-tBu^{++}+2H^+]$, 1234.5 (100) $[m+H^+]$, 1256.5 (57) $[m+Na^+]$, 1278.4 (39) $[m-H^++2Na^+]$.

M1 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-OH*: Ausbeute 22 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 16.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 926.8 (100) $[m+H^+]$.

M2* *cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas₂-OH*: Ausbeute 38 % (Rohprodukt).

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 20.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 761.5 (36) $[m-tBu^{++}+2H^++Na^+]/2$, 772.6 (55) $[m-tBu^{++}+H^++2Na^+]/2$, 1555.5 (60) $[m+H^+]$, 1577.5 (30) $[m+Na^+]$, 1599.5 (100) $[m-H^++2Na^+]$.

M2 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-OH*: Ausbeute 17 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 17.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1248.1 (100) $[m+H^+]$, 1270 (10) $[m+Na^+]$.

M3* cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas₃-OH: Ausbeute 42 % (Rohprodukt).

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 19.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 911.2 (50) $[m-tBu^++2H^++Na^+]/2$, 1788.9 (25) $[m-tBu^++2H^+]$, 1876.9 (100) $[m+H^+]$.

M3 cyclo(-RGDfE-)-Hegas₃-OH: Ausbeute 17 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 18.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 637.2 (61) $[2m+3H^++2Na^+]/5$, 796.3 (86) $[m+H^++Na^+]/2$, 1568 (100) $[m+H^+]$, 1590.9 (13) $[m+Na^+]$.

M4* {cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas}₂-Dab-OH: Ausbeute 38 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 24.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 861.7 (75) $[m-2tBu^++4H^++Na^+]/3$, 867.0 (65) $[m-2tBu^++4H^++K^+]/3$, 1281.4 (100) $[m-2tBu^++4H^+]/2$, 1308.8 (67) $[m-tBu^++3H^+]/2$, 1336.8 (60) $[m+2H^+]/2$, 1355.9 (81) $[m+H^++K^+]$, 1369.8 (81) $[m-2H^++3Na^+]$.

M4 [cyclo(-RGDfE-)-Hegas]₂-Dab-OH: Ausbeute 14 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1029.2 (100) $[m+2H^+]/2$, 1007.2 (3) $[m-OEt+2H^+]/2$.

M5* {cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas₂}₂-Dab-OH: Ausbeute 30 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 23.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1068.6 (55) $[m-2tBu+5H^+]/5$, 1658.2 (100) $[m+2H^+]/2$.

M5 [cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂]₂-Dab-OH: Ausbeute 7 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 14.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 900.6 (100), $[m+3H^+]/3$, 908.0 (85) $[m+2H^++Na^+]/3$, 913.3 (35) $[m+2H^++K^+]/3$, 1350.0 (61) $[m+2H^+]/2$.

M6* {cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas₃}₂-Dab-OH: Ausbeute 11 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 21.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 962.5 (25) $[m-2tBu^++6H^+]/4$, 1283.4 (32) $[m+3H^+]/3$, 1980.5 (10) $[m+2H^+]/2$.

M6 [cyclo(-RGDfE-)-Hegas₃]₂-Dab-OH: Ausbeute 5 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 836.6 (100) $[m+4H^+]/4$, 842.0 (49) $[m+3H^++Na^+]/4$, 1114.8 (50) $[m+3H^+]/3$, 1122.3 (27) $[m+2H^++Na^+]/3$, 1671.4 (41) $[m+2H^+]/2$.

M7* $\{\{cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas\}_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 23 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 27.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1332.6 (100) $[m-4tBu^++8H^+]/4$, 1346.8 (34) $[m-3tBu^++7H^+]/4$, 1850.9 (14) $[m+3H^+]/3$.

M7 $\{[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 8 %.

HPLC (5-50, 30 min) $R_t = 21.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 871.9 (10) $[m+4H^++K^+]/5$, 1069.1 (14) $[m-OEt+4H^+]/4$, 1080.2 (100) $[m+4H^+]/4$, 1439.7 (11) $[m+3H^+]/3$.

M8* $\{\{cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas\}_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 3 %.

HPLC (30-100, 30 min) $R_t = 18.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1323.0 (100) $[m-4tBu^++9H^+]/5$.

M8 $\{[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 2 %.

HPLC (10-100, 30 min) $R_t = 12.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 934.8 (32) $[m+6H^+]/6$, 1103.9 (49) $[m-2EtO+5H^+]/5$, 1121.5 (71) $[m+5H^+]/5$, 1126.0 (45) $[m+4H^++Na^+]/5$, 1379.5 (77) $[m-2OEt+4H^+]/4$, 1390.5 (47) $[m-OEt+4H^+]/4$, 1401.5 (100) $[m+4H^+]/4$.

M9* $\{\{cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas\}_3\}_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 3 %.

HPLC (40-100, 30 min) $R_t = 19.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1317.1 (100) $[m-4tBu^++10H^+]/6$, 1580.5 (60) $[m-4tBu+9H^+]/5$.

M9 $\{[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]_3\}_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 1 %.

HPLC (10-100, 30 min) $R_t = 13.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 987.8 (48) $[m+6H^++Na^+]/7$, 1149.0 (100) $[m+6H^+]/6$, 1378.5 (73) $[m+5H^+]/5$, 1722.9 (20) $[m+4H^+]/4$.

M10* $\{\{cyclo[-R(Pbf)GD(OtBu)fE-]-Hegas\}_2-Dab\}_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute: 4 %.

HPLC (50-100, 30 min) $R_t = 22.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1404.9 $[m+8H^+]/8$, 1599.8 $[m-2tBu^++7H^+]/5$, 1885.1 $[m+6H^+]/6$.

M10 $\{[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]_2-Dab\}_2-Dab\}_2-Dab-OH$: Ausbeute 2 %, Nebenfraktionen 0.7 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1094.9 (26) $[m-2OEt+8H^+]/8$, 1106.0 (47) $[m+8H^+]/8$, 1251.0 (54) $[m-2OEt+7H^+]/7$, 1257.3 (39) $[m-OEt+7H^+]/7$, 1263.7 (100) $[m+7H^+]/7$, 1459.3 (34) $[m-2OEt+6H^+]/6$, 1474.0 (77) $[m+6H^+]/6$.

M11 cyclo(-RADfE-)-Hegas-OH: Ausbeute 28 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 11.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 940 (100) $[m+H^+]$.

M12 [cyclo(-RADfE-)-Hegas]₂-Dab-OH: Ausbeute 18 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 17.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1043.5 (100) $[m+2H^+]/2$, 1054.2 (12) $[m+H^++Na^+]/2$.

M13 {[cyclo(-RADfE-)-Hegas]₂-Dab}₂-Dab-OH: Ausbeute 3 % (geschützt 10 %).

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 883.2 (11) $[m+4H^++K^+]/5$, 1072.0 (10) $[m-2OEt+4H^+]/4$, 1083.1 (21) $[m-OEt+4H^+]/4$, 1094.2 (100) $[m+4H^+]/4$, 1105.0 (10) $[m+2H^++2Na^+]/4$, 1458.3 (7) $[m+3H^+]/3$.

8.8 Synthese der multimeren RGD-Peptide mit Monothiolanker

Die teilgeschützten Peptide **M1*-M9*** aus Kap. 8.7 werden in Lösung nach AAV 10a mit S-Tritylcysteamin gekuppelt. Die Lösungsmittel werden im Vakuum entfernt und die Peptide nach AAV 7 entschützt. Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die eingesetzten teilgeschützten Peptide **M1*-M9***.

M1C cyclo(-RGDfE-)-Hegas-N-mercaptoethyl: Ausbeute 9 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 16.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 985.6 (100) $[m+H^+]$, 1007.4 (10) $[m+Na^+]$.

M2C cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-N-mercaptoethyl: Ausbeute 32 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 12.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1219.0 (9) $[m+2OEt+H^+]$, 1307.0 (100) $[m+H^+]$, 1328.9 (11) $[m+Na^+]$.

M3C *cyclo(-RGDfE)-Hegas₃-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 18 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 12.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 814.8 (16) $[m-2OEt+2H^+]/2$, 826.0 (37) $[m+2H^+]/2$, 1540.1 (16) $[m-2OEt+H^+]$, 1628.2 (100) $[m+H^+]$.

M4C *[cyclo(-RGDfE)-Hegas₂]-Dab-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 28 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 18.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1058.5 (100) $[m+2H^+]/2$, 1069.2 (8) $[m+H^++Na^+]$.

M5C *[cyclo(-RGDfE)-Hegas₂]-Dab-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 22 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 13.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 920.2 (15) $[m+3H^+]/3$, 927.5 (55) $[m+2H^++Na^+]/3$, 932.8 (20) $[m+2H^++K^+]/3$, 1379.4 (100) $[m+2H^+]/2$, 1390.5 (20) $[m+H^++Na^+]/2$.

M6C *[cyclo(-RGDfE)-Hegas₃]-Dab-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 8 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 13.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 862.2 (53) $[m+2H^++Na^+]/4$, 1141.8 (100) $[m+2H^++Na^+]/3$, 1156 (92) $[m+H^++2Na^+]/3$, 1700.7 (53) $[m+2H^+]/2$.

M7C *{[cyclo(-RGDfE)-Hegas₂]-Dab}₂-Dab-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 48 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 19.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 883.8 (9) $[m+4H^++K^+]/5$, 1072.9 (12) $[m+2OEt+4H^+]/4$, 1094.9 (100) $[m+4H^+]/4$, 1459.4 (10) $[m+3H^+]/3$.

M8C *{[cyclo(-RGDfE)-Hegas₂]-Dab}₂-Dab-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 12 %.

HPLC (10-60, 30 min) $R_t = 18.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1137.5 (16) $[m+4H^++Na^+]/5$, 1404.9 (24) $[m+OEt+4H^+]/4$, 1416.0 (100) $[m+4H^+]/4$, 1887.3 (8) $[m+3H^+]/3$.

M9C *{[cyclo(-RGDfE)-Hegas₃]-Dab}₂-Dab-N-mercaptoethyl*: Ausbeute 2 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 13.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1159.2 (10) $[m+6H^+]/6$, 1372.8 (21) $[m-2OEt+5H^+]/5$, 1390.5 (100) $[m+5H^+]/5$, 1715.9 (20) $[m-2OEt+4H^+]/4$, 1737.8 (18) $[m+4H^+]/4$.

8.9 Synthese der multimeren RGD-Peptide mit Tricysteinanker

TCP-Harz nach AAV 1 mit Fmoc-Cys(Trt)-OH belegt, woran zweimal Fmoc-Cys(Trt)-OH nach AAV 2c gekuppelt werden. Zur Synthese der monomeren Verbindungen (**T1-T3** und **T11**) wird mit Fmoc-Hegas-OH nach AAV 2c verlängert. Für die längeren Homologen wird die Fmoc-Hegas-Kupplung noch einmal (**T2**) bzw. zweimal (**T3**) wiederholt. Die Fragmentkupplung mit *cyclo(-RGDfE-)* bzw. *cyclo(-RADfE-)* erfolgt nach AAV 9b. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt und durch semipräparative HPLC gereinigt.

Zur Synthese der dimeren Verbindungen wird an den Tricysteinanker Fmoc-Lys(Fmoc)-OH nach AAV 2a gekuppelt. Zum Aufbau der tetrameren Verzweigung wird daran eine zweite Generation Fmoc-Lys(Fmoc)-OH und zum Aufbau der oktamere Verzweigung eine dritte Generation Fmoc-Lys(Fmoc)-OH nach AAV 2a jeweils als Doppelkupplung angeknüpft. Die *Spacer*aminosäure Fmoc-Hegas-OH wird nach AAV 2c eingeführt; entsprechend Kaiser-Test und HPLC-MS-Analytik sind Doppelkupplungen durchzuführen. Für die längeren Homologen wird die Fmoc-Hegas-Kupplung noch einmal (**T5**, **T8**) bzw. zweimal (**T6**, **T9**) wiederholt.

Die Fragmentkupplung mit *cyclo(-RGDfE-)* bzw. *cyclo(-RADfE-)* erfolgt nach AAV 9b. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt.

Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt, die höheren Analoga **T8-T10** zweimal. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

T1 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-CCC-OH*: Ausbeute 34 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1235.6 (100) $[m+H^+]$.

T2 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-CCC-OH*: Ausbeute 9 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 19.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 790.3 (25) $[m+H^++Na^+]/2$, 1512.7 (8) $[m-OEt+H^+]$, 1556.7 (100) $[m+H^+]$.

T3 cyclo(-RGDfE-)-Hegas₃-CCC-OH: Ausbeute 12 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 939.8 (100) $[m+2H^+]/2$, 950.9 (68) $[m+H^+Na^+]/2$, 1833.8 (14) $[m-OEt+H^+]$, 1877.8 (83) $[m+H^+]$.

T4 cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-K-CCC-OH: Ausbeute 30 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 19.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 765.5 (6) $[m+2H^+Na^+]/3$, 1114.4 (7) $[m-OEt+2H^+]/2$, 1136.5 (100) $[m+2H^+]/2$.

T5 cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-K-CCC-OH: Ausbeute 18 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 20.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 972.0 (29) $[m+3H^+]/3$, 979.7 (72) $[m+2H^+Na^+]/3$, 985.0 (34) $[m+2H^+K^+]/3$, 1413.4 (28) $[m-2OEt+2H^+]$, 1457.5 (100) $[m+2H^+]/2$.

T6 cyclo(-RGDfE-)-Hegas₃-K-CCC-OH: Ausbeute 18 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 21.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 890.2 (100) $[m+4H^+]/4$, 901.3 (50) $[m+OEt+4H^+]/4$, 1186.4 (49) $[m+3H^+]/3$, 1193.7 (41) $[m+2H^+Na^+]/3$, 1778.8 (47) $[m+2H^+]/2$.

T7 {cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-K}₂-K-CCC-OH: Ausbeute 20 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 877.7 (12) $[m+3H^++2Na^+]$, 1064.9 (26) $[m-2OEt+4H^+]/4$, 1076.0 (21) $[m-OEt+4H^+]/4$, 1086.9 (100) $[m+4H^+]/4$, 1096.7 (16) $[m+OEt+4H^+]/4$, 1448.7 (17) $[m+3H^+]/3$.

T8 {cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-K}₂-K-CCC-OH: Ausbeute 4 % und 5 % angereicherte Nebenfraktionen.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1126.8 (61) $[m+5H^+]/5$, 1134.4 (40) $[m+OEt+5H^+]/5$, 1386.2 (75) $[m-2OEt+4H^+]/4$, 1397.1 (62) $[m-OEt+4H^+]/4$, 1408.0 (100) $[m+4H^+]/4$, 1419.0 (25) $[m+OEt+4H^+]/4$.

T9 {cyclo(-RGDfE-)-Hegas₃-K}₂-K-CCC-OH: Ausbeute 4 % und 3 % angereicherte Nebenfraktionen.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 17.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 988.6 (50) $[m+7H^+]/7$, 1153.1 (59) $[m+6H^+]/6$, (61) $[m+5H^++Na^+]/6$, 1366.2 (100) $[m-2OEt+5H^+]/5$, 1375.0 (63) $[m-OEt+5H^+]/5$, 1383.5 (75) $[m+5H^+]/5$, 1388.6 (52) $[m+4H^++Na^+]/5$, 1707.4 (26) $[m-2OEt+4H^+]$, 1729.2 (20) $[m+4H^+]/4$.

T10 $\{[cyclo(-RGDfE-)-Hegas]_2-K\}_2-K_2-K-CCC-OH$: Ausbeute 2 % und 2 % angereicherte Nebenfraktionen.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1056.7 (22) $[m-OEt + 8H^+]/8$, 1062.2 (100) $[m+8H^+]/8$, 1207.4 (18) $[m-OEt+7H^+]/7$, 1213.6 (64) $[m+7H^+]/7$, 1415.3 (8) $[m+6H^+]/6$.

T11 $cyclo(-RADfE-)-Hegas-CCC-OH$: Ausbeute 40 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1249.7 (100) $[m+H^+]$, 1271.5 (7) $[m+Na^+]$.

T12 $\{[cyclo(-RADfE-)-Hegas]_2-K\}_2-K-CCC-OH$: Ausbeute 33 %.

HPLC (10-80, 30 min) $R_t = 14.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 888.7 (9) $[m+2OEt+5H^+]/5$, 1079.1 (26) $[m-2OEt+4H^+]/4$, 1089.8 (16) $[m-OEt+4H^+]/4$, 1101.0 (100) $[m+4H^+]/4$, 1467.3 (22) $[m+3H^+]/3$.

