

Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

**Hochgradige *N*-Methylierung als Werkzeug für die Entwicklung
selektiver und stabiler peptidischer Liganden für
Melanocortinrezeptoren und Integrine**

Lucas Doedens

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. Steffen J. Glaser

Prüfer der Dissertation : 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Horst Kessler
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf

Die Dissertation wurde am 21.12.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 18.04.2012 angenommen.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, meiner lieben Kathi und meinem Sohn Emil.

Falls Gott die Welt erschaffen hat, war seine Hauptsorge sicher nicht, sie so zu machen, dass wir sie verstehen können.

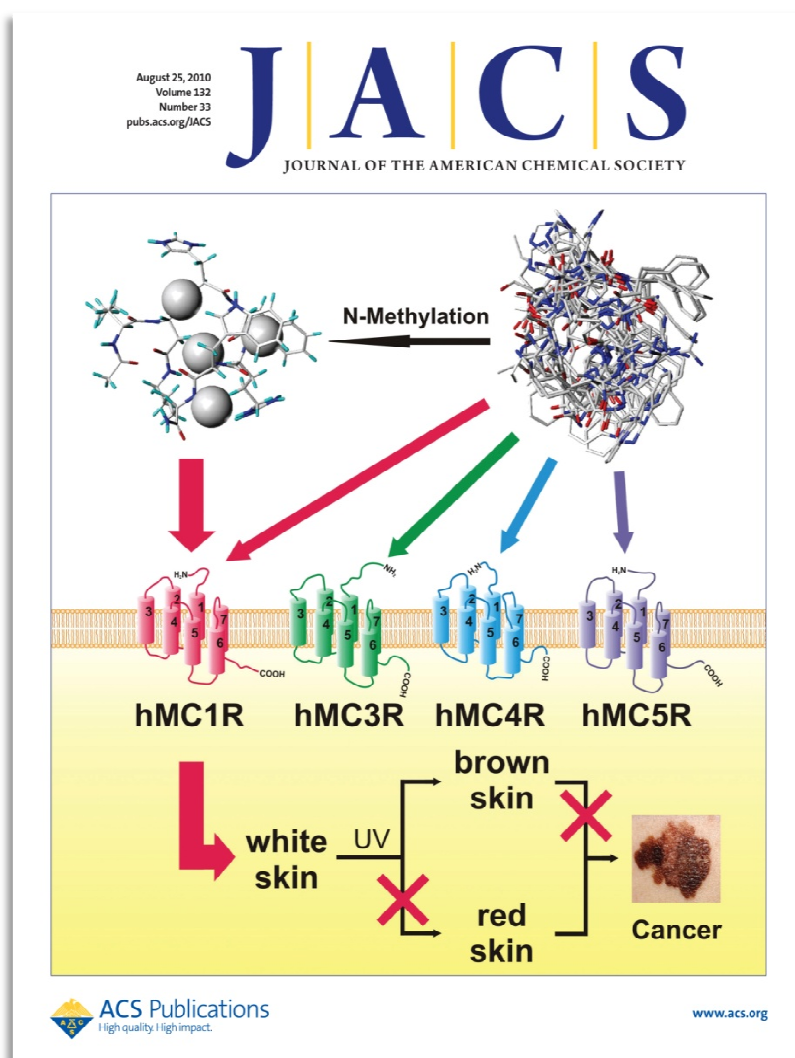
Albert Einstein
(14.03.1879-18.04.1955)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München in der Zeit von Oktober 2004 bis September 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Adv. Exp. Med. Biol. 2009, 611, 229-31

J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 8115-8128



Danksagungen

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst Kessler für die Themenstellung und für die Freiheit danken, die ich bei deren Bearbeitung hatte. Weiterhin danke ich ihm für seinen wissenschaftlichen Rat, seine Unterstützung und seiner Art und Weise, seinen Arbeitskreis zu führen, durch die eine lockere aber trotzdem sehr professionelle Atmosphäre geschaffen wurde und in der es sehr angenehm war, zu arbeiten. Die vielen gemeinsamen Ausflüge, an denen ich teilnehmen konnte, waren allesamt großartig und unvergesslich. Vielen Dank für Ihre großzügige Verteilung des „Raucherpreises“ auf die Mitarbeiter des Arbeitskreises zu diesen und anderen Anlässen. Zu guter Letzt danke ich Ihnen für Ihre Geduld.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und natürlich meiner Kathi für ihre Unterstützung und ihre unendliche Großzügigkeit und Warmherzigkeit. Ich werde Euch ewig dankbar sein!