8.10 Synthese der Aminoxy-RGD-Peptide für die Tumordiagnostik

TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Dpr[Aoa(Boc)]-OH belegt. Ggf. wird das Peptid mit den *Spacer*aminosäuren Fmoc-Ahx-OH (**A2**) nach AAV 2c bzw. Fmoc-Hegas-OH (**A3**, **A4**) nach AAV 2c verlängert. Die Fragmentkupplung mit *cyclo(-RGDfE-)* bzw. *cyclo(-RADfE-)* erfolgt nach AAV 9b. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt. Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

A1 *cyclo(-RGDfE-)-Dpr(Aoa)-OH*: Ausbeute 55 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 9.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 764.3 (100) $[m+H^+]$, 786.3 (12) $[m+Na^+]$, 802.2 (19) $[m+K^+]$.

A2 *cyclo(-RGDfE-)-Ahx-Dpr(Aoa)-OH*: Ausbeute 42 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 12.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 877.5 (100) $[m+H^+]$.

A3 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-Dpr(Aoa)-OH*: Ausbeute 44 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 14.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1085.6 (100) $[m+H^+]$.

A4 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-Dpr(Aoa)-OH*: Ausbeute 27 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 16.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1362.8 (11) $[m-OEt+H^+]$, 1406.7 (100) $[m+H^+]$.

A5 *cyclo(-RADfE-)-Dpr(Aoa)-OH*: Ausbeute 43 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 9.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) .

8.11 Synthese der Konjugationsprodukte

Die Aminoxypeptide werden nach AAV 13 mit p-Iodbenzaldehyd bzw. p-Trimethylstannylbenzaldehyd umgesetzt und durch Etherfällung gereinigt.

A1I *cyclo(-RGDfE-)-Dpr[Hya(O-p-Iodbenzaldehydoxim)]*: Ausbeute 94 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 19.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 978.3 (100) $[m+H^+]$.

A2I *cyclo(-RGDfE-)-Ahx-Dpr[Hya(O-p-Iodbenzaldehydoxim)]*: Ausbeute 99 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 18.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1091.4 (100) $[m+H^+]$.

A3I *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-Dpr[Hya(O-p-Iodbenzaldehydoxim)]*: Ausbeute 72 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 18.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1299.5 (100) $[m+H^+]$.

A4I *cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-Dpr[Hya(O-p-Iodobenzaldehydoxim)]*: Ausbeute 53 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 18.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 811.0 (18) $[m+2H^+]/2$, 822.1 (25) $[m+H^++Na^+]/2$, 1620.6 (100) $[m+H^+]$.

A1S *cyclo(-RGDfE-)-Dpr[Hya(O-p-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]*: Ausbeute 83 %. **HPLC** (5-80, 30 min) $R_t = 22.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1016.3 (100) $[m+H^+]$.

A2S *cyclo(-RGDfE-)-Ahx-Dpr[Hya(O-p-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]*:

Ausbeute 28 %. **HPLC** (5-80, 30 min) $R_t = 22.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1129.4 (100) $[m+H^+]$.

A3S *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-Dpr[Hya(O-p-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]*:

Ausbeute 35 %. **HPLC** (5-80, 30 min) $R_t = 22.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1337.5 (100) $[m+H^+]$.

A4S *cyclo(-RGDfE-)-Hegas₂-Dpr[Hya(O-p-Trimethylstannylbenzaldehydoxim)]*:

Ausbeute 71 %. **HPLC** (5-80, 30 min) $R_t = 22.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1658.7 (100) $[m+H^+]$.

8.12 Synthese der heterodimeren RGD-Peptide mit Thiolanker

TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Arg(Pbf)-OH (**H1**, **H4**, **H8**), Fmoc-Ala-OH (**H2**), Fmoc-Ile-OH (**H3**, **H6**), Fmoc-Val-OH (**H5**, **H9**, **H12**), Fmoc-Pro-OH (**H7**), Fmoc-Lys(Boc)-OH (**H10**) bzw. Fmoc-Gly-OH (**H11**) belegt. Die Adhäsionssequenzen wurden mit Fmoc-Aminosäuren nach AAV 2a aufgebaut. Folgende Seitenkettenschutzgruppen wurden verwendet: Trt (His, Asn, Gln), OtBu (Asp, Glu, Hyp, Ser, Tyr), Boc (Lys) und Pbf (Arg).

Die Peptide werden mit der *Spacer*amino­säure Fmoc-Hegas-OH nach AAV 2c verlängert, mit Fmoc-Cys(Trt)-OH nach AAV 2c gekuppelt und nochmals mit Fmoc-Hegas-OH nach AAV 2c verlängert. Die Fragmentkupplung mit *cyclo*(-RGDfE-) erfolgt nach AAV 9b. Die Peptide werden nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt. Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

H1 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-YIGSR-OH: Ausbeute 27 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 964.6 (100) $[m+2H^+]/2$, 1927.9 (5) $[m+H^+]$.

H2 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-FHRRIKA-OH: Ausbeute 31 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 14.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 566.0 (26) $[m+4H^+]/4$, 754.3 (100) $[m+3H^+]/3$, 1130.6 (88) $[m+2H^+]/2$.

H3 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-PPRARI-OH: Ausbeute 28 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 14.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 681.6 (100) $[m+3H^+]/3$, 1021.4 (78) $[m+2H^+]/2$.

H4 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-GFOGER-OH: Ausbeute 26 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 671.1 (7) $[m+3H^+]/3$, 1006.2 (100) $[m+2H^+]/2$.

H5 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-IKVAV-OH: Ausbeute 38 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.0$ min. **ESI-MS** m/z (%) 931.5 (100) $[m+2H^+]/2$, 942.5 (12) $[m+H^++Na^+]$, 1860.9 (12) $[m+H^+]$.

H6 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-HAVDI-OH: Ausbeute 36 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 943.8 (100) $[m+2H^+]/2$, 1885.8 (12) $[m+H^+]$.

H7 *cyclo*(-RGDfE-)-Hegas-C-Hegas-GRGDSP-OH: Ausbeute 4 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 14.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 641.0 (7) $[m+3H^+]/3$, 960.9 (100) $[m+2H^+]/2$, 971.8 (13) $[m+H^+Na^+]$, 1919.8 (2) $[m+H^+]$.

H8 cyclo(-RGDfE)-Hegas-C-Hegas-RKKRRQRRR-OH: Ausbeute 23 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 12.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 446.5 (38) $[m+6H^+]/6$, 535.6 (58) $[m+5H^+]/5$, 669.2 (64) $[m+4H^+]/4$, 891.7 (100) $[m+3H^+]/3$, 1336.7 (18) $[m+2H^+]/2$.

H9 cyclo(-RGDfE)-Hegas-C-Hegas-KQAGDV-OH: Ausbeute 24 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 14.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 975.4 (100) $[m+2H^+]/2$, 986.6 (13) $[m+H^+Na^+]/2$, 1948.9 (8) $[m+H^+]$.

H10 cyclo(-RGDfE)-Hegas-C-Hegas-KRSK-OH: Ausbeute 33 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 13.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 463.7 (80) $[m+4H^+]/4$, 617.8 (88) $[m+3H^+]/3$, 925.9 (100) $[m+2H^+]/2$, 1850.9 (8) $[m+H^+]$.

H11 cyclo(-RGDfE)-Hegas-C-Hegas-VGVAPG-OH: Ausbeute 24 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 16.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 916.3 (50) $[m+2H^+]/2$, 927.4 (44) $[m+H^+Na^+]/2$, 935.4 (15) $[m+H^+K^+]/2$, 1831.0 (100) $[m+H^+]$.

H12 cyclo(-RGDfE)-Hegas-C-Hegas-PRRARV-OH: Ausbeute 21 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 14.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 522.8 (97) $[m+4H^+]/4$, 696.6 (100) $[m+3H^+]/3$, 1044.0 (93) $[m+2H^+]/2$.

8.13 Synthese der heterodimeren RGD-Peptide ohne Anker

Die Synthese der Heterodimeren ohne Anker erfolgt analog Kap. 8.12. Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

HL1 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-YIGSR-OH*: Ausbeute 44 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 17.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 752.4 (100) $[m+2H^+]/2$, 771.3 (10) $[m+H^++K^+]/2$, 1502.8 (16) $[m+H^+]$.

HL2 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-FHRRIKA-OH*: Ausbeute 41 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 16.3$ min. **ESI-MS** m/z (%) 460.0 (26) $[m+4H^+]/4$, 612.9 (64) $[m+3H^+]/3$, 918.5 (100) $[m+2H^+]/2$, 937.3 (20) $[m+H^++K^+]/2$, 1834.9 (9) $[m+H^+]$.

HL3 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-PPRARI-OH*: Ausbeute 39 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 16.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 540.1 (63) $[m+3H^+]/3$, 809.5 (100) $[m+2H^+]/2$, 1616.9 (25) $[m+H^+]$.

HL4 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-GFOGER-OH*: Ausbeute 50 %.

HPLC (5-60, 30 min) $R_t = 16.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 794.0 (100) $[m+2H^+]/2$, 1585.8 (18) $[m+H^+]$.

HL5 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-IKVAV-OH*: Ausbeute 46 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.8$ min. **ESI-MS** m/z (%) 719.3 (60) $[m+2H^+]/2$, 1436 (100) $[m+H^+]$.

HL6 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-HAVDI-OH*: Ausbeute 42 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 14.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 731.8 (100) $[m+2H^+]/2$, 1461.8 (53) $[m+H^+]$, 1483.7 (53) $[m+Na^+]$.

HL7 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-GRGDSP-OH*: Ausbeute 6 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 12.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 748.8 (100) $[m+2H^+]/2$, 759.7 (9) $[m+H^++Na^+]/2$, 1495.8 (7) $[m+H^+]$.

HL8 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-RKKRRQRRR-OH*: Ausbeute 40 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 11.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 750.3 (100) $[m+3H^+]/3$, 1124.6 (62) $[m+2H^+]/2$.

HL9 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-KQAGDV-OH*: Ausbeute 33 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 12.9$ min. **ESI-MS** m/z (%) 763.3 (100) $[m+2H^+]/2$, 774.4 (12) $[m+H^++Na^+]/2$, 1524.8 (40) $[m+H^+]$, 1546.9 (11) $[m+Na^+]$.

HL10 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-KRSK-OH*: Ausbeute 41 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 11.4$ min. **ESI-MS** m/z (%) 357.6 (19) $[m+4H^+]/4$, 476.4 (79) $[m+3H^+]/3$, 713.8 (100) $[m+2H^+]/2$, 1425.8 (31) $[m+H^+]$.

HL11 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-VGVAPG-OH*: Ausbeute 22 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 15.1$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1406.8 (100) $[m+H^+]$, 1428.8 (12) $[m+Na^+]$.

HL12 *cyclo(-RGDfE-)-Hegas-PRRARV-OH*: Ausbeute 34 %.

HPLC (5-80, 30 min) $R_t = 12.5$ min. **ESI-MS** m/z (%) 416.7 (66) $[m+4H^+]/4$, 555.1 (72) $[m+3H^+]/3$, 831.9 (100) $[m+2H^+]/2$, 1661.9 (20) $[m+H^+]$.

8.14 Synthese der SNS-Peptide mit Thiolanker

TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Leu-OH belegt. Das Peptid H-N(Trt)Y(OtBu)Y(OtBu)S(OtBu)N(Trt)S(OtBu)Y(OtBu)S(OtBu)FW(Boc)L-TCP wird mit den entsprechenden Fmoc-Aminosäuren nach AAV 2a aufgebaut.

SNS1: Das Undekapeptid wird mit Fmoc-Cys(Trt)-OH nach AAV 2c verlängert und nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt.

SNS2: Das Undekapeptid wird mit N-Fmoc-2-Aminobuttersäure nach AAV 2a und mit Fmoc-Hegas-OH nach AAV 2c verlängert. Der N-Terminus wird mit S-Trityl-Mercaptopropionsäure nach AAV 2a acyliert und nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt.

SNS3: Das Undekapeptid wird mit N-Fmoc-2-Aminobuttersäure nach AAV 2a verlängert und analog zu **Z7** acetyliert. Das Peptid wird nach AAV4b unter Erhalt der

Schutzgruppen vom Harz abgespalten und nach AAV 9a an H-Hegas-Cys(Trt)-TCP gekuppelt. Das Peptide wird nach AAV 11 vom Harz abgespalten und entschützt. Alle Verbindungen werden durch semipräparative HPLC gereinigt. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Harzbelegung mit der ersten Aminosäure.

SNS 1 H-CNYYSNSYSFWL-OH: Ausbeute 14 %.

HPLC (5-90, 30 min) $R_t = 16.7$ min. **ESI-MS** m/z (%) 774.1 (25) $[m+2H^+]/2$, 793.2 (66) $[m+H^++K^+]/2$, 1546.6 (100) $[m+H^+]$, 1568.7 (10) $[m+Na^+]$, 1584.5 (14) $[m+K^+]$.

SNS 2 Mp-Hegas-AbuNYYSNSYSFWL-OH: Ausbeute 6 %.

HPLC (5-90, 30 min) $R_t = 18.2$ min. **ESI-MS** m/z (%) 969.7 (43) $[m+2H^+]/2$, 980.7 (33) $[m+H^++Na^+]/2$, 988.9 (100) $[m+H^++K^+]/2$, 1937.6 (22) $[m+H^+]$, 1959.8 (24) $[m+Na^+]$, 1976.7 (12) $[m+K^+]$.

SNS 3 Ac-AbuNYYSNSYSFWL-Hegas-C-OH: Ausbeute 5 %.

HPLC (10-90, 30 min) $R_t = 16.6$ min. **ESI-MS** m/z (%) 1017.3 (100) $[m+H^++K^+]/2$, 1020.2 (50) $[m+2Na^+]$, 1031.4 (48) $[m+2K^+]$, 1995.6 (13) $[m+H^+]$.

9 Anhang

9.1 Signaltransduktion von Integrinen

Schon zu einem frühen Zeitpunkt war bekannt, dass Integrine selber keine Kinaseaktivität besitzen, sondern dass Integrincluster die Fokale Adhäsions-Kinase (FAK) rekrutieren.^[101] FAK spielt nach Autophosphorylierung eine zentrale Rolle in der integrinvermittelten Signaltransduktion: Sie ist ein Adaptermolekül für z. B. Src, Fyn, Grb2, Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase γ und ist in *downstream*-Ereignisse wie z. B. Grb2/Ras/Raf/Mek/MAPK(=Erk), PI3K/Akt und Crk/Rac/MAPK involviert.^[101, 134, 515] Die Aktivierung des MAPK-Pfades ist aber nicht zwingend an die Beteiligung von FAK gebunden, in der Literatur finden sich z. B. nach Integrinbindung eine Aktivierung via src/Syk/Vav, Rap-1/B-Raf und Caveolin/Fyn/Shc.^[101] Letzteres ist bereits ein Beispiel für die Zusammenarbeit von Integrinen mit anderen Transmembranproteinen. Die prominentesten Vertreter dieser Art von Signaltransduktion sind wohl die Rezeptoren der verschiedenen Wachstumsfaktoren (*growth factor receptor* GFR), nämlich *basic fibroblast* GFR (bFGFR), *epidermal* GFR (EGFR), *platelet derived* GFR (PDGFR), *vascular endothelial* GFR (VEGFR), c-Met (Hepatocyten GFR) und RON (macrophage stimulating protein receptor).^[101, 134] Die Signale der GFRs haben zentrale Bedeutung in der Steuerung von Zellzyklus, -wachstum und -differenzierung.^[101] Die Integrin-basierende Beeinflussung der GFRs ist massiv und geht z. B. sogar so weit, dass das Signal eines Wachstumsfaktors keinen Effekt zeigt, wenn keine integrinvermittelte Zelladhäsion vorliegt; bzw. ein GFR unterliegt integrinvermittelt bereits der Autophosphorylierung ohne das Signal des entsprechenden Wachstumsfaktors!^[100, 101, 516] Für die Art und Weise der Beeinflussung sind verschiedene Mechanismen vorgeschlagen und nachgewiesen worden, wobei sich diese wahrscheinlich z. T. auch überschneiden: Transaktivierung (ein aktivierter Rezeptor aktiviert den anderen), Signalkoordination (Signale der unterschiedlichen Rezeptoren müssen zusammenwirken) Pfadmodulation (Signalpfade beeinflussen sich graduell), Rezeptorkompartimentation (integrinbedingtes Cytoskelett ist strukturelle Grundlage für Signaltransduktion anderer Rezeptoren) und Rezeptorexpression.^[100, 101] Aus der Vielzahl der oben angedeuteten weiteren Integrin-interagierenden Membranproteinen sei noch uPAR erwähnt, dessen Interaktion mit den integrinvermittelter Signaltransduktion vielgestaltig und integrinspezifisch ist, sowie die zu FA-Bildung beitragenden Zelladhäsionsproteine Syndecan-4 und der 67kD-Lamininrezeptor.