Dann möchte ich mich bei folgenden Menschen bedanken

- Florian Opperer danke ich für die schöne gemeinsame Zeit und die tolle Zusammenarbeit.
- Eric Biron danke für die großartige Unterstützung bei der Einarbeitung in dieses Thema.
- Johannes Beck danke ich für die großartige Arbeit, die er geleistet hat. Ohne Deine Bemühungen und Ausdauer wäre unsere Publikation sicherlich nur die Hälfte wert.

- Carles Mas-Moruno danke ich für seine großartige Hilfe. Thanks buddy!
- Dominik Heckmann, meinem langjährigen Laborkollegen, danke ich für das tolle Laborklima (auch bei 32 °C) und für das Ertragen der ständigen musikalischen Beschallung.
- Dies gilt auch für Alexander Bochen. Du mußttest mich ja nicht ganz so lange ertragen. Ich hoffe, es war auszuhalten.
- Janine Eckardt... upps... Basedow danke ich für die schönen gemeinsamen Jahre als Studien- und Laborkollegen sowie als gemeinsame Bewohner der Z4.
- Florian Manzenrieder danke ich für unsere schöne gemeinsame Studienzeit und für die großzügige Blutspende. Sind die Peptide zu hart, sind Deine Enzyme zu schwach ;-).
- Timo Huber danke ich u.a für die vielen gemeinsamen Abende im Schweiß unseres Angesichts, aber auch noch für Vieles mehr
- Timo Weide danke ich für die vielen lustigen Momente, sei's im Labor, beim Skifahren und bei allen anderen Begebenheiten. Danke, Herbert!
- Stefanie Neubauer danke ich für die immer lustige Zeit.
- Florian Rechenmacher danke ich für seine tolle Arbeit, die er während seiner Praktikumszeit für mich geleistet hat, aber auch für unsere schöne gemeinsame Zeit als Kollegen im Arbeitskreis.
- Sylvain Tourel danke ich für seine großartige Hilfsbereitschaft und die schönen gemeinsamen Momente.
- Robert Jäger danke ich u.a. für die schöne gemeinsame Praktikumsbetreuung
- Meinem guten alten Freund Jörg Preis danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit.

- Meinen Praktikanten Peter Gigler, Nicolas Jacobsen, Sanna Zimmer, Valentina Korinth, Tobias Kornprobst, Anja List, Ingrid Span, Susi Vazac, Mathias Köberl und Agathe Szkola danke ich für ihre großartige Hilfe. Ich hoffe, Euch hat unsere gemeinsame Zeit genauso gefallen wie mir.
- Franz Hagn, Sandra Groscurth, Jochen Klages, Andreas Frank und allen anderen der NMR-Crew danke ich für ihre Hilfe bei allen NMR-Fragen.
- Mona Wolff für die Weitergabe ihres *know-hows*, sowie die Bereitstellung der benötigten Chemikalien.
- Dr. Rainer Haeßner und Alex Frenzel für die Hilfe bei allen Computer- und Softwareproblemen,
- Burghard Cordes für die prompte Aufnahme der ESI-Massenspektren,
- Evelyn Bruckmaier und Marianne Machule für die problemlose Abwicklung aller bürokratischen Formalitäten,
- Außerdem danke ich allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern.