9.2 Zellmigration

Zellmigration ist essentiell in der Embryogenese, für die inflammatorische Immunantwort, Wundheilung und Tumormetastasierung.^[517] Wichtige Schaltstellen für die Organisation der Zellmigration sind Integrine, die kleinen Rho-GTPasen, Src, FAK, PAK (p21-Kinase) und Calpain. Die mechanischen Kräfte werden über Integrine, allgemein FAs, Aktin-Filamente und Myosin übertragen.^[518]

Die Integrine sind dabei in alle Stufen der Zellmigration involviert: a) Bildung von FAs an der Zellfront, b) Mechanotransduktion zwischen den kontraktile Kräfte der Zelle und dem unterliegenden Substrat. Dabei bewegt sich die Zelle nach vorne und über die FAs hinweg. c) Lösen aus den FAs am Ende der Zelle. Die Integrine können nun durch Endocytose recycelt werden^[114, 115] oder sie werden aus der Zellwand herausgerissen und verbleiben auf dem Substrat.^[112, 113] Die Möglichkeit, die FAs in einer Zelle an einer Stelle zu bilden und an anderer Stelle aktiv aufzulösen deutet auf eine Art mechanische Kupplung zwischen Integrinen und dem Cytoskelett hin. Die Möglichkeit der Entkupplung sind allerdings begrenzt, da z. B. SMCs auf Oberflächen mit einer sehr hohen Ligandendichte für das Integrin $\alpha 5\beta 1$ oder mit einer Überexpression von $\alpha 5\beta 1$ nicht mehr migrieren können und gleichsam festgeklebt erscheinen.^[57, 519] Im Gegensatz dazu nimmt die Migration von Ovarialkarzinomzellen mit der Expression von $\alpha v\beta 3$ stetig zu. Für mehrere Zelllinien gibt es Hinweise, dass auf einem Substrat bestimmte Integrine Adhäsion und andere Migration machen, z. B. in SMCs $\alpha 5\beta 1$ vs. $\alpha v\beta 3$,^[520] in Astrocyten $\alpha v\beta 5$ vs. $\alpha v\beta 8$,^[521] in neuronalen Crestzellen $\alpha v\beta 1$ vs. $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$,^[522] in Oligodendrozyten $\alpha v\beta 6$ vs. $\alpha v\beta 1$.^[523] Die zugrundeliegenden Mechanismen können dabei relativ komplex sein. So weiß man etwa für SMCs, dass ligandengebundene $\alpha v\beta 3$ -Integrine negative Regulatoren der $\alpha 5\beta 1$ -vermittelten Migration sind.^[57] Auch vom Zellinneren können unterschiedliche Integrine für die Migration rekrutiert werden, z. B. bewirkt aktiviertes R-Ras in transformierten Epithelzellen Migration via $\alpha 2\beta 1$ auf Collagen, aber nicht via $\alpha 5\beta 1$ auf Fibronectin.^[524] Dies eröffnet auf dem Gebiet der Biomaterialien die Möglichkeit, Zellmigration gezielt zu steuern, z. B. durch selektive Integrinliganden und/oder bestimmte Migrationssignale.^[57]

9.3 $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ - Integrine in Tumorgeschehen und Angiogenese

Bösartige (maligne) Tumoren unterscheiden sich von gutartigen (benignen) Geschwülsten durch ihr aggressives und invasives Wachstum zusammen mit der Fähigkeit zur Metastasenbildung. Diese ist die Hauptursache für den tödlichen Verlauf der meisten Krebserkrankungen.^[525] Damit es zur Ausbildung von Metastasen kommt, müssen mehrere Entwicklungsstufen durchlaufen werden: Ablösen der entarteten Zellen vom Primärtumor, Migration in Blut- oder Lymphgefäße, Wanderung der Zellen in den Gefäßen, Adhäsion im Kapillarsystem, Extravasation, Festsetzen in fremdem Gewebe und Induktion von Angiogenese. In allen Stufen sind Integrine in irgendeiner Form involviert, so dass im Tumorgeschehen sämtliche Aspekte der integrinvermittelten Signaltransduktion quasi kumulieren.

Zunächst müssen Zellen entarten, also wachsen, sich vermehren und unempfindlich werden für wachstumsbegrenzende und apoptotische Signale. Dies kann durch überexprimierte und/oder transformierte überaktive Komponenten der integrinvermittelten Signaltransduktion geschehen,^[526] etwa des MAPK-Pfades (z. B. transformiertes Ras), des Akt-Pfades^[527] oder der Bestandteile von FAs (z. B. FAK und neuerdings auch ILK = *integrin linked kinase*).^[134, 143] Im nächsten Schritt lösen sich Zellen aus dem Zellverband des Primärtumors und es findet eine Invasion der abgelösten Tumorzellen in das umliegende Gewebe statt. Die Ablösung kann z. B. durch *down*-Regulierung der Cadherin-Expression eingeleitet werden.^[528] Aber auch auf der Ebene der Integrine wurde in verschiedenen Tumorzelllinien eine reduzierte Expression von Integrinen, die für den immobilen Zustand einer Zelle wichtig sind, nachgewiesen, z. B. $\alpha2\beta1$, $\alpha5\beta1$ und $\alpha E\beta7$.^[529-533] Weiterhin wurden Beispiele für eine Überexpression von Integrinen gefunden, die mit einem migratorischen Phänotyp und damit einer Erhöhung des Metastasepotenzials einhergehen, z. B. $\alpha\beta3$ ^[48, 534] und $\alpha\beta5$ ^[535, 536]. Liegt eine Mutation in Src vor (v-Src) können keine stabilen FAs mehr ausgebildet, was den migratorische Zelltyp weiter verstärkt.^[123, 537] Der für eine erfolgreiche Migration benötigte Abbau von Barrieren, der ECM und Basalmembran, wird durch verschiedene Proteasen bewirkt: Kathepsine, MMPs und das urokinaseartige Plasminogen-Aktivator-System uPA.^[116, 538] In vielen Fällen wird die Expression und Aktivierung von MMPs durch Integrine kontrolliert.^[539] Eine zentrale Rolle scheint das uPA-System zu spielen durch Initiation einer extrazellulären Proteolyse-Kaskade, die Plasminogen und MMPs aktiviert und Wachstumsfaktoren aus ECM und der Zelloberfläche freisetzt. Weiterhin ist es über seinen Rezeptor uPAR und dessen Wechselwirkung mit verschiedenen Integrinen in ein Netzwerk von Zell-

adhäsion, Migration, Signaltransduktion und Expression migrationsrelevanter Moleküle eingebunden.^[540, 541] In jüngerer Zeit finden auch transformierte Bestandteile der Rho-vermittelten Signaltransduktion für die Ausbildung eines migratorischen Zelltyps Beachtung.^[135, 526]

Dringen die migrierenden Zellen in Blut- oder Lymphgefäße vor und überleben die dort auftretenden mechanischen Belastungen, können sie in entfernte Bereiche des Organismus transportiert werden. Um sich im Zielorgan festsetzen zu können müssen sich die Zellen an die Endothelschicht der Gefäße anheften und zur Extravasation die Endothelschicht und Basalmembran durchdringen. Hier sind wiederum Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine und Selectine sowie Proteasen involviert.^[542]

Nach der Einwanderung in das Zielgewebe ist nun die Ausbildung neuer Blutgefäße (Neoangiogenese) wichtig für die aggressive Proliferation von Tumorzellen. Ohne eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff können Tumoren nicht größer als 1-2 mm werden.^[543, 544] Die neu gebildeten Gefäße tragen außerdem zu einer weiteren Verbreitung der Tumorzellen bei. Die Neoangiogenese wird vom Tumor selbst durch die Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren induziert: bFGF, VEGF, TNF- α , Angiogenin und Thrombin.^[544-547] Diese Faktoren stimulieren die Endothelzellen in der Gefäßwand zu Proliferation, Migration und Invasion: Sie bauen die Basalmembran ab, dringen in Richtung des Stimulus vor und bilden neue Gefäße aus.^[547] Die Integrine $\alpha v \beta 3$ (stimuliert durch bFGF und TNF- α) und $\alpha v \beta 5$ (stimuliert durch VEGF) sind auf den neoangiogenetischen Epithelzellen hoch exprimiert.^[158, 548] Da die Expression dieser Integrine in bereits vorhandenen Blutgefäßen gering ist und bietet sich hier eine Möglichkeit zur therapeutischen Intervention.

9.4 $\alpha v \beta 3$ - und $\alpha v \beta 5$ - Integrine als medizinische *targets* in Tumorthherapie und Neoangiogeneseinhibition

Aus dem oben Gesagten ergeben sich drei Bereiche, in denen man mit künstlichen Integrinliganden in das Tumorgeschehen eingreifen kann: Auslösen von Apoptose durch Liganden der hochregulierten Integrine, Inhibierung der integrinvermittelten Migration und Metastasierung sowie Inhibition der Neoangiogenese. Der Terminus *Integrin-Ligand* wird im Folgenden vorgezogen, da die Rolle der Liganden als Antagonisten oder Inhibitoren in vielen Bereichen noch nicht klar ist.

Beispiele für eine direkte Induktion der Apoptose in Tumorzellen durch Anoikis oder des IMDs sind, dem Wesen der Tumorzellen entsprechend, selten. Dennoch konnte dies vor kurzem in einem Hirntumor in Mäusen mit dem RGD-Peptid *cyclo*[-RGDf(NMe)V-] (Cilengitide, EMD 121974) beobachtet werden.^[549] RGD-Peptide besitzen darüber hinaus die Eigenschaft, dass sie nach unspezifischer Aufnahme in die Zelle die Prozessierung von Pro-caspase-3 zu Caspase-3 katalysieren und damit Apoptose auslösen.^[550] Dieser Effekt tritt allerdings erst bei relativ hohen Peptidkonzentrationen auf (0.25 - 1 mM). Inzwischen wurde dieser Effekt in Lymphozyten, Cardiomyoceten und Fibroblasten, nicht aber Epithelzellen nachgewiesen.^[550, 551] Auch einige kommerzielle peptidomimetische α IIb β 3-Liganden, aber nicht RAD- und KGD-Peptide besitzen diese Eigenschaft und sollen für die steigende Zahl der Herztoten unter den damit behandelten Patienten verantwortlich sein.^[551]

In jüngerer Zeit finden die Integrinliganden als Auslöser von Apoptose wieder verstärkt Beachtung, weil integrinvermittelte Zelladhäsion als Ursache von Resistenzen der Tumorzellen gegen Tumortheraeutika, z. B. Paclitaxel, identifiziert wurde.^[148, 149]

Ihren Nutzen als Inhibitoren der integrinvermittelten Metastasierung haben RGD-Peptide in verschiedenen Modellsystemen bereits unter Beweis gestellt: *In vitro* kann man die Migration invasiver Melanomzellen durch die Basalmembran durch das Peptid GRGDTP inhibieren.^[552] *In vivo* kann man durch gleichzeitige Injektion von GRGDS-Peptid und Melanomzellen die Bildung von Lungenkolonien drastisch reduzieren. Zur Verstärkung und wegen des schnellen Abbaus der Peptide werden RGD-Multimere, RGD-funktionalisierte Liposomen und RGD-Polymer-Konjugate eingesetzt (vgl. Kap. 5.1).^[342, 553] Da durch die Inhibition der Metastasierung nicht die eigentlichen Tumoren bekämpft werden, dürfte für diese Art von Integrinliganden eine Anwendung in Kombination mit einem Cytostatikum zum Einsatz kommen^[554] bzw. wird die antimetastatische Wirkung als positiver Nebeneffekt einer antiangiogenetischen Therapie mit z. B. *cyclo*(-RGDf[NMe]V-) gesehen.^[555]

Die Inhibierung der tumorinduzierten Neoangiogenese durch α v β 3-Integrin-selektive RGD-Liganden und Antikörper^[556] hat große Aufmerksamkeit gefunden. Dies beruht u. a. auf den ermutigenden Ergebnissen einer Studie, in der das Peptid *cyclo*(-RGDfV-) in einem Hühneri-Membran-Essay die tumorinduzierte Gefäßneubildung unterbindet, während die bereits bestehenden Gefäße nicht beeinträchtigt werden.^[557] Der zugrundeliegende Mechanismus und die Rolle der α v β 3- (und auch der α v β 5-)Integrine ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Zunächst wurde angenommen, dass α v β 3-Integrine proangiogenetisch wirken, d. h. eine α v β 3-vermittelte Zelladhäsion stimuliert die Endothelzellen zur Ausbildung neuer Blutgefäße. Die α v β 3-selektiven Liganden würden demnach als Antago-

nisten zur ECM diese Adhäsion unterbinden und über den Anoikis-Mechanismus in Endothelzellen Apoptose auslösen. Die proangiogenetische Wirkung wurde durch die Forschungsergebnisse an $\alpha v\beta 3$ -Defektmäusen grundsätzlich in Frage gestellt: Die Defektmäuse sind lebensfähig und weisen sogar eine erhöhte tumorinduzierte Vaskularisierung auf.^[558] Neben der Möglichkeit des Organismus, andere Integrine oder Signalwege zu nutzen wird die bisherige Erkenntnis der $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrine als proangiogenetisch neu überdacht.^[558-560] Nach einem Vorschlag von *O. Hynes* werden nun $\alpha v\beta 3$ -Integrine als antiangiogenetisch bzw. negative Regulatoren der Angiogenese angesehen.^[560] Für die antiangiogenetische Wirkung werden drei mögliche Mechanismen vorgeschlagen: **Trans-dominante Inhibierung** proangiogenetischer Integrine (z. B. $\alpha 5\beta 1$), **down-Regulierung des VEGFR** durch verstärkte Expression von $\alpha v\beta 3$ und **$\alpha v\beta 3$ -Integrine als Rezeptoren für antiangiogenetische Proteine**, z. B. Thrombospondin oder das Collagen IV-Fragment Tumstatin.

Im Falle der trans-dominanten Inhibierung würden Endothelzellen nur dort angiogenetisch sein, wo wenig Liganden für $\alpha v\beta 3$ zur Verfügung stehen, also evtl. im Bereich degradierter ECM (andere Autoren betonen die Wichtigkeit einer ausgebildeten ECM für die Angiogenese!^[559]). RGD-Liganden würden demnach als Agonisten der ECM die Neoangiogenese auch im Bereich der degradierten ECM inhibieren. Dieser Mechanismus berücksichtigt nicht die unterschiedlicher Effekte löslicher und immobilier RGD-Liganden. Die *down*-Regulierung des VEGFR durch verstärkte Expression von $\alpha v\beta 3$ wurde als neuer Mechanismus der Begrenzung der Angiogenese vorgeschlagen.^[559] Wie eine Ligandenbindung (ECM oder lösliche Liganden) des $\alpha v\beta 3$ -Integrins eingriffe ist noch spekulativ. Analog zur trans-dominanten Inhibierung würde die antiangiogenetische Wirkung nur den Bereich der intakten ECM betreffen und RGD-Peptide würden ebenso diese nicht-degradierte ECM vortäuschen. Auch hier würde nicht zwischen löslichen und immobilien RGD-Liganden unterschieden. Weitergehende Einschränkungen gibt es bei den antiangiogenetischen Proteinen. Die Bindung von Tumstatin mit $\alpha v\beta 3$ erfolgt über zwei RGD-unabhängige Sequenzen^[561] und es konnte für beide Sequenzen (Aminosäuren 185-203 mit einem zentralen SNS-Motiv und Aminosäuren 54-132) gezeigt werden, dass die Bindung durch RGD-Peptide nicht inhibiert werden kann.^[561] Thrombospondin wird heute, entgegen einer frühen Veröffentlichung von *O. Hynes*,^[562] nicht mehr als Ligand für das $\alpha v\beta 3$ -Integrin angesehen: Die Wechselwirkung verschiedener Endothelzelllinien, Osteoclasten und Osteoblasten lassen sich nicht oder kaum mit RGD-Peptiden inhibieren.^[171, 563-566] Lediglich im Fall von vollständig reduziertem Thrombospondin wurde eine RGD-inhibierbare Adhäsion von Endothelzellen gefunden.^[567]

Möglicherweise könnte Thrombospondin über andere Sequenzen als RGD an das $\alpha v\beta 3$ -Integrin binden. Allerdings findet thrombospondinvermittelte Zelladhäsion wahrscheinlich über Proteoglykane statt^[566] und die apoptotische/antiangiogenetische Wirksamkeit beruht auf der Wechselwirkung mit anderen Rezeptoren, z. B. dem oben erwähnten Calretikulin.^[142]

Gemäß der anderen aktuellen Theorie, der des *integrin mediated death* (IMD) von *Stupack* und *Cheresh*,^[145] wären Endothelzellen mit überexprimiertem $\alpha v\beta 3$ in hohem Maße proapoptotisch. Bereits eine Entfernung der Zellen aus dem Bereich antiapoptotischer Signale, z. B. VEGF^[568] oder eine unzureichende Bindung an die ECM würde zu Apoptose führen. RGD-Peptide wären hier Antagonisten der antiapoptotischen Zelladhäsion an die immobile und Integrincluster-auslösende ECM. Dies entspräche einer Art modifizierter Anoikis-Theorie. Ob einer dieser Mechanismen oder eine Kombination daraus der antiangiogenetischen Wirkung von RGD-Peptiden zugrunde liegt wird die Zukunft zeigen.

Entgegen den vielversprechenden Vorversuchen scheint eine Tumorthherapie mit RGD-Peptiden in klinischen Studien selbst in Kombination mit anderen Cytostatika nur mäßig erfolgreich zu sein. Eine Anwendung der Angiogeneseinhibitoren bei Arthritis, bei der Adern in den Knorpel einwachsen oder Retinopathie, ein Zerstörung der Netzhaut des Auges durch einsprossende Gefäße, scheint momentan erfolgversprechender. So werden z. B. zur Zeit bei Merck KGaA Verbindungen auf der Basis von RGD-Peptiden als Arzneimittel bei Retinopathie entwickelt.

In einem anderen Ansatz macht man sich nicht die Eigenschaft der RGD-Peptide als Wirkstoffe, sondern ihre Fähigkeit als Vehikel zum gezielten Ansteuern des neoangiogenetischen Gewebes bzw. der $\alpha v\beta 3$ -überexprimierenden Zellen zu Nutze. Bei diesem *targeting* werden Wirkstoffe wie Doxorubicin^[442, 443, 569] und Tachyplesin^[444] aber auch therapeutischen Gensequenzen^[457] mit der RGD-Sequenz verknüpft, und diese sollen so zielgerichtet und selektiv in den Epithelzellen wirken. Nach dem selben Konzept können auch Radionuklide in Konjugaten mit RGD-Peptiden eingesetzt werden. Die Radionuklide können als Reportergruppen für bildgebende Verfahren oder als therapeutische Wirkstoffe dienen (Kap. 6.10).

9.5 Integrinselektive RGD-Peptide für die Oberflächenbeschichtung

Analog zur unterschiedlichen Integrinaffinität ist eine unterschiedliche **Integrin-Selektivität** der RGD-Peptide theoretisch von großer Bedeutung für eine gezielte stimulierte Zelladhäsion. So würde es z. B. keinen Sinn machen, eine Aderprothese mittels RGD-Peptiden zu Endo-

thelialisieren, wenn gleichzeitig die Adhäsion von Blutplättchen unterstützt wird. Man müsste also lediglich ein prädominantes oder spezifisches Integrin der zu adhärierenden Zellspezies identifizieren und das entsprechende RGD-Peptid (oder eine andere Adhäsionssequenz) auf der Oberfläche immobilisieren.

Limitierend bei der schnellen Umsetzung dieses Konzepts ist, dass es aus der Medizinischen Forschung nur für einige Integrine selektive und hochaffine Peptide und Peptidomimetika gibt. Davon wurden nur wenige zur Adhäsion auf Oberflächen immobilisiert und davon kaum Studien zur integrinselektiven Zelladhäsion durchgeführt. Die geringen Erkenntnisse auf diesem Gebiet beziehen sich daher nur auf die „klassischen“ Integrine $\alpha\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$. Mit den Peptiden G*PenGRGDSPC*A und *cyclo*(-RGDf[NMe]V-) stehen zwei $\alpha\beta_3$ -selektive Peptide zur Verfügung, wobei letzteres in Form des Peptids *cyclo*(-RGDfK-) in Zelladhäsionstests verwendet wurde.^[1, 310] Die Peptide GRGDSP, GRGDNP und RGDSPASSKP vermitteln wahrscheinlich Zelladhäsion via $\alpha_5\beta_1$,^[310, 353] während immobilisierte Peptide mit einer großen lipophilen Seitenkette neben dem Aspartat wie GRGDf, GRGDY, GRGDVY, oder GRGDYPC wohl eher eine höhere Affinität gegenüber $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha\beta_3$ aufweisen.^[95, 122, 310, 570-572] Die Affinität des Peptids GRGDS gegenüber den drei Integrinen ist auf einem mäßigen Level ungefähr gleich hoch und dürfte nützlich sein, wenn mehrere Integrine gleichzeitig adressiert werden. Das Peptid *cyclo*(-RGDfV-) nimmt eine Mittelstellung ein: In seiner Affinität gegenüber $\alpha_5\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$, ist es vergleichbar mit GRGDS, gegenüber $\alpha\beta_3$ ist die Affinität etwa 10-100fach höher.^[54]

Die oben formulierte Theorie der integrinsspezifischen Zelladhäsion wird durch verschiedene Ergebnisse von Zelladhäsionsstudien unterstützt: Endothelzellen adhärten an immobilisiertes GRGDVY-Peptid nicht via $\alpha_5\beta_1$, sondern $\alpha\beta_3$, wie durch Antikörperversuche nachgewiesen werden konnte.^[122, 570, 571] An G*PenGRGDSPC*A-funktionalisierte Oberflächen adhärten ebenfalls Endothelzellen und glatte Muskelzellen (SMCs) bevorzugt gegenüber Fibroblasten.^[573] Im Gegensatz dazu adhärten Fibroblasten wohl stärker als Endothelzellen an RGDSPASSKP und GRGDSP funktionalisierte „ $\alpha_5\beta_1$ -selektive“ Oberflächen.^[353, 573] Auch die Macrophagen und *foreign body giant cells* (FBGCs) adhärten bevorzugt über $\alpha_5\beta_1$ und nur in geringem Maße über $\alpha\beta_3$.^[353] Man muss sich allerdings im Klaren darüber sein, dass diese in-vitro-Ergebnisse nichts über eine Funktionalität *in vivo* aussagen: Erstens ist das Integrin-Expressionmuster von Zellen nicht statisch und kann sich dem Untergrund anpassen.^[574] Zweitens ist die Affinität der Integrine für ihre Liganden Gegenstand der Regulation, so dass eine Zelle je nach Status unterschiedlich an Oberflächen binden kann.^[9, 270] Drittens übermitteln unterschiedliche Integrine unterschiedliche Signale ins

Zellinnere, so dass z. B. Myoblasten je nach Gehalt an $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -selektiven immobilisierten Liganden entweder einfach adhäreren oder sich in *myotubes* differenzieren.^[575] Viertens greifen auch ungebundene Integrine regulierend in die Signalgebung gebundener Integrine ein („crosstalk“).^[24, 134, 507, 576] Weiterhin gibt es *in vivo* noch Einflüsse von benachbarten Zellen, Ionen, Wachstumsfaktoren auf Integrinexpression und Affinität,^[574] so dass es ratsam erscheint, zelladhäsive Oberflächen für medizinische Anwendungen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt *in vivo* zu testen.

9.6 Titanlegierungen

Reines Titan besitzt einen dem Knochen ähnlicheren Elastizitätsmodul und ist damit flexibler als z. B. Stahl oder CoCrMo-Legierung. Dadurch wird die Gefahr einer mechanischen Überforderung des umgebenden Knochen verringert.^[210] Allerdings treten in Titan eher Ermüdungsbrüche auf und auch die Duktilität ist für manche Anwendungen zu gering, weshalb ersatzweise Legierungen wie z. B. Ti6Al4V und Ti6Al7Nb eingesetzt werden.^[410, 577, 578] Die Beimischungen können allerdings z. T. Allergien oder verändertes Zellwachstum auslösen können und cytotoxisch sein (Vanadium).^[579, 580] Als Alternative wurden in jüngerer Zeit Titanitride und Titan-Tantal-Legierungen, z. B. Ti5Al13Ta vorgeschlagen.^[410, 580-583] Reines Tantal besitzt als Biomaterial ähnlich günstige Eigenschaften wie Titan und ist ihm bezüglich der mechanischen Eigenschaften überlegen. Aufgrund technischer Schwierigkeiten seiner Bearbeitung wird es aber seltener eingesetzt.^[196, 582-585]

Unter den Metalllegierungen wird weiterhin eine Mischung aus Nickel und Titan, sogenanntes Nitinol verwendet. Aufgrund von Formgedächtnis, Superelastizität und Korrosionsbeständigkeit hat es als Material für Stents Bedeutung erreicht.^[209] Die gute Biokompatibilität und Korrosionsbeständigkeit beruht auf einer passivierenden TiO_2 -Schicht auf der Oberfläche.^[586]

9.7 Calciumphosphat: Wechselwirkung mit Gewebe

Eine gewisse Denaturierung von Proteinen auf Calciumphosphatoberflächen dürfte den Organismus nicht vor eine vollständig unbekannte Situation stellen, da die Calciumphosphatmaterialien ja – zumindest von der chemischen Zusammensetzung – körperähnlich sind, im Unterschied zu z. B. Metalloberflächen. Im Knochen gibt es einige Proteine mit HA-bindenden

den Domänen, z. B. Osteonectin, Osteopontin, BSP und Gla-Protein.^[281, 282] Möglicherweise findet der Implantat-Gewebekontakt über diese Proteine statt, es sind aber auch andere Proteine wie Vitronectin und Fibronectin denkbar, die *in vitro* Zelladhäsion von Osteoblasten auf HA-Oberflächen vermitteln.^[239, 587] Für die erfolgreiche Adhäsion von Osteoblasten an mit Proteinen konditionierte Oberflächen sind *in vitro* eher die Integrine der α v-Familie und α 5 β 1 von Bedeutung als die Collagen-bindenden Integrine α 2 β 1 und α 3 β 1.^[180, 587] Diese Zelladhäsion wird auch für die *in vivo* bessere Osseointegration von HA-beschichteten Biomaterialoberflächen vermutet.^[587] Möglicherweise trägt auch eine lokale Erhöhung des Calciumspiegels dazu bei.^[588]

10 Literatur

- [1] 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.
- [2] M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 107-114.
- [3] J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 906-908.
- [4] S. M. Albelda, C. A. Buck, *FASEB J.* **1990**, *4*, 2868-2880.
- [5] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher, *Science* **1987**, *238*, 491-497.
- [6] C. M. Isacke, M. A. Horton, *The Adhesion Molecules Fact Book*, 2nd ed., Academic Press, London, **2000**.
- [7] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, R. O. Hynes, *Cell* **1986**, *46*, 271-282.
- [8] R. O. Hynes, *Cell* **1987**, *48*, 549-554.
- [9] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- [10] P. A. D'Amore, R. W. Thompson, *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453-464.
- [11] J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- [12] T. Weller, L. Alig, M. Beresini, B. Blackburn, S. Bunting, P. Hadvary, M. H. Müller, D. Knopp, B. Levet-Trafit, M. T. Lipari, N. B. Modi, M. Müller, C. J. Refino, M. Schmitt, P. Schonholzer, S. Weiss, B. Steiner, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3139-3147.
- [13] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh, *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 47-54.
- [14] H. P. Hammes, M. Brownlee, A. Jonczyk, A. Sutter, K. T. Preissner, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 529-533.
- [15] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone, *Exp. Cell Res.* **1994**, *212*, 209-218.
- [16] D. T. Denhardt, X. Guo, *FASEB J.* **1993**, *7*, 1475-1482.
- [17] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. S. Goligorsky, *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050-1058.
- [18] M. A. Horton, *Exp. Nephrol.* **1999**, *7*, 178-184.

- [19] G. Kilger, B. Holzmann, *J. Mol. Med.* **1995**, *73*, 347-354.
- [20] T. A. Springer, *Cell* **1994**, *76*, 301-314.
- [21] S. K. Akiyama, E. Hasegawa, T. Hasegawa, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 13256-13260.
- [22] E. M. Erb, K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Müller, J. Engel, *Biochemistry* **1997**, *36*, 7395-7402.
- [23] S. A. Wilcox-Adelman, F. Denhez, P. F. Goetinck, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32970-32977.
- [24] A. van der Flier, A. Sonnenberg, *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 285-298.
- [25] T. Velling, G. Collo, L. Sorokin, M. Durbeej, H. Zhang, D. Gullberg, *Dev. Dyn.* **1996**, *207*, 355-371.
- [26] C. Vinciguerra, J. C. Bordet, G. Beaune, C. Grenier, M. Dechavanne, C. Negrier, *Platelets* **2001**, *12*, 486-495.
- [27] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington, *Cell* **2000**, *100*, 47 - 56.
- [28] 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.
- [29] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785-21788.
- [30] J. Bella, H. M. Berman, *Structure* **2000**, *8*, 121 - 126.
- [31] D. E. Gullberg, E. Lundgren-Akerlund, *Prog. Histochem. Cytochem.* **2002**, *37*, 3-54.
- [32] A. J. Reason, A. Dell, H. R. Morris, M. E. Rogers, J. J. Calvete, J. Gonzalez-Rodriguez, *Carbohydr. Res.* **1991**, *221*, 169-177.
- [33] T. Kawano, S. Takasaki, T. W. Tao, A. Kobata, *Int. J. Cancer* **1993**, *53*, 91-96.
- [34] R. K. Pretzlaff, V. W. Xue, M. E. Rowin, *Cell Adhes. Commun.* **2000**, *7*, 491-500.
- [35] A. C. Semel, E. C. Seales, A. Singhal, E. A. Eklund, K. J. Colley, S. L. Bellis, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32830-32836.
- [36] L. Moss, A. Prakobphol, T. W. Wiedmann, S. J. Fisher, C. H. Damsky, *Glycobiology* **1994**, *4*, 567-575.
- [37] B. von Lampe, A. Stallmach, E. O. Riecken, *Gut* **1993**, *34*, 829-836.
- [38] S. S. Veiga, R. Chammas, N. Cella, R. R. Brentani, *Int. J. Cancer* **1995**, *61*, 420-424.

- [39] A. Litynska, M. Przybylo, D. Ksiazek, P. Laidler, *Acta Biochim. Pol.* **2000**, *47*, 427-434.
- [40] J. A. Eble, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 1 - 40.
- [41] V. W. Engleman, M. S. Kellogg, T. W. Rogers, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 191 - 200.
- [42] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T.-L. Yue, *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 545 - 584.
- [43] M. Pfaff, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 101 - 121.
- [44] S. T. Barry, S. B. Ludbrook, E. Murrison, C. M. Horgan, *Exp. Cell Res.* **2000**, *258*, 342-351.
- [45] N. Morimura, Y. Tezuka, N. Watanabe, M. Yasuda, S. Miyatani, N. Hozumi, K. Tezuka Ki, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42172-42181.
- [46] R. Brandenberger, A. Schmidt, J. Linton, D. Wang, C. Backus, S. Denda, U. Müller, L. F. Reichardt, *J. Cell Biol.* **2001**, *154*, 447-458.
- [47] Y. Taooka, J. Chen, T. Yednock, D. Sheppard, *J. Cell Biol.* **1999**, *145*, 413-420.
- [48] J. F. Marshall, D. C. Rutherford, A. C. McCartney, F. Mitjans, S. L. Goodman, I. R. Hart, *J. Cell Sci.* **1995**, *108*, 1227-1238.
- [49] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature* **1984**, *309*, 30-33.
- [50] S. Aota, M. Nomizu, K. M. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 24756-24761.
- [51] J. Y. Wong, Z. Weng, S. Moll, S. Kim, C. T. Brown, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3865-3870.
- [52] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50 - 54.
- [53] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911 - 921.
- [54] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20233 - 20238.
- [55] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461 - 7472.
- [56] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1374 - 1389.
- [57] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *accepted*.

- [58] D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida, *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195-228.
- [59] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697-715.
- [60] J. Ivaska, J. Kapyla, O. Pentikainen, A. M. Hoffren, J. Hermonen, P. Huttunen, M. S. Johnson, J. Heino, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3513-3521.
- [61] M. Nomizu, W. H. Kim, K. Yamamura, A. Utani, S. Y. Song, A. Otaka, P. P. Roller, H. K. Kleinman, Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20583-20590.
- [62] M. Mesri, J. Plescia, D. C. Altieri, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 744-748.
- [63] C. Marcinkiewicz, Y. Taooka, Y. Yokosaki, J. J. Calvete, M. M. Marcinkiewicz, R. R. Lobb, S. Niewiarowski, D. Sheppard, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 31930-31937.
- [64] R. Alon, R. Hershkoviz, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Lider, *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*, 893-898.
- [65] H. Sakamoto, T. Broekelmann, D. A. Cheresh, F. Ramirez, J. Rosenbloom, R. P. Mecham, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 4916-4922.
- [66] J. W. Smith, Z. M. Ruggeri, T. J. Kunicki, D. A. Cheresh, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12267-12271.
- [67] Y. Maeshima, U. L. Yerramalla, M. Dhanabal, K. A. Holthaus, S. Barbashov, S. Kharbanda, C. Reimer, M. Manfredi, W. M. Dickerson, R. Kalluri, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31959-31968.
- [68] K. Yokoyama, H. P. Erickson, Y. Ikeda, Y. Takada, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16891-16898.
- [69] H. Nakahara, M. Nomizu, S. K. Akiyama, Y. Yamada, Y. Yeh, W. T. Chen, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27221-27224.
- [70] H. Li, N. Sampson, *J. Pept. Res.* **2002**, *59*, 45-54.
- [71] B. E. Vogel, S. J. Lee, A. Hildebrand, W. Craig, M. D. Pierschbacher, F. Wongstaal, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 461-468.
- [72] U. Müller, B. Bossy, K. Venstrom, L. F. Reichardt, *Mol. Biol. Cell* **1995**, *6*, 433-448.
- [73] L. M. Schnapp, N. Hatch, D. M. Ramos, I. V. Klimanskaya, D. Sheppard, R. Pytela, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23196-23202.
- [74] S. Denda, U. Müller, K. L. Crossin, H. P. Erickson, L. F. Reichardt, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5464-5474.