Inhalt

1. Einführung.....	1
2. Grundlagen der medizinischen Chemie - Peptide und Peptidmimetika als pharmakologische Wirkstoffe	3
3. N-methylierte Peptide.....	7
3.1. Natürlich vorkommende N-methylierte Peptide.....	7
3.2. Strukturelle und pharmakologische Auswirkungen der N-Methylierungen	9
3.3. Die Synthese N-methylierter Peptide.....	10
3.3.1. Die N-Methylierung von Aminosäuren in Lösung.....	11
3.3.2. Die N-Methylierung von Aminosäuren und Peptiden an der Festphase	13
4. Allgemeine Methoden der Peptidsynthese	17
5. N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren ...	23
5.1. Das Proopiomelanocortinsystem	23
5.2. Proopiomelanocortin.....	23
5.3. Die Melanocortine	25
5.4. Das Agouti- und Agouti-Related Protein	26
5.5. Die Melanocortinrezeptoren.....	28
5.5.1. Die Struktur der Melanocortinrezeptoren	28
5.5.2. Distribution und physiologische Funktionen.....	30
5.5.3. Der Aktivierungszyklus von Melanocortinrezeptoren	33
5.6. Synthetische Liganden der Melanocortinrezeptoren	37
5.6.1. Peptidische Liganden	37
5.6.2. Nicht-peptidische Liganden	42
5.7. MT-II als Leitstruktur für einen N-Methyl-scan	43
5.8. Syntheseeziele und Synthesestrategie.....	44
5.8.1. Strategien für die Synthese der Aminosäurederivate in Lösung.....	46
5.8.2. Strategien für die Synthese der Aminosäurederivate an der Festphase	50
5.9. Ergebnisse und Diskussion	52
5.9.1. Synthese der Aminosäurederivate.....	52
5.9.2. Die Synthese der N-methylierten MT-II-Derivate.....	56
5.9.3. Ergebnisse der biologischen Tests	59

5.9.4.	Ergebnisse der NMR-Konformationsanalyse (durchgeführt von Johannes Beck in unserer Gruppe)	71
5.9.5.	Zusammenfassung und Ausblick	76
6.	<i>N</i> -Methylierte Cyclopeptide als Liganden für Integrinrezeptoren.....	79
6.1.	Integrine	79
6.2.	Einteilung und Struktur der Integrine	80
6.3.	Die Bindung von Liganden durch Integrine	81
6.4.	Integrinliganden.....	83
6.4.1.	Natürliche Integrinliganden	83
6.4.2.	Synthetische Integrinliganden	85
6.5.	Synthese zwei- und dreifach <i>N</i> -methylierter Derivate des Peptids <i>c</i> (RGDfV).....	93
6.5.1.	Synthesziel.....	93
6.5.2.	Synthesestrategie	93
6.5.3.	Ergebnisse und Diskussion	94
7.	Experimentalteil	103
7.1.	Material und Methoden.....	103
7.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	105
7.3.	Synthese der Aminosäurederivate und analytische Daten.....	115
7.4.	Synthese der <i>N</i> -methylierten MTII-Derivate	130
7.5.	Synthese der <i>N</i> -methylierten <i>cyclo</i> (RGDfV)-Derivate.....	141
7.6.	Durchführung der Tests der enzymatischen Stabilität von MT-II-Derivaten in menschlichem Blutserum	143
8.	Literaturverzeichnis.....	145

Abkürzungsverzeichnis

2-NBSCI	2-Nitrobenzensulfonylchlorid
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
ACTH	<i>Adrenocorticotrophes Hormon</i>
AGRP	<i>agouti-related protein</i>
Alloc	Allyloxycarbonyl
ASIP	<i>Agouti signal protein</i>
ASP	murines Agouti-Protein
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BTC	<i>Bis</i> -(Trichlormethyl)-carbonat; Triphosgen
Bzl	Benzoyl
d.Th.	der Theorie
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DEDCT	Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat
DIAD	Diisopropylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
DKP	Diketopiperazin
DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
Dmab	4-{4-[<i>N</i> -(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)-3-methylbutyl)amino]benzyl}ester
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
DPPA	Diphenylphosphorylazid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EE	Essigsäureethylester
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EL	extrazellulärer <i>loop</i>
ESI	<i>electron spray ionisation</i>
EtOH	Ethanol

FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FDA	<i>food and drug administration</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-ONSu	<i>N</i> -(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonyloxy)-succinimid
ges.	gesättigt
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
h	Stunden
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uroniumhexafluorophosphat
HEX	Hexan
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hMCR	humaner Melanocortinrezeptor
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTS	<i>high-throughput screening</i>
HUGO	<i>human genom project</i>
HV	Hochvakuum
Ig	Immunoglobulin
IL	intrazellulärer <i>loop</i>
L	Liter
M	molar
MCR	Melanocortinrezeptor
MeOH	Methanol
MIDAS	<i>metal ion dependent adhesion site</i>
min.	Minuten
mL	Milliliter
MMP	Matrix-Metallproteinasen
MS	Massenspektrometrie
MTBD	7-Methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en
Mtr	2,3,6-Trimethyl-4-methoxybenzolsulfonyl
NBS	2-Nitrobenzolsulfonyl
NDP-MSH	[¹²⁵ I]-[Nle ⁴ ,D ⁷ Phe]-α-MSH
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PC	Prohormonkonvertase
Pd/C	Palladium/Kohlenstoff
PG	<i>protection group</i>
PIP	Piperidin
PKA	Proteinkinase A
Pmc	2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
POMC	Proopiomelancortin
PyBOP	Benzotriazol-1-yloxy-tris-pyrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
ROESY	<i>Rotating Frame NOESY</i>
RP-HPLC	<i>reversed phase high performance liquid chromatography</i>
RT	Raumtemperatur
SAR	<i>structure activity relationship</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
SPPS	<i>solid phase peptid synthesis</i>
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butyl
TCP	Tritylchloridpolysterol
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TM	transmembrane Domäne
TNF	Tumornekrosefaktor
USF-1	<i>upstream stimulating factor-1</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol.-%	Volumenprozent
α -LPH	α -Lipotropin
β -LPH	β -Lipotropin
β -ME	β -Mercaptoethanol

1. Einführung

Sehr viele Vorgänge in Organismen basieren auf Protein-Protein-Interaktionen und werden durch diese ausgelöst, verhindert oder verändert. So beeinflusst beispielsweise die Expression des POMC-Gens (Proopiomelanocortin-Gen) eine Vielzahl von Funktionen, welche durch das daraus resultierende POMC-Protein, bzw. durch die Wechselwirkungen der Spaltprodukte des POMC-Proteins mit den Zelloberflächenrezeptoren der Melanocortinfamilie in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers gesteuert werden. Zu den Auswirkungen, die diese Wechselwirkungen haben, gehören u.a. die Braunfärbung der Haut, die Reduzierung des Appetits und damit verbunden die verminderte Aufnahme von Nahrung, die Steigerung der Libido und noch sehr viele mehr (siehe Abschnitte 5.1 bis 5.5.3).

Eine weitere Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, die Integrine, ermöglicht beispielsweise die Kommunikation der Zellen mit ihrer Umgebung durch Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen. Durch diese wird u.a. beeinflusst, ob eine Zelle überlebt oder stirbt (Apoptose) oder ob sie adheriert und wächst.

Beide Rezeptorfamilien steuern also Funktionen, die sie zu sehr interessanten Zielen für die Forschung machen. Ein Medikament, welches durch Einnahme zu einer braunen Haut bei nur geringer Sonnenexposition führt, könnte durch die schützende Wirkung des dadurch gebildeten Eumelanins zu einer Reduktion des Hautkrebsrisikos führen. Gerade das maligne Melanom wird in den letzten Jahren mit stark steigender Häufigkeit diagnostiziert, was hauptsächlich auf das geänderte Freizeitverhalten der Menschen zurückgeführt wird. Auch Störungen des Essverhaltens und erektile Dysfunktion ließen sich vermutlich durch geeignete Medikamente, die auf die entsprechenden Melanocortin-Rezeptoren zielen, behandeln.

Heutzutage ist eine große Anzahl biologisch aktiver Peptide durch chemische und biologische *screening*-Methoden bekannt. Trotz ihres hohen Potentials, ist die direkte Verwendung dieser Peptide als Medikamente stark limitiert, hauptsächlich durch ihre geringe Selektivität und Bioverfügbarkeit (siehe Abschnitt 2). Durch *N*-Methylierung von peptidischen Wirkstoffen können diese Limitierungen reduziert werden. Die Monomethylierung wird schon länger zur Modifizierung von Peptiden angewandt. Aufgrund von synthetischen Problemen sind mehrfach *N*-methylierte Peptide noch nicht systematisch

erforscht. In letzter Zeit wurden auf diesem Gebiet Fortschritte gemacht und in unserer Arbeitsgruppe synthetische Methoden entwickelt (siehe Abschnitt 3.3), welche die trotz allem immer noch schwierige Darstellung mehrfach *N*-methylierter (Cyclo)-Peptide vereinfacht und größtenteils ermöglicht. In dieser Arbeit soll diese Methodik auf MT-II, einem superpotenten aber unselektiven Liganden für die Melanocortinrezeptoren, und auf *cyclo*(RGDFV), einen hochpotenten Liganden für das $\alpha\beta$ 3-Integrin, angewendet werden.