- [75] S. B. Hopkinson, K. Findlay, G. W. deHart, J. C. Jones, *J. Invest. Dermatol.* **1998**, *111*, 1015-1022.
- [76] P. I. Karecla, S. J. Green, S. J. Bowden, J. Coadwell, P. J. Kilshaw, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 30909-30915.
- [77] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, *Science* **2002**, *296*, 151-155.
- [78] G. Sulyok, Dissertation, Technische Universität München **2001**.
- [79] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, P. K. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, 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.
- [80] M. W. Lark, G. B. Stroup, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, F. H. Drake, J. N. Bradbeer, A. Mathur, K. F. Erhard, K. A. Newlander, S. T. Ross, K. L. Salyers, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Pharmacol. Exp. Ther* **1999**, *291*, 612-617.
- [81] P. A. Burke, S. J. DeNardo, L. A. Miers, K. R. Lamborn, S. Matzku, G. L. DeNardo, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 4263-4272.
- [82] B. S. Coller, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 1467-1471.
- [83] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-1051.
- [84] D. Gottschling, J. Boer, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *114*, 3133-3137.
- [85] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2586-2592.
- [86] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3988-3991.
- [87] S. Aznavoorian, M. L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, L. A. Liotta, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3247-3254.
- [88] W. S. Craig, S. Cheng, D. G. Mullen, J. Blevitt, M. D. Pierschbacher, *Biopolymers* **1995**, *37*, 157-175.
- [89] R. Haubner, Dissertation, Technische Universität München **1995**.

- [90] D. Finsinger, Dissertation, Technische Universität München **1997**.
- [91] B. B. Whitlock, S. Gardai, V. Fadok, D. Bratton, P. M. Henson, *J. Cell Biol.* **2000**, *151*, 1305-1320.
- [92] D. R. Phillips, I. F. Charo, R. M. Scarborough, *Cell* **1991**, *65*, 359-362.
- [93] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer, *Cell* **2002**, *110*, 599-511.
- [94] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel, *Biochemistry* **1999**, *38*, 14461-14474.
- [95] J. H. Beer, K. T. Springer, B. S. Coller, *Blood* **1992**, *79*, 117-128.
- [96] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler, *Protein Sci.* **2002**, *11*, 1800-1812.
- [97] R. J. Mehta, B. Diefenbach, A. Brown, E. Cullen, A. Jonczyk, D. Gussow, G. A. Luckenbach, S. L. Goodman, *Biochem. J.* **1998**, *330*, 861-869.
- [98] K.-E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 470-473.
- [99] M. Shimaoka, J. Takagi, T. A. Springer, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, *31*, 485-516.
- [100] K. M. Yamada, S. Even-Ram, *Nat Cell Biol.* **2002**, *4*, E75-76.
- [101] C. K. Miranti, J. S. Brugge, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E83-90.
- [102] A. Woods, J. R. Couchman, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 578-583.
- [103] C. G. Galbraith, K. M. Yamada, M. P. Sheetz, *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 695-705.
- [104] A. Rahman, Y. Tseng, D. Wirtz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 771.
- [105] B. Geiger, A. Bershadsky, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 584-592.
- [106] M. H. Ali, P. T. Schumacker, *Crit. Care Med.* **2002**, *30*, S198-206.
- [107] I. Owan, D. B. Burr, C. H. Turner, J. Qiu, Y. Tu, J. E. Onyia, R. L. Duncan, *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, C810-815.
- [108] R. L. Duncan, C. H. Turner, *Calcif. Tissue Int.* **1995**, *57*, 344-358.
- [109] D. M. Salter, S. J. Millward-Sadler, G. Nuki, M. O. Wright, *Clin. Orthop.* **2001**, S49-60.
- [110] H. S. Lee, S. J. Millward-Sadler, M. O. Wright, G. Nuki, R. Al-Jamal, D. M. Salter, *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, *10*, 890-897.
- [111] G. Pande, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 569-574.
- [112] G. Schulze-Tanzil, P. de Souza, H. J. Merker, M. Shakibaei, *Histol. Histopathol.* **2001**, *16*, 1081-1089.

- [113] S. P. Palecek, C. E. Schmidt, D. A. Lauffenburger, A. F. Horwitz, *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 941-952.
- [114] F. Grinnell, *J. Cell Biol.* **1986**, *103*, 2697-2706.
- [115] L. M. Memmo, P. McKeown-Longo, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 425-433.
- [116] C. Brakebusch, D. Bouvard, F. Stanchi, T. Sakai, R. Fassler, *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*, 999-1006.
- [117] R. G. Lebaron, K. A. Athanasiou, *Tissue Eng.* **2000**, *6*, 85-103.
- [118] C. Gimond, A. Sonnenberg, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 219-240.
- [119] D. Dogic, P. Rousselle, M. Aumailley, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 793-802.
- [120] E. Zamir, B. Geiger, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3583-3590.
- [121] R. R. Hantgan, D. S. Lyles, T. C. Mallett, M. Rocco, C. Nagaswami, J. W. Weisel, *J. Biol. Chem.* **2002**, *7*, 7.
- [122] S. P. Massia, J. A. Hubbell, *J. Cell Biol.* **1991**, *114*, 1089-1100.
- [123] V. Petit, J. P. Thiery, *Biol. Cell* **2000**, *92*, 477-494.
- [124] F. S. David, A. Kern, E. E. Marcantonio, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 241-251.
- [125] V. Grabovsky, S. Feigelson, C. Chen, D. A. Bleijs, A. Peled, G. Cinamon, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, T. Lapidot, Y. van Kooyk, R. R. Lobb, R. Alon, *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 495-506.
- [126] S. Myou, X. Zhu, E. Boetticher, Y. Qin, S. Myo, A. Meliton, A. Lambertino, N. M. Munoz, K. J. Hamann, A. R. Leff, *Immunology* **2002**, *107*, 77-85.
- [127] M. Stewart, N. Hogg, *J. Cell Biochem.* **1996**, *61*, 554-561.
- [128] D. F. Kucik, *Immunol. Res.* **2002**, *26*, 199-206.
- [129] A. Zanetti, G. Conforti, S. Hess, I. Martin-Padura, E. Ghibaudi, K. T. Preissner, E. Dejana, *Blood* **1994**, *84*, 1116-1123.
- [130] T. Hato, N. Pampori, S. J. Shattil, *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 1685-1695.
- [131] J. C. Adams, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 371-392.
- [132] N. Tawil, P. Wilson, S. Carbonetto, *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 261-271.
- [133] J. L. Sechler, A. M. Cumiskey, D. M. Gazzola, J. E. Schwarzbauer, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1491-1498.
- [134] N. J. Boudreau, P. L. Jones, *Biochem J.* **1999**, *339*, 481-488.
- [135] M. C. Frame, V. G. Brunton, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*, 36-43.
- [136] K. Kawakami, H. Tatsumi, M. Sokabe, *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 3125-3135.

- [137] B. Z. Katz, E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K. M. Yamada, B. Geiger, *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 1047-1060.
- [138] R. J. Pelham Jr, Y. L. Wang, *Biol. Bull.* **1998**, *194*, 348-350.
- [139] L. B. Smilenov, A. Mikhailov, R. J. Pelham, E. E. Marcantonio, G. G. Gundersen, *Science* **1999**, *286*, 1172-1174.
- [140] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, K. M. Yamada, *Science* **2001**, *294*, 1708-1712.
- [141] B. Geiger, *Science* **2001**, *294*, 1661-1663.
- [142] J. E. Murphy-Ullrich, *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*, 785-790.
- [143] S. M. Frisch, R. A. Screaton, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 555-562.
- [144] S. Pullan, J. Wilson, A. Metcalfe, G. M. Edwards, N. Goberdhan, J. Tilly, J. A. Hickman, C. Dive, C. H. Streuli, *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 631-642.
- [145] D. G. Stupack, X. S. Puente, S. Boutsaboualoy, C. M. Storgard, D. A. Cheresh, *J. Cell Biol.* **2001**, *155*, 459-470.
- [146] C. Bozzo, G. Bellomo, L. Silegno, G. Tarone, F. Altruda, *Exp. Cell Res.* **1997**, *237*, 326-337.
- [147] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science* **1997**, *276*, 1425-1428.
- [148] F. Aoudjit, K. Vuori, *Oncogene* **2001**, *20*, 4995-5004.
- [149] J. S. Damiano, *Curr. Cancer Drug Targets* **2002**, *2*, 37-43.
- [150] K. H. Shain, T. H. Landowski, W. S. Dalton, *Curr. Opin. Oncol.* **2000**, *12*, 557-563.
- [151] D. G. Stupack, D. A. Cheresh, *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3729-3738.
- [152] M. Rytomaa, L. M. Martins, J. Downward, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 1043-1046.
- [153] Y. Sonoda, Y. Matsumoto, M. Funakoshi, D. Yamamoto, S. K. Hanks, T. Kasahara, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16309-16315.
- [154] F. Aoudjit, K. Vuori, *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 633-643.
- [155] S. Kim, M. Bakre, H. Yin, J. A. Varner, *J. Clin. Invest.* **2002**, *110*, 933-941.
- [156] P. Defilippi, C. Bozzo, G. Volpe, G. Romano, M. Venturino, L. Silengo, G. Tarone, *Cell Adhes. Commun.* **1994**, *2*, 75-86.
- [157] J. J. Archelos, S. C. Previtali, H. P. Hartung, *Trends Neurosci.* **1999**, *22*, 30-38.
- [158] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cheresh, *Science* **1995**, *270*, 1500-1502.
- [159] G. Hölzemann, *Drugs* **2001**, *4*, 72-81.

- [160] K. Anselme, *Biomaterials* **2000**, *21*, 667-681.
- [161] M. Epple, S. V. Dorozhkin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3130-3146.
- [162] M. Epple, J. M. Rueger, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1999**, *47*, 1405 - 1410.
- [163] T. A. Taton, *Nature* **2001**, *412*, 491-492.
- [164] S. Weiner, H. D. Wagner, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 271 - 298.
- [165] H. C. Blair, M. Zaidi, P. H. Schlesinger, *Biochem. J.* **2002**, *364*, 329-341.
- [166] H. W. Minne, *Pharm. Unserer Zeit* **1991**, *20*, 109 - 114.
- [167] L. Capro, in *Hormone - Die chemischen Boten des Körpers*, Spektrum der Wissenschaften, Heidelberg, **1985**, pp. 129 - 140.
- [168] J. Clover, R. A. Dodds, M. Gowen, *J. Cell Sci.* **1992**, *103*, 267-271.
- [169] M. A. Horton, M. A. Nesbit, M. H. Helfrich, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *760*, 190-200.
- [170] S. Nesbitt, A. Nesbit, M. Helfrich, M. Horton, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16737-16745.
- [171] M. H. Helfrich, S. A. Nesbitt, E. L. Dorey, M. A. Horton, *J. Bone Miner. Res.* **1992**, *7*, 335-343.
- [172] L. T. Duong, G. A. Rodan, *Front. Biosci.* **1998**, *3*, d757-768.
- [173] M. A. Horton, M. L. Taylor, T. R. Arnett, M. H. Helfrich, *Exp. Cell Res.* **1991**, *195*, 368-375.
- [174] J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan, M. Rosenblatt, *Endocrinology* **1993**, *132*, 1411-1413.
- [175] M. W. Lark, G. B. Stroup, R. A. Dodds, R. Kapadia, S. J. Hoffman, S. M. Hwang, I. E. James, B. Lechowska, X. Liang, D. J. Rieman, K. L. Salyers, K. Ward, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen, *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 319-327.
- [176] J. H. Bennett, D. H. Carter, A. L. Alavi, J. N. Beresford, S. Walsh, *Arch. Oral Biol.* **2001**, *46*, 229-238.
- [177] M. Castoldi, M. Pistone, C. Caruso, A. Puddu, C. Filanti, D. Piccini, C. Tacchetti, P. Manduca, *Cell Biol. Int.* **1997**, *21*, 7-16.
- [178] K. Hulthenby, F. P. Reinholt, D. Heinegard, *Eur. J. Cell Biol.* **1993**, *62*, 86-93.
- [179] S. Gronthos, K. Stewart, S. E. Graves, S. Hay, P. J. Simmons, *J. Bone Miner. Res.* **1997**, *12*, 1189-1197.
- [180] K. E. Healy, A. Rezania, R. A. Stile, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *875*, 24-35.
- [181] A. Rezania, K. E. Healy, *J. Orthop. Res.* **1999**, *17*, 615-623.

- [182] K. H. Wlodarski, *Clin. Orthop.* **1990**, 276-293.
- [183] P. Marie, F. Debiais, M. Cohen-Solal, M. C. de Vernejoul, *Joint Bone Spine* **2000**, *67*, 150-156.
- [184] C. B. Ballas, S. P. Zielske, S. L. Gerson, *J. Cell Biochem. Suppl.* **2002**, *38*, 20-28.
- [185] D. G. Phinney, *J. Cell Biochem. Suppl.* **2002**, *38*, 7-12.
- [186] R. Langer, J. P. Vacanti, *Science* **1993**, *260*, 920-926.
- [187] M. Jacoby, *Chem. Eng. News* **2001**, *Februar*, 30-35.
- [188] Z. Schwartz, K. Kieswetter, D. D. Dean, B. D. Boyan, *J. Periodontal Res.* **1997**, *32*, 166-171.
- [189] B. Kasemo, J. Lausmaa, *Environ. Health Perspect.* **1994**, *102 Suppl. 5*, 41-45.
- [190] B. Kasemo, J. Gold, *Adv. Dent. Res.* **1999**, *13*, 8-20.
- [191] D. A. Puleo, A. Nanci, *Biomaterials* **1999**, *20*, 2311-2321.
- [192] R. Thull, *Biomol. Eng.* **2002**, *19*, 43-50.
- [193] B. D. Boyan, T. W. Hummert, K. Kieswetter, D. Schraub, D. D. Dean, Z. Schwartz, *Cells and Materials* **1995**, *5*, 323 - 335.
- [194] W. J. Hu, J. W. Eaton, T. P. Ugarova, L. Tang, *Blood* **2001**, *98*, 1231-1238.
- [195] N. Weiß, D. Klee, H. Höcker, *Biomaterialien* **2001**, *2*, 81-86.
- [196] S. G. Steinemann, *Injury* **1996**, *27*, SC16-22.
- [197] Y. Ito, M. Kajihara, Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25*, 1325-1337.
- [198] K. E. Healy, C. H. Thomas, A. Rezanian, J. E. Kim, P. J. McKeown, B. Lom, P. E. Hockberger, *Biomaterials* **1996**, *17*, 195-208.
- [199] K. M. Swart, J. C. Keller, J. P. Wightman, R. A. Draughn, C. M. Stanford, C. M. Michaels, *J. Oral Implantol.* **1992**, *18*, 130-137.
- [200] I. Bab, M. Chorev, *Biopolymers* **2002**, *66*, 33-48.
- [201] C. F. Lai, X. Feng, R. Nishimura, S. L. Teitelbaum, L. V. Avioli, F. P. Ross, S. L. Cheng, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 36400-36406.
- [202] A. K. Shah, J. Lazatin, R. K. Sinha, T. Lennox, N. J. Hickok, R. S. Tuan, *Biol. Cell* **1999**, *91*, 131-142.
- [203] T. Katagiri, N. Takahashi, *Oral Dis.* **2002**, *8*, 147-159.
- [204] J. M. Wozney, *Spine* **2002**, *27*, S2-8.
- [205] L. C. Yeh, A. D. Tsai, J. C. Lee, *J. Cell Biochem.* **2002**, *87*, 292-304.
- [206] K. Kubota, S. Iseki, S. Kuroda, S. Oida, T. Iimura, W. R. Duarte, K. Ohya, I. Ishikawa, S. Kasugai, *Bone* **2002**, *31*, 465-471.

- [207] T. Boxus, R. Touillaux, G. Dive, J. Marchand-Brynaert, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1577-1595.
- [208] A. Lendlein, *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33*, 279.
- [209] I. Gotman, *J. Endourol.* **1997**, *11*, 383-389.
- [210] O. E. Pohler, *Injury* **2000**, *31 Suppl 4*, 7-13.
- [211] B. Kasemo, J. Lausmaa, *Swed. Dent. J.* **1985**, *28*, 2819 - 2836.
- [212] C. M. Stanford, J. C. Keller, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **1991**, *2*, 83 - 101.
- [213] K. Schwager, *Laryngorhinootologie* **2002**, *81*, 178-183.
- [214] C. Yongli, Z. Xiufang, G. Yandao, Z. Nanming, Z. Tingying, S. Xinqi, *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *214*, 38-45.
- [215] J. C. Wataha, *J. Oral Rehabil.* **1996**, *23*, 79-90.
- [216] C. Larsson, P. Thomsen, B. O. Aronsson, M. Rodahl, J. Lausmaa, B. Kasemo, L. E. Ericson, *Biomaterials* **1996**, *17*, 605-616.
- [217] U. Noth, C. Hendrich, F. Merklein, T. Altvater, C. P. Rader, N. Schutze, J. Eulert, R. Thull, *Biomed. Tech. (Berl.)* **1999**, *44*, 6-11.
- [218] D. Buser, R. K. Schenk, S. Steinemann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, H. Stich, *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, *25*, 889-902.
- [219] D. A. Deporter, P. A. Watson, R. M. Pilliar, M. Pharoah, D. C. Smith, M. Chipman, D. Locker, A. Rydall, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1996**, *11*, 87-95.
- [220] D. D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, Y. F. Missirlis, *Biomaterials* **2001**, *22*, 1241-1251.
- [221] S. Kaneko, K. Tsuru, S. Hayakawa, S. Takemoto, C. Ohtsuki, T. Ozaki, H. Inoue, A. Osaka, *Biomaterials* **2001**, *22*, 875-881.
- [222] J. L. Ong, D. C. Chan, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *28*, 667-707.
- [223] J. M. Rueger, *Orthopäde* **1998**, *27*, 72-79.
- [224] D. Itoh, S. Yoneda, S. Kuroda, H. Kondo, A. Umezawa, K. Ohya, T. Ohyama, S. Kasugai, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *62*, 292-298.
- [225] R. Schnettler, E. Dingeldein, W. Tausch, T. Ritter, in *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren* (Eds.: R. Schnettler, H. Markgraf), Thieme Verlag, Stuttgart New York, **1997**, pp. 31 - 42.
- [226] C. Niedhart, F. U. Niethard, *Implant* **1997**, *3* - 6.
- [227] K. P. Gunther, H. P. Scharf, H. J. Pesch, W. Puhl, *Orthopäde* **1998**, *27*, 105-117.

- [228] T. Gerber, B. Knoblich, T. Traykova, G. Holzhüter, P. Dörfling, K.-O. Henkel, V. Bienengräber, *Osteologie* **2001**, *10*, 175-183.
- [229] R. D. Welch, B. H. Berry, K. Crawford, H. Zhang, M. Zobitz, D. Bronson, S. Krishnan, *J. Orthop. Res.* **2002**, *20*, 464-472.
- [230] R. P. del Real, J. G. Wolke, M. Vallet-Regi, J. A. Jansen, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3673-3680.
- [231] A. P. Marques, R. L. Reis, J. A. Hunt, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1471-1478.
- [232] B. Knepper-Nicolai, A. Reinstorf, I. Hofinger, K. Flade, R. Wenz, W. Pompe, *Biomol. Eng.* **2002**, *19*, 227-231.
- [233] R. A. Rozhnova, V. I. Bondarchuk, E. S. Savitskaia, E. G. Levenets, V. A. Popov, N. A. Galatenko, *Lik Sprava* **2002**, *1*, 107-110.
- [234] C. Kunze, T. Freier, E. Helwig, B. Sandner, D. Reif, A. Wutzler, H. J. Radusch, *Biomaterials* **2003**, *24*, 967-974.
- [235] C. G. Simon, Jr., C. A. Khatri, S. A. Wight, F. W. Wang, *J. Orthop. Res.* **2002**, *20*, 473-482.
- [236] S. I. Stupp, G. W. Ciegler, *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 169-183.
- [237] S. I. Stupp, J. A. Hanson, J. A. Eurell, G. W. Ciegler, A. Johnson, *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, *27*, 301-311.
- [238] H. Zeng, K. K. Chittur, W. R. Lacefield, *Biomaterials* **1999**, *20*, 377-384.
- [239] T. Matsuura, R. Hosokawa, K. Okamoto, T. Kimoto, Y. Akagawa, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1121-1127.
- [240] J. Vuola, T. Bohling, J. Kinnunen, E. Hirvensalo, S. Asko-Seljavaara, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 117-122.
- [241] C. A. Vacanti, L. J. Bonassar, M. P. Vacanti, J. Shufflebarger, *New Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1511-1514.
- [242] V. R. Hentz, J. Chang, *New Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1547-1548.
- [243] G. P. Michanetzis, N. Katsala, Y. F. Missirlis, *Biomaterials* **2003**, *24*, 677-688.
- [244] M. D. Wigod, B. Klitzman, *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, *27*, 1057-1062.
- [245] M. B. Habal, *Arch. Surg.* **1984**, *119*, 843-848.
- [246] M. C. Belanger, Y. Marois, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *58*, 467-477.
- [247] R. A. Yukna, R. O. Greer, *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, *26*, 517 - 527.
- [248] A. B. Mathur, T. O. Collier, W. J. Kao, M. Wiggins, M. A. Schubert, A. Hiltner, J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *36*, 246 - 257.

- [249] Y. Wu, C. Sellitti, J. M. Anderson, A. Hiltner, G. A. Lodoen, C. R. Payet, *J. Appl. Polym. Sci.* **1992**, *46*, 201 - 211.
- [250] A. R. Jahangir, W. G. McClung, R. M. Cornelius, C. B. McCloskey, J. L. Brash, J. P. Santerre, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 135-147.
- [251] A. Lendlein, *Chem. Unserer Zeit* **1999**, *33*, 279-295.
- [252] Q. Cai, G. Shi, J. Bei, S. Wang, *Biomaterials* **2003**, *24*, 629-638.
- [253] L. J. Chen, M. Wang, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2631-2639.
- [254] A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News* **1999**, *77*, 51-59.
- [255] S. Woerly, E. Pinet, L. de Robertis, D. van Diep, M. Bousmina, *Biomaterials* **2001**, *22*, 1095-1111.
- [256] E. M. Ooms, J. G. Wolke, M. T. van de Heuvel, B. Jeschke, J. A. Jansen, *Biomaterials* **2003**, *24*, 989-1000.
- [257] R. Thull, *Materialwiss. Werkst.* **2001**, *32*, 949-952.
- [258] J. Cordero, L. Munuera, M. D. Folgueira, *Injury* **1996**, *27*, SC34-37.
- [259] J. K. Tessmar, A. G. Mikos, A. Gopferich, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 194-200.
- [260] J. A. Neff, K. D. Caldwell, P. A. Tresco, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 511-519.
- [261] R. G. Chapman, E. Ostuni, S. Takayama, R. E. Holmlin, L. Yan, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc* **2000**, *122*, 8303-8304.
- [262] R. D. Rawlings, *Clin. Mater.* **1993**, *14*, 155-179.
- [263] A. J. Garcia, P. Ducheyne, D. Boettiger, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 48-56.
- [264] M. Duskova, Z. Smahel, M. Vohradnik, M. Tvrdek, J. Mazanek, J. Kozak, M. Kot'ova, T. Strnadel, *Aesthetic Plast. Surg.* **2002**, *26*, 274-283.
- [265] L. Raisanen, M. Kononen, J. Juhanoja, P. Varpavaara, J. Hautaniemi, J. Kivilahti, M. Hormia, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *49*, 79-87.
- [266] V. M. da Rocha Barros, L. A. Salata, C. E. Sverzut, S. P. Xavier, R. van Noort, A. Johnson, P. V. Hatton, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2895-2900.
- [267] A. Rosengren, E. Pavlovic, S. Oscarsson, A. Krajewski, A. Ravaglioli, A. Piancastelli, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1237-1247.
- [268] M. C. Pirrung, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1277-.
- [269] A. Rezania, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*, 9-19.

- [270] J. A. Hubbell, S. P. Massia, N. P. Desai, P. D. Drumheller, *Bio/Technology* **1991**, *9*, 568-572.
- [271] P. Schaffner, B. Jeschke, A. Jonczyk, C. Dahmen, M. Kantlehner, H. Kessler, B. Nies, *ESB 2002: 17th European Conference on Biomaterials. 11-14.9.2002, Barcelona, Spanien. 2002*.
- [272] S. Sofia, M. B. McCarthy, G. Gronowicz, D. L. Kaplan, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *54*, 139-148.
- [273] M. L. Cooper, J. F. Hansbrough, J. W. Polarek, *J. Burn Care Rehabil.* **1996**, *17*, 108-116.
- [274] M. Hasan, D. Bethell, M. Brust, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1132-1133.
- [275] C. D. Bain, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 506 - 512.
- [276] B. T. Houseman, M. Mrksich, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7552 - 7555.
- [277] C. Roberts, C. S. Chen, M. Mrksich, V. Martichonok, D. Ingber, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6548 - 6555.
- [278] B. T. Houseman, M. Mrksich, *Biomaterials* **2001**, *22*, 943-955.
- [279] J. P. Spatz, S. Mößmer, C. Hartmann, M. Möller, T. Herzog, M. Krieger, H. G. Boyen, P. Ziemann, B. Kabius, *Langmuir* **2000**, *16*, 407 - 415.
- [280] M. Arnold, C. Geierhaas, M. Kantlehner, H. Kessler, W. Eck, M. Grunze, M. Möller, J. P. Spatz, *in prep.*
- [281] R. Fujisawa, Y. Wada, Y. Nodasaka, Y. Kuboki, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1292*, 53-60.
- [282] R. Fujisawa, M. Mizuno, Y. Nodasaka, Y. Kuboki, *Matrix Biol.* **1997**, *16*, 21-28.
- [283] M. Gilbert, W. J. Shaw, J. R. Long, K. Nelson, G. P. Drobny, C. M. Giachelli, P. S. Stayton, *J. Biomol. Chem.* **2000**, *275*, 16213-16218.
- [284] M. Kantlehner, Dissertation, Technische Universität München **2000**.
- [285] B. Jeschke, J. Meyer, A. Jonczyk, H. Kessler, P. Adamietz, N. M. Meenen, M. Kantlehner, C. Goepfert, B. Nies, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3455-3463.
- [286] U. Hersel, M. Kantlehner, C. Dahmen, B. Jeschke, J. Meyer, A. Jonczyk, P. Adamietz, N. Meenen, H. Kessler, *Biomaterialien* **2001**, *2*, 108.
- [287] J. C. Taylor, S. E. Cuff, J. P. Leger, A. Morra, G. I. Anderson, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **2002**, *17*, 321-330.
- [288] J. M. Gold, M. Schmidt, S. G. Steinemann, *Helv. Phys. Acta* **1989**, *62*, 246-249.
- [289] K. Endo, *Dent. Mat. J.* **1995**, *14*, 185-198.

- [290] A. Rezania, R. Johnson, A. R. Lefkow, K. E. Healy, *Langmuir* **1999**, *15*, 6931-6939.
- [291] H. Zreiqat, F. A. Akin, C. R. Howlett, B. Markovic, D. Haynes, S. Lateef, L. Hanley, *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *64*, 105-113.
- [292] C. Dahmen, Dissertation, Technische Universität München, *in prep.*
- [293] J. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, J. E. Schwarzbauer, K. S. Midwood, E. S. Gawalt., *Mat. Sci. Eng: C* **2003**, *23*, 395-400.
- [294] R. Bernhardt, S. Rammelt, R. Beutner, F. Beckmann, B. Jeschke, C. Dahmen, H. Kessler, D. Scharnweber, H. Worch, *Biomaterialien* **2002**, *3*, 150.
- [295] D. D. Pless, Y. C. Lee, S. Roseman, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2348 - 2349.
- [296] D. L. Hern, J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 266-276.
- [297] G. W. Plant, S. Woerly, A. R. Harvey, *Exp. Neurol.* **1997**, *143*, 287-299.
- [298] P. Schaffner, J. Meyer, M. Dard, R. Wenz, B. Nies, S. Verrier, H. Kessler, M. Kantlehner, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **1999**, *10*, 837-839.
- [299] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 560-562.
- [300] T. Sugawara, T. Matsuda, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 1047-1052.
- [301] C. B. Herbert, T. L. McLernon, C. L. Hypolite, D. N. Adams, L. Pikus, C. C. Huang, G. B. Fields, P. C. Letourneau, M. D. Distefano, W. S. Hu, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 731-737.
- [302] Y. S. Lin, S. S. Wang, T. W. Chung, Y. H. Wang, S. H. Chiou, J. J. Hsu, N. K. Chou, K. H. Hsieh, S. H. Chu, *Artif. Organs* **2001**, *25*, 617-621.
- [303] M. Mizutani, S. C. Arnold, T. Matsuda, *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 668-675.
- [304] S. Saneinejad, M. S. Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 13-19.
- [305] W. S. Yeo, C. D. Hodneland, M. Mrksich, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 590-593.
- [306] C. Dahmen, A. Janotta, D. Dimova-Malinovska, S. Marx, B. Jeschke, B. Nies, H. Kessler, M. Stutzmann, *Thin Solid Films* **2003**, *427*, 201-207.
- [307] A. Hautanen, J. Gailit, D. M. Mann, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 1437-1442.
- [308] Y. Hirano, M. Okuno, T. Hayashi, K. Goto, A. Nakajima, *J. Biomat Sci. Polym. Ed.* **1993**, *4*, 235-243.
- [309] Y. Xiao, G. A. Truskey, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2869-2884.

- [310] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17294-17298.
- [311] D. M. Ferris, G. D. Moodie, P. M. Dimond, C. W. Gioranni, M. G. Ehrlich, R. F. Valentini, *Biomaterials* **1999**, *20*, 2323-2331.
- [312] D. J. Irvine, K. A. Hue, A. M. Mayes, L. G. Griffith, *Biophys. J.* **2002**, *82*, 120-132.
- [313] G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, L. G. Griffith, *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 1677-1686.
- [314] P. L. Stewart, C. Y. Chiu, S. Huang, T. Muir, Y. Zhao, B. Chait, P. Mathias, G. R. Nemerow, *Embo J.* **1997**, *16*, 1189-1198.
- [315] D. G. Stupack, E. Li, S. A. Silletti, J. A. Kehler, R. L. Geahlen, K. Hahn, G. R. Nemerow, D. A. Cheresh, *J. Cell Biol.* **1999**, *144*, 777-788.
- [316] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2755-2794.
- [317] A. Woods, J. B. McCarthy, L. T. Furcht, J. R. Couchman, *Mol. Biol. Cell* **1993**, *4*, 605-613.
- [318] J. Y. Wong, T. L. Kuhl, J. N. Israelachvili, N. Mullah, S. Zalipsky, *Science* **1997**, *275*, 820-822.
- [319] C. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775-781.
- [320] J. A. Hamilton, M. N. Sabesan, B. F. Gisin, L. K. Steinrauf, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 949-954.
- [321] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703.
- [322] S. Borman, *Chem. Eng. News* **2000**, 48-53.
- [323] E. J. Gordon, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, L. L. Kiessling, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 9-16.
- [324] M. Fischer, Vögtle, F., *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 934-955.
- [325] M. Mammen, E. I. Shakhnovich, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3168-3175.
- [326] G. Loidl, H. J. Musiol, M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 36-46.
- [327] G. D. Glick, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4701-4703.
- [328] F. J. Dekker, N. J. d. Mol, J. v. Ameijde, M. J. E. Fischer, R. Ruijtenbeek, F. A. M. Redegeld, R. M. J. Liskamp, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 238-242.

- [329] J. Rao, J. Lahiri, L. Isaacs, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *Science* **1998**, *280*, 708-711.
- [330] Z. Zhang, E. A. Merritt, M. Ahn, C. Roach, Z. Hou, C. L. Verlinde, W. G. Hol, E. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12991-12998.
- [331] M. J. Cloninger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742-748.
- [332] K. Sadler, J. P. Tam, *J. Biotechnol.* **2002**, *90*, 195-229.
- [333] R. Roy, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **1996**, *6*, 692-702.
- [334] I. I. Singer, S. Scott, D. W. Kawka, D. M. Kazazis, J. Gailit, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 2171-2182.
- [335] S. J. Meunier, Q. Wu, S.-N. Wang, R. Roy, *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1472-1482.
- [336] E. K. Woller, M. J. Cloninger, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 7-10.
- [337] R. E. Bruehl, F. Dasgupta, T. R. Katsumoto, J. H. Tan, C. R. Bertozzi, W. Spevak, D. J. Ahn, S. D. Rosen, J. O. Nagy, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5964-5974.
- [338] V. Marchi-Artzner, B. Lorz, C. Gosse, L. Jullien, R. Merkel, H. Kessler, E. Sackmann, *Langmuir* **2003**, *19*, 835-841.
- [339] V. Marchi-Artzner, B. Lorz, U. Hellerer, M. Kantlehner, H. Kessler, E. Sackmann, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1095-1101.
- [340] M. I. Gyongyossy-Issa, W. Muller, D. V. Devine, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *353*, 101-108.
- [341] N. Yagi, Y. Ogawa, M. Kodaka, T. Okada, T. Tomohiro, T. Konakahara, H. Okuno, *Chem. Com.* **1999**, 1687-1688.
- [342] K. Kurohane, Y. Namba, N. Oku, *Life Sci.* **2000**, *68*, 273-281.
- [343] J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933.
- [344] A. J. Schraa, R. J. Kok, A. D. Berendsen, H. E. Moorlag, E. J. Bos, D. K. Meijer, L. F. de Leij, G. Molema, *J. Contr. Release* **2002**, *83*, 241-251.
- [345] R. J. Kok, A. J. Schraa, E. J. Bos, H. E. Moorlag, S. A. Asgeirsdottir, M. Everts, D. K. F. Meijer, G. Molema, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 128-135.
- [346] H. D. Maynard, S. Y. Okada, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1275-1279.
- [347] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789-3800.