2. Grundlagen der medizinischen Chemie - Peptide und Peptidmimetika als pharmakologische Wirkstoffe

Proteine und Peptide werden in Organismen durch Gene codiert, aus denen sie durch Transkription und Translation hervorgehen. Dabei entstehen Neurotransmitter, Hormone oder neuronale Modulatoren, Rezeptoren, Enzyme und vieles mehr. Durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen und Peptiden werden zum größten Teil die kompletten Zellfunktionen, die Signalweiterleitung und die Immunantwort gesteuert.^[1-3]

Durch diesen großen Einfluss auf Zell-Zell-Kommunikation, Metabolismus, Energiehaushalt, Immunhaushalt und viele andere wichtige Funktionen, stellen Peptide ein wichtiges *target* in der Wirkstoffforschung dar.^[4]

Zusätzlich haben Peptide viele Vorteile gegenüber synthetischen organischen Molekülen: da Peptide aus Aminosäuren aufgebaut sind, entstehen beim enzymatischen Abbau im Organismus biogene Moleküle, die im weiteren Verlauf entweder ausgeschieden oder verstoffwechselt werden. Weiterhin kann man mit Hilfe automatisierter Syntheseverfahren große Peptid-Bibliotheken mit relativ geringem Aufwand herstellen. Es existieren 20 natürlich vorkommende Grundbausteine, welche man praktisch in beliebiger Kombination zusammenfügen kann. Dadurch hat man Zugang zu Verbindungen mit einer unglaublich großen strukturellen Variabilität. Zudem kann man unter Beibehaltung der Konstitution sehr effizient eine große Anzahl von Stereoisomeren schaffen. Aufgrund dieser Vorteile erleben die peptidischen Wirkstoffe in den letzten Jahren eine Renaissance.

Allerdings unterliegt die Verwendung von Peptiden als Wirkstoffe auch starken Einschränkungen:

- Peptide sind metabolisch nicht stabil. Sie werden im Magen-Darm-Trakt und im Serum relativ schnell proteolytisch gespalten.
- Die Resorption von Peptiden nach der oralen Einnahme ist schlecht. Gründe hierfür sind ihre große molekulare Masse, ihre starken Polarität sowie das Fehlen von aktiven Transportern.

- Die Peptide können über die Leber und die Nieren schnell wieder ausgeschieden werden.

Durch die Entwicklung von Peptidmimetika versucht man, sich dieser Nachteile zu entledigen. Ein Peptidmimetikum ist eine Verbindung mit der gleichen Sekundärstruktur und anderen gleichen strukturellen Eigenschaften wie ein Peptid, welches man durch das Mimetikum als Rezeptorligand oder Enzymsubstrat ersetzen will.^[4] Um dies zu erreichen, müssen folgende Kriterien eingehalten werden:

- Das Mimetikum sollte wenige Amidbindungen besitzen oder nur solche, die proteolytisch schlecht bzw. nicht spaltbar sind.
- Es sollte ein möglichst geringes Molekulargewicht aufweisen.
- Die funktionellen Gruppen, die für die Bindung an den Rezeptor oder das Enzym essentiell sind, müssen räumlich gleich orientiert sein wie die des Peptids, um ebenfalls eine feste Bindung zu gewährleisten.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte gemacht hinsichtlich der Überführung nativer Peptide in Verbindungen mit besseren pharmakologischen Eigenschaften. Durch einen Alanin-*scan* (*Ala-scan*), also durch den sequenziellen Austausch jeder einzelnen Aminosäure eines natürlichen Peptids durch Alanin, kann man zunächst die jeweiligen Gruppen identifizieren, die zur Bindung an den Rezeptor nötig sind. Durch das Weglassen der nicht für die Bindung essentiellen Aminosäuren gelingt eine deutliche Reduzierung des Molekulargewichts. Dieses Erkennungsmotiv kann dann in ein Cyclopeptid eingebaut werden. Hiermit wird der konformative Raum der Sequenz eingeschränkt, wodurch die Rezeptorselektivität und -affinität beeinflusst wird,^[5] entweder positiv, also mit Affinitäts-/Selektivitätsgewinn, oder negativ, d.h. mit einem Verlust an Affinität oder Selektivität. Logischerweise kann eine positive Beeinflussung nur erfolgen, wenn die benötigte biologisch aktive Konformation ein Element des konformationell eingeschränkten Raums des Cyclopeptids ist. Falls dies nicht der Fall ist, kommt es zu einem Affinitätsverlust. Am besten eignen sich dafür cyclisierte Penta- und Hexapeptide, da diese *turn*-artige Strukturen einnehmen und dadurch bestimmte Konformationen stabilisieren.^[5-7]

Um die nötige räumliche Orientierung der funktionellen Gruppen zu erforschen, kann man als nächstes ein räumliches *screening* durchführen.^[8-12] Unter Verwendung der gleichen Aminosäuresequenz bzw. der gleichen chemischen Eigenschaften der Seitenketten, erreicht man dies durch den Einsatz von Aminosäuren mit veränderter Stereochemie (Enantiomere, Diastereomere), durch die Veränderung der Ringgröße des Cyclopeptids oder durch die Umkehrung der Aminosäuresequenz (Retro-Inverso-Peptide)^[13,14] sowie durch die Verwendung von Templaten.^[15] Eine weitere Möglichkeit, die strukturellen Eigenschaften von Cyclopeptiden zu verändern, ist die Verwendung von *N*-methylierten Aminosäuren. Auf diese Art und Weise wird gleichzeitig die proteolytische Stabilität erhöht.^[16] Die Methodik des *N*-Methyl-*scans* und seine Auswirkungen auf die Eigenschaften von Cyclopeptiden wird im Detail im Kapitel 3.2 näher erläutert.

Affinität, Selektivität und Stabilität sind aber nicht die einzigen Kriterien, die ein Wirkstoffkandidat erfüllen muß. Um an seinen Wirkungsort zu gelangen, muß er mit wässrigen (Zytosol) und lipophilen Medien (Membranen) interagieren können, d.h. er sollte wasserlöslich und gleichzeitig in der Lage sein, lipophile Membranen zu durchdringen. Dieses Kriterium wird nur von Verbindungen mit mittlerer Lipophilie erfüllt. Die Lipophilie wird durch den logP-Wert ausgedrückt. Er beschreibt die Verteilung einer Verbindung in Octanol und Wasser (siehe Gleichung 2-1).^[17]

$$P = \frac{[c]_{\text{Octanol}}}{[c]_{\text{H}_2\text{O}} \cdot (1 - \alpha)}$$

Gleichung 2-1: Gleichung für die Berechnung des Verteilungskoeffizienten *P* als Maß für die Lipophilie. Der Grad der Dissoziation in Wasser wird durch α angegeben.

Eine weitere wichtige Eigenschaft eines Medikaments ist die orale Bioverfügbarkeit. Der Erfolg eines Medikaments kann durchaus davon abhängig sein, ob es bequem peroral verabreicht werden kann oder ob eine andere Applikationsform gewählt werden muß. Um abzuschätzen, ob ein Wirkstoff oral verfügbar ist, wurden von CHRISTOPHER LIPINSKI *et al.* etwa 2000 oral verabreichbare Medikamente auf gemeinsame Eigenschaften analysiert. Die Ergebnisse wurden 1997 in den Lipinski-Regeln, den „*Lipinski's Rule of Five*“ bzw. „*Pfizer's rule of five*“, festgehalten.^[18,19] Demnach sollte ein Wirkstoff

folgende Eigenschaften besitzen, damit er oral verfügbar ist:

- $\text{Log } P < 5$
- Molekulargewicht $< 500 \text{ g/mol}$
- Anzahl an Wasserstoffbrückendonoren < 5
- Anzahl an Wasserstoffbrückenakzeptoren < 10
- eine der vorhergehenden Regeln darf gebrochen werden

Dabei sollte man diese Regeln mehr als einen Anhaltspunkt denn als Regel verstehen, da mehrere Beispiele existieren, bei denen Wirkstoffe Eigenschaften besitzen, die teilweise keiner dieser „Regeln“ standhalten, aber dennoch oral verfügbar sind, wie z.B. Cyclosporin. Daher wurden die Regeln 1999 von GHOSE *et al.*^[20] noch präzisiert. Die *Veber-Regeln* wiederum prognostizieren orale Verfügbarkeit für Substanzen mit weniger als 10 rotierbaren Bindungen