- [348] J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. Gan, R. Roy, D. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia, J. R. Baker, Jr., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 271-278.
- [349] M. Freemantle, *Chem. Eng. News* **1999**, *September 6*, 37-39.
- [350] M. Janssen, W. J. Oyen, L. F. Massuger, C. Frielink, I. Dijkgraaf, D. S. Edwards, M. Radjopadhye, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2002**, *17*, 641-646.
- [351] W. G. Dai, W. M. Saltzman, *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 349-356.
- [352] W. Dai, J. Belt, W. M. Saltzman, *Bio/Technology* **1994**, *12*, 797-801.
- [353] W. J. Kao, D. Lee, J. C. Schense, J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*, 79-88.
- [354] N. Belcheva, S. P. Baldwin, W. M. Saltzman, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* **1998**, *9*, 207-226.
- [355] I. Saiki, J. Murata, K. Matsuno, R. Ogawa, N. Nishi, S. Tokura, I. Azuma, *Jpn. J. Cancer Res.* **1990**, *81*, 660-667.
- [356] I. Saiki, J. Murata, T. Makabe, N. Nishi, S. Tokura, I. Azuma, *Jpn J. Cancer Res.* **1990**, *81*, 668-675.
- [357] I. Saiki, J. Murata, J. Iida, T. Sakurai, N. Nishi, K. Matsuno, I. Azuma, *Br. J. Cancer* **1989**, *60*, 722-728.
- [358] Y. N. Danilov, R. L. Juliano, *Exp. Cell. Res.* **1989**, *182*, 186-196.
- [359] R. B. Merrifield, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801-812.
- [360] G. Barany, N. Kneib-Cordonier, D. G. Mullen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 705 - 739.
- [361] G. B. Fields, R. I. Noble, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *35*, 161-214.
- [362] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
- [363] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
- [364] L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F. J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B. M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 457-461.
- [365] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2226.
- [366] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678 - 9683.
- [367] N. A. Solé, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399-5403.

- [368] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- [369] E. Bellis, T. Markidis, G. Kokotos, *Synthesis* **2002**, *10*, 1359-1364.
- [370] Y. Kim, F. W. Zeng, S. C. Zimmerman, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2133-2138.
- [371] S. J. E. Mulders, Brouwer, A. J., Liskamp, R. M. J., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3085-3088.
- [372] S. J. E. Mulders, Brouwer, A. J., van der Meer, P. G. J., Liskamp, M. J., *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 631-634.
- [373] J. Katajisto, T. Karskela, P. Heinonen, H. Lonnberg, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 7995-8001.
- [374] S. R. Chhabra, B. Hothi, D. J. Evans, P. D. White, B. W. Bycroft, W. C. Chan, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1603-1606.
- [375] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 5-23.
- [376] R. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel, J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 23660-23669.
- [377] P. Veprek, J. Jezek, *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 203-220.
- [378] Y. S. Klausner, M. Bodanszky, *Synthesis* **1974**, *1974*, 549 - 559.
- [379] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, G. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927 - 1930.
- [380] E. Hoffmann, A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, 585 - 590.
- [381] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 2024 - 2033.
- [382] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 3626 - 3635.
- [383] T. Shiori, K. Ninomiya, S.-I. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *90*, 6203 - 6205.
- [384] S. F. Brady, S. L. Varda, R. M. Freidinger, D. A. Schwenk, M. Mendlowski, F. W. Holly, D. F. Veber, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 3101 - 3105.
- [385] S. F. Brady, W. J. Palveda, B. H. Arison, R. M. Freidinger, R. F. Nutt, D. F. Veber, in *Peptides '83: Structure and Function, 8th Ann. Pept. Symp.* (Eds.: V. J. Hruby, D. H. Rich), Pierce Chemical Company, Illinois, **1983**, pp. 127 - 130.
- [386] C. F. McCusker, P. J. Kocienski, F. T. Boyle, A. G. Schatzlein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 547-549.
- [387] S. A. Kates, N. A. Solé, C. R. Johnson, D. Hudson, G. Barany, F. Albericio, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1549-1552.

- [388] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208.
- [389] M. Hacker, E. Lieb, J. Tessmar, U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, A. Göpferich, M. B. Schulz, *Archiv der Pharmazie* **2002**, *335 (Suppl.1)*, 112.
- [390] D. Boumrah, Campbell, M. M., Fenner, S., Kinsman, R. G., *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6977-6992.
- [391] L. Jullien, Lehn, J.-M., *J. Incl. Phen.* **1992**, *12*, 55-74.
- [392] A. Vollmar, M. S. Dunn, *J. Org. Chem.* **1960**, *25*, 387-390.
- [393] G. S. Skinner, *J. Am. Chem. Soc.* **1924**, *46*, 731-741.
- [394] Y. Yoshida, Sakakura, Y., Aso, N., Okada, S., Tanabe, Y., *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2183-2192.
- [395] M. Ito, Koyakumar, K., Ohta, T., Takaya, H., *Synthesis* **1995**, 376-378.
- [396] W. A. Herrmann, J. P. Zoller, R. W. Fischer, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *579*, 404-407.
- [397] L. A. Carpino, J.-H. Tsao, *J.C.S. Chem. Comm.* **1978**, 358-359.
- [398] E. Wünsch, L. Moroder, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1981**, *362*, 1289-1292.
- [399] R. E. Shute, D. H. Rich, *Synthesis* **1987**, 346-349.
- [400] J. S. Koh, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4494-4495.
- [401] A. B. Smith, H. Liu, H. Okumura, D. A. Favor, R. Hirschmann, *Organ. Lett.* **2000**, *2*, 2041-2044.
- [402] M. P. Lutolf, N. Tirelli, S. Cerritelli, L. Cavalli, J. A. Hubbell, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 1051-1056.
- [403] M. Johnsson, M. J. Levine, G. H. Nancollas, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **1993**, *4*, 371-378.
- [404] A. L. Boskey, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1995**, *760*, 249-256.
- [405] R. Fujisawa, Y. Kuboki, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1075*, 56-60.
- [406] B. K. Handa, C. J. Hobbs, *J. Pept. Sci.* **1998**, *4*, 138-141.
- [407] A. Thaler, D. Seebach, F. Cardinaux, *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 628-643.
- [408] T. Johnson, M. Quibell, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 463-466.
- [409] T. Wöhr, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3847-3848.
- [410] H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki, *Biomaterials* **2001**, *22*, 1253-1262.
- [411] Y. Han, F. Albericio, G. Barany, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4307-4312.

- [412] O. W. Press, J. F. Eary, F. R. Appelbaum, P. J. Martin, W. B. Nelp, S. Glenn, D. R. Fisher, B. Porter, D. C. Matthews, T. Gooley, *Lancet* **1995**, *346*, 336-340.
- [413] A. E. Frankel, D. FitzGerald, C. Siegall, O. W. Press, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 926-932.
- [414] S. J. DeNardo, G. L. DeNardo, L. F. O'Grady, E. Hu, V. M. Sytsma, S. L. Mills, N. B. Levy, D. J. Macey, C. H. Miller, A. L. Epstein, *Int. J. Cancer Suppl.* **1988**, *3*, 96-101.
- [415] T. C. Meeker, J. Lowder, D. G. Maloney, R. A. Miller, K. Thielemans, R. Warnke, R. Levy, *Blood* **1985**, *65*, 1349-1363.
- [416] A. J. Grillo-Lopez, C. A. White, C. Varns, D. Shen, A. Wei, A. McClure, B. K. Dallaire, *Semin. Oncol.* **1999**, *26*, 66-73.
- [417] E. Tan-Chiu, M. Piccart, *Oncology* **2002**, *63*, 57-63.
- [418] K. Shannon-Dorcy, *Oncol. Nurs. Forum* **2002**, *29*, E52-59.
- [419] C. J. Dunn, R. H. Foster, *Pharmacoeconomics* **1999**, *16*, 711-741.
- [420] E. L. Sievers, M. Linenberger, *Curr. Opin Oncol* **2001**, *13*, 522-527.
- [421] V. L. Gates, J. E. Carey, J. A. Siegel, M. S. Kaminski, R. L. Wahl, *J. Nucl. Med.* **1998**, *39*, 1230-1236.
- [422] G. A. Wiseman, L. I. Gordon, P. S. Multani, T. E. Witzig, S. Spies, N. L. Bartlett, R. J. Schilder, J. L. Murray, M. Saleh, R. S. Allen, A. J. Grillo-Lopez, C. A. White, *Blood* **2002**, *99*, 4336-4342.
- [423] G. A. Wiseman, C. A. White, T. E. Witzig, L. I. Gordon, C. Emmanouilides, A. Raubitschek, N. Janakiraman, J. Gutheil, R. J. Schilder, S. Spies, D. H. Silverman, A. J. Grillo-Lopez, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 3281s-3286s.
- [424] O. H. Aina, T. C. Sroka, M. L. Chen, K. S. Lam, *Biopolymers* **2002**, *66*, 184-199.
- [425] R. E. Weiner, M. L. Thakur, *Appl. Radiat. Isot.* **2002**, *57*, 749-763.
- [426] R. E. Weiner, M. L. Thakur, *Semin. Nucl. Med.* **2001**, *31*, 296-311.
- [427] S. Froidevaux, A. N. Eberle, *Biopolymers* **2002**, *66*, 161-183.
- [428] E. Koivunen, W. Arap, D. Rajotte, J. Lahdenranta, R. Pasqualini, *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 883-888.
- [429] P. B. Szecsi, E. Riise, L. B. Roslund, J. Engberg, I. Turesson, L. Buhl, C. Schafer-Nielsen, *Br. J. Haematol.* **1999**, *107*, 357-364.

- [430] N. Schmiedeberg, M. Schmitt, C. Rolz, V. Truffault, M. Sukopp, M. Bürgle, O. G. Wilhelm, W. Schmalix, V. Magdolen, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4984-4994.
- [431] R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain, J. Lahdenranta, M. Sakamoto, A. Stryhn, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro, W. Arap, E. Ruoslahti, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 722-727.
- [432] M. Essler, E. Ruoslahti, *PNAS USA* **2002**, *99*, 2252-2257.
- [433] P. Wu, J. Leinonen, E. Koivunen, H. Lankinen, U. H. Stenman, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6212-6220.
- [434] D. G. Bae, Y. S. Gho, W. H. Yoon, C. B. Chae, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13588-13596.
- [435] M. N. Fukuda, C. Ohyama, K. Lowitz, O. Matsuo, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, M. Fukuda, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 450-456.
- [436] E. Koivunen, W. Arap, H. Valtanen, A. Rainisalo, O. P. Medina, P. Heikkila, C. Kantor, C. G. Gahmberg, T. Salo, Y. T. Konttinen, T. Sorsa, E. Ruoslahti, R. Pasqualini, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 768-774.
- [437] H. Heitsch, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 913-928.
- [438] C. M. Huang, Y. T. Wu, S. T. Chen, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 453-461.
- [439] S. Radulovic, A. Nagy, B. Szoke, A. V. Schally, *Cancer Lett.* **1992**, *62*, 263-271.
- [440] A. Nagy, A. V. Schally, G. Halmos, P. Armatis, R. Z. Cai, V. Csernus, M. Kovacs, M. Koppan, K. Szepeshazi, Z. Kahan, *PNAS USA* **1998**, *95*, 1794-1799.
- [441] H. Kiaris, A. V. Schally, A. Nagy, K. Szepeshazi, F. Hebert, G. Halmos, *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 620-628.
- [442] F. M. de Groot, H. J. Broxterman, H. P. Adams, A. van Vliet, G. I. Tesser, Y. W. Elderkamp, A. J. Schraa, R. J. Kok, G. Molema, H. M. Pinedo, H. W. Scheeren, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 901-911.
- [443] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *Science* **1998**, *279*, 377-380.
- [444] Y. Chen, X. Xu, S. Hong, J. Chen, N. Liu, C. B. Underhill, K. Creswell, L. Zhang, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2434-2438.
- [445] R. P. Harbottle, R. G. Cooper, S. L. Hart, A. Ladhoff, T. McKay, A. M. Knight, E. Wagner, A. D. Miller, C. Coutelle, *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 1037-1047.

- [446] M. Colin, R. P. Harbottle, A. Knight, M. Kornprobst, R. G. Cooper, A. D. Miller, G. Trugnan, J. Capeau, C. Coutelle, M. C. Brahim-Horn, *Gene Ther.* **1998**, *5*, 1488-1498.
- [447] P. Chenevier, B. Delord, J. Amedee, R. Bareille, F. Ichas, D. Roux, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1593*, 17-27.
- [448] A. Fahr, K. Muller, T. Nahde, R. Muller, S. Brusselbach, *J. Liposome Res.* **2002**, *12*, 37-44.
- [449] A. J. Schraa, R. J. Kok, H. E. Moorlag, E. J. Bos, J. H. Proost, D. K. Meijer, L. F. De Leij, G. Molema, *Int. J. Cancer* **2002**, *102*, 469-475.
- [450] A. C. Bekkers, A. J. Slotboom, G. van Willigen, J. W. Akkerman, H. M. Verheij, *Eur. J. Biochem* **1996**, *238*, 70-76.
- [451] F. Vella, J. F. Hernandez, A. Molla, M. R. Block, G. J. Arlaud, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 415-426.
- [452] J. G. Wesseling, P. J. Bosma, V. Krasnykh, E. A. Kashentseva, J. L. Blackwell, P. N. Reynolds, H. Li, M. Parameshwar, S. M. Vickers, E. M. Jaffee, K. Huibregtse, D. T. Curiel, I. Dmitriev, *Gene Ther.* **2001**, *8*, 969-976.
- [453] L. O. Johansson, A. Bjornerud, H. K. Ahlstrom, D. L. Ladd, D. K. Fujii, *J. Magn. Res. Imaging* **2001**, *13*, 615-618.
- [454] S. Zitzmann, V. Ehemann, M. Schwab, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5139-5143.
- [455] R. Haubner, H.-J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Diefenbach, H. Kessler, G. Stöcklin, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*, 1061-1071.
- [456] R. Haubner, H. J. Wester, W. A. Weber, C. Mang, S. I. Ziegler, S. L. Goodman, R. Senekowitsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1781-1785.
- [457] R. Haubner, H. J. Wester, F. Burkhart, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler, M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.* **2001**, *42*, 326-336.
- [458] Z. F. Su, G. Liu, S. Gupta, Z. Zhu, M. Rusckowski, D. J. Hnatowich, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 561-570.
- [459] G. B. Sivolapenko, D. Skarlos, D. Pectasides, E. Stathopoulou, A. Milonakis, G. Sirmalis, A. Stuttle, N. S. Courtenay-Luck, K. Konstantinides, A. A. Epenetos, *Eur. J. Nucl. Med.* **1998**, *25*, 1383-1389.
- [460] Z. F. Su, J. He, M. Rusckowski, D. J. Hnatowich, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 141-149.

- [461] M. L. Janssen, W. J. Oyen, I. Dijkgraaf, L. F. Massuger, C. Frielink, D. S. Edwards, M. Rajopadhye, H. Boonstra, F. H. Corstens, O. C. Boerman, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6146-6151.
- [462] M. Ogawa, K. Hatano, S. Oishi, Y. Kawasumi, N. Fujii, M. Kawaguchi, R. Doi, M. Imamura, M. Yamamoto, K. Ajito, T. Mukai, H. Saji, K. Ito, *Nucl. Med. Biol.* **2003**, *30*, 1-9.
- [463] P. M. van Hagen, W. A. Breeman, H. F. Bernard, M. Schaar, C. M. Mooij, A. Srinivasan, M. A. Schmidt, E. P. Krenning, M. de Jong, *Int. J. Cancer* **2000**, *90*, 186-198.
- [464] R. Haubner, G. Sulyok, W. Weber, W. Linke, C. Bodenstein, H.-J. Wester, H. Kessler, M. Schwaiger, *Eur. J. Nucl. Med.* **2001**, *28(Suppl)*, 1175.
- [465] M. E. Phelps, J. C. Mazziotta, H. R. Schelbert, in *Positron Emission Tomography and Autoradiography. Principles and Applications for the Brain and Heart*, Raven Press, New York, **1986**, p. 690.
- [466] W. A. Weber, N. Avril, M. Schwaiger, *Strahlenther. Onkol.* **1999**, *175*, 356-373.
- [467] A. A. Wilson, R. F. Dannals, H. T. Ravert, J. J. Frost, H. N. Wagner, Jr., *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1057-1062.
- [468] G. Vaidyanathan, D. J. Affleck, J. Li, P. Welsh, M. R. Zalutsky, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 428-438.
- [469] J. E. Ryser, R. M. L. Jones, R. Egeli, A. Pelegrin, K. Rose, A. M. Kurt, M. Perin, P. E. Broquet, P. Ambrosetti, I. Fisch, S. Pochon, A. Donath, J. P. Mach, R. E. Offord, *J. Nucl. Med.* **1992**, *33*, 1766-1773.
- [470] M. Kurth, A. Pelegrin, K. Rose, R. E. Offord, S. Pochon, J. P. Mach, F. Buchegger, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1255-1261.
- [471] G. Tuchscherer, D. Grell, M. Mathieu, M. Mutter, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 185-194.
- [472] G. Tuchscherer, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8410-8422.
- [473] F. Wahl, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6861-6864.
- [474] Y. M. Zhao, S. B. H. Kent, B. T. Chait, *PNAS USA* **1997**, *94*, 1629-1633.
- [475] E. Trevisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8687-8690.
- [476] D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.

- [477] D. Boturyn, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2787-2790.
- [478] G. Thumshirn, U. Hersel, S. L. Goodman, H. Kessler, *Chem. Eur. J.* **2003**, *accepted*.
- [479] D. A. Cheresch, R. C. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 17703-17711.
- [480] S. Castel, R. Pagan, F. Mitjans, J. Piulats, S. Goodman, A. Jonczyk, F. Huber, S. Vilaro, M. Reina, *Lab. Invest.* **2001**, 81, 1615-1626.
- [481] T. Poethko, G. Thumshirn, U. Hersel, M. Schottelius, G. Henriksen, M. Herz, H. Kessler, M. Schwaiger, H.-J. Wester, *Internat. Symp. on Radiopharm. Chem., Sydney, submitted 2003*.
- [482] S. Saneinejad, M. S. Shoichet, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 50, 465-474.
- [483] S. Chandrasekaran, M. L. Tanzer, M. S. Giniger, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 3356-3366.
- [484] S. Chandrasekaran, M. L. Tanzer, M. S. Giniger, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 3367-3373.
- [485] A. Woods, R. L. Longley, S. Tumova, J. R. Couchman, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 374, 66-72.
- [486] C. M. Stanford, M. Solursh, J. C. Keller, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 47, 345-352.
- [487] J. Graf, R. C. Ogle, F. A. Robey, M. Sasaki, G. R. Martin, Y. Yamada, H. K. Kleinman, *Biochemistry* **1987**, 26, 6896-6900.
- [488] E. Ardini, B. Sporchia, L. Pollegioni, M. Modugno, C. Ghirelli, F. Castiglioni, E. Tagliabue, S. Menard, *Cancer Res.* **2002**, 62, 1321-1325.
- [489] S. Vukicevic, F. P. Luyten, H. K. Kleinman, A. H. Reddi, *Cell* **1990**, 63, 437-445.
- [490] K. Bulic, *Acta Med. Croatica* **1996**, 50, 69-74.
- [491] S. P. Massia, S. S. Rao, J. A. Hubbell, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 8053-8059.
- [492] S. P. Massia, J. A. Hubbell, *Anal. Biochem.* **1990**, 187, 292-301.
- [493] A. Sharma, J. A. Askari, M. J. Humphries, E. Y. Jones, D. I. Stuart, *Embo J.* **1999**, 18, 1468-1479.
- [494] C. G. Knight, L. F. Morton, A. R. Peachey, D. S. Tuckwell, R. W. Farndale, M. J. Barnes, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 35-40.
- [495] Y. Xu, S. Gurusiddappa, R. L. Rich, R. T. Owens, D. R. Keene, R. Mayne, A. Hook, M. Hook, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 38981-38989.

- [496] K. Tashiro, G. C. Sephel, B. Weeks, M. Sasaki, G. R. Martin, H. K. Kleinman, Y. Yamada, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 16174-16182.
- [497] L. Luckenbill-Edds, C. A. Kaiser, T. R. Rodgers, D. D. Powell, *Cell Tissue Res.* **1995**, *279*, 371-377.
- [498] J. C. Schense, J. A. Hubbell, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 75-81.
- [499] E. Williams, G. Williams, B. J. Gour, O. W. Blaschuk, P. Doherty, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4007-4012.
- [500] S. L. Cheng, F. Lecanda, M. K. Davidson, P. M. Warlow, S. F. Zhang, L. Zhang, S. Suzuki, T. St John, R. Civitelli, *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 633-644.
- [501] J. M. Ilvesaro, P. T. Lakkakorpi, H. K. Vaananen, *Exp. Cell Res.* **1998**, *242*, 75-83.
- [502] H. Y. Yoon, S. H. Lee, S. W. Cho, J. E. Lee, C. S. Yoon, J. Park, T. U. Kim, S. Y. Choi, *Neurochem. Int.* **2002**, *41*, 37-42.
- [503] J. J. Calvete, W. Schafer, K. Mann, A. Henschen, J. Gonzalez-Rodriguez, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *206*, 759-765.
- [504] B. K. Mann, J. L. West, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 86-93.
- [505] A. D. Cardin, H. J. R. Weintraub, *Arteriosclerosis* **1989**, *9*, 21-32.
- [506] M. Dettin, M. T. Conconi, R. Gambaretto, A. Pasquato, M. Folin, C. D. Bello, P. P. Parnigotto, *J. Biomed. Mater. Res.* **2002**, *60*, 466-471.
- [507] K. O. Simon, E. M. Nutt, D. G. Abraham, G. A. Rodan, L. T. Duong, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29380-29389.
- [508] K. C. Dee, T. T. Andersen, R. Bizios, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*, 371-377.
- [509] A. Hinek, *Biol. Chem.* **1996**, *377*, 471-480.
- [510] W. J. Kao, J. A. Hubbell, J. M. Anderson, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **1999**, *10*, 601-605.
- [511] M. Matsuda, S.-I. Nishimura, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 715-724.
- [512] S. Pasco, J.-C. Monboisse, N. Kieffer, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32999-33007.
- [513] T. A. Shahan, Z. Ziaie, S. Pasco, A. Fawzi, G. Bellon, J. C. Monboisse, N. A. Kefalides, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4584-4590.
- [514] J.-C. Monboisse, R. Garnotel, G. Bellon, N. Ohno, C. Perreau, J. B. Borel, N. A. Kefalides, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 25475-25482.
- [515] M. A. Schwartz, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 466-470.

- [516] M. A. Schwartz, M. H. Ginsberg, *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*, E65-68.
- [517] D. A. Lauffenburger, A. F. Horwitz, *Cell* **1996**, *84*, 359-369.
- [518] A. R. Horwitz, J. T. Parsons, *Science* **1999**, *286*, 1102-1103.
- [519] P. A. DiMilla, J. A. Stone, J. A. Quinn, S. M. Albelda, D. A. Lauffenburger, *J. Cell Biol.* **1993**, *122*, 729-737.
- [520] R. Blindt, N. Krott, P. Hanrath, J. vom Dahl, G. van Eys, A. K. Bosserhoff, *J. Mol. Cell Cardiol.* **2002**, *34*, 1633-1644.
- [521] R. Milner, X. Huang, J. Wu, S. Nishimura, R. Pytela, D. Sheppard, C. Ffrench-Constant, *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 4271-4279.
- [522] M. Delannet, F. Martin, B. Bossy, D. A. Cheresch, L. F. Reichardt, J. L. Duband, *Development* **1994**, *120*, 2687-2702.
- [523] R. Milner, G. Edwards, C. Streuli, C. Ffrench-Constant, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 7240-7252.
- [524] P. J. Keely, E. V. Rusyn, A. D. Cox, L. V. Parise, *J. Cell Biol.* **1999**, *145*, 1077-1088.
- [525] L. A. Liotta, *Cancer Res.* **1986**, *46*, 1-7.
- [526] E. H. Danen, K. M. Yamada, *J. Cell Physiol.* **2001**, *189*, 1-13.
- [527] K. M. Nicholson, N. G. Anderson, *Cell. Signal.* **2002**, *14*, 381-395.
- [528] I. R. Beavon, *Mol. Pathol.* **1999**, *52*, 179-188.
- [529] E. Ruoslahti, *Invasion Metastasis* **1994**, *14*, 87-97.
- [530] M. M. Zutter, G. Mazoujian, S. A. Santoro, *Am. J. Pathol.* **1990**, *137*, 863-870.
- [531] K. Koretz, P. Schlag, L. Boumsell, P. Moller, *Am. J. Pathol.* **1991**, *138*, 741-750.
- [532] P. G. Natali, M. R. Nicotra, C. Botti, M. Mottolese, A. Bigotti, O. Segatto, *Br. J. Cancer* **1992**, *66*, 318-322.
- [533] J. E. Bridges, P. Englefield, I. E. Boyd, W. R. Roche, E. J. Thomas, *Int. J. Gynecol. Cancer* **1995**, *5*, 187-192.
- [534] C. R. Cooper, C. H. Chay, K. J. Pienta, *Neoplasia* **2002**, *4*, 191-194.
- [535] J. I. Jones, M. E. Doerr, D. R. Clemmons, *Prog. Growth Factor Res.* **1995**, *6*, 319-327.
- [536] H. Rabb, E. Barroso-Vicens, R. Adams, J. Pow-Sang, G. Ramirez, *Am. J. Nephrol.* **1996**, *16*, 402-408.
- [537] J. S. Nam, Y. Ino, M. Sakamoto, S. Hirohashi, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2430-2436.

- [538] A. Roessner, S. Kruger, A. Kido, *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* **2000**, *84*, 69-76.
- [539] J. Ivaska, J. Heino, *Cell Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 16-24.
- [540] S. A. Rabbani, A. P. Mazar, *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2001**, *10*, 393-415, x.
- [541] H. A. Chapman, Y. Wei, D. I. Simon, D. A. Waltz, *Thromb. Haemost.* **1999**, *82*, 291-297.
- [542] J. Haier, G. L. Nicolson, *Apmis* **2001**, *109*, 241-262.
- [543] P. Kurschat, C. Mauch, *Clin. Exp. Dermatol* **2000**, *25*, 482-489.
- [544] J. Folkman, Y. Shing, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 10931-10934.
- [545] M. E. Maragoudakis, N. E. Tsopanoglou, P. Andriopoulou, *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30*, 173-177.
- [546] J. Folkman, K. Watson, D. Ingber, D. Hanahan, *Nature* **1989**, *339*, 58-61.
- [547] L. A. Liotta, P. S. Steeg, W. G. Stetler-Stevenson, *Cell* **1991**, *64*, 327-336.
- [548] M. Ziche, L. Morbidelli, R. Choudhuri, H. T. Zhang, S. Donnini, H. J. Granger, R. Bicknell, *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 2625-2634.
- [549] T. Taga, A. Suzuki, I. Gonzalez-Gomez, F. H. Gilles, M. Stins, H. Shimada, L. Barsky, K. I. Weinberg, W. E. Laug, *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 690-697.
- [550] C. D. Buckley, D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Albar, J. M. Lord, M. Salmon, *Nature* **1999**, *397*, 534-539.
- [551] S. R. Adderley, D. J. Fitzgerald, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5760-5766.
- [552] K. R. Gehlsen, W. S. Argraves, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1988**, *106*, 925-930.
- [553] Y. Yamamoto, Y. Tsutsumi, T. Mayumi, *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 123-130.
- [554] H. Komazawa, H. Fujii, M. Kojima, H. Mori, M. Ono, I. Itoh, I. Azuma, I. Saiki, *Oncol. Res.* **1995**, *7*, 341-351.
- [555] M. A. Buerkle, S. A. Pahernik, A. Sutter, A. Jonczyk, K. Messmer, M. Dellian, *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 788-795.
- [556] J. A. Posey, M. B. Khazaeli, A. DelGrosso, M. N. Saleh, C. Y. Lin, W. Huse, A. F. LoBuglio, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2001**, *16*, 125-132.
- [557] P. C. Brooks, A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157-1164.
- [558] L. E. Reynolds, L. Wyder, J. C. Lively, D. Taverna, S. D. Robinson, X. Huang, D. Sheppard, R. O. Hynes, K. M. Hodivala-Dilke, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 27-34.
- [559] P. Carmeliet, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 14-16.

- [560] R. O. Hynes, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 918-921.
- [561] Y. Maeshima, P. C. Colorado, R. Kalluri, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23745-23750.
- [562] J. Lawler, R. Weinstein, R. O. Hynes, *J. Cell Biol.* **1988**, *107*, 2351-2361.
- [563] R. Dardik, J. Lahav, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9378-9386.
- [564] W. J. Grzesik, P. G. Robey, *J. Bone Miner. Res.* **1994**, *9*, 487-496.
- [565] Z. S. Chen, J. Pohl, T. J. Lawley, R. A. Swerlick, *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *106*, 215-220.
- [566] K. Gupta, P. Gupta, A. Solovey, R. P. Hebbel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1453*, 63-73.
- [567] X. Sun, K. Skorstengaard, D. F. Mosher, *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 693-701.
- [568] W. Liu, S. A. Ahmad, N. Reinmuth, R. M. Shaheen, Y. D. Jung, F. Fan, L. M. Ellis, *Apoptosis* **2000**, *5*, 323-328.
- [569] F. M. H. de Groot, H. J. Broxterman, H. P. M. Adams, A. van Vliet, G. I. Tesser, Y. W. Elderkamp, A. J. Schraa, R. J. Kok, G. Molema, H. M. Pinedo, H. W. Scheeren, *Mol. Cancer Therap.* **2002**, *1*, 901-911.
- [570] H. B. Lin, W. Sun, D. F. Mosher, C. Garciaecheverria, K. Schaufelberger, P. I. Lelkes, S. L. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, *28*, 329-342.
- [571] H. B. Lin, C. Garciaecheverria, S. Asakura, W. Sun, D. F. Mosher, S. L. Cooper, *Biomaterials* **1992**, *13*, 905-914.
- [572] E. F. Plow, M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. Marguerie, M. H. Ginsberg, *Blood* **1987**, *70*, 110-115.
- [573] S. P. Massia, J. Stark, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*, 390-399.
- [574] R. K. Sinha, R. S. Tuan, *Bone* **1996**, *18*, 451-457.
- [575] A. J. Garcia, M. D. Vega, D. Boettiger, *Mol. Biol. Cell* **1999**, *10*, 785-798.
- [576] S. F. Retta, G. Cassara, M. D'Amato, R. Alessandro, M. Pellegrino, S. Degani, G. De Leo, L. Silengo, G. Tarone, *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3126-3138.
- [577] M. Semlitsch, H. Weber, R. Steger, *Biomed. Tech. (Berlin)* **1995**, *40*, 347-355.
- [578] J. C. Keller, C. M. Stanford, J. P. Wightman, R. A. Draughn, R. Zaharias, *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, *28*, 939-946.
- [579] G. J. Thompson, D. A. Puleo, *Biomaterials* **1996**, *17*, 1949-1954.
- [580] A. Steinert, C. Hendrich, F. Merklein, C. P. Rader, N. Schutze, R. Thull, J. Eulert, *Biomed. Tech. (Berlin)* **2000**, *45*, 349-355.
- [581] R. Thull, K. D. Handke, E. J. Karle, *Biomed. Tech. (Berlin)* **1995**, *40*, 289-295.

- [582] J. Breme, V. Wadewitz, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1989**, *4*, 113-118.
- [583] H. Fukui, W. Yang, S. Yamada, Y. Fujishiro, A. Morita, M. Niinomi, *Dent. Mater. J.* **2001**, *20*, 156-163.
- [584] J. Black, *Clin. Mater.* **1994**, *16*, 167-173.
- [585] H. Kato, T. Nakamura, S. Nishiguchi, Y. Matsusue, M. Kobayashi, T. Miyazaki, H. M. Kim, T. Kokubo, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *53*, 28-35.
- [586] S. A. Shabalovskaya, *Biomed. Mater. Eng.* **2002**, *12*, 69-109.
- [587] K. L. Kilpadi, P. L. Chang, S. L. Bellis, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *57*, 258-267.
- [588] Y. L. Chang, C. M. Stanford, J. C. Keller, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 270-278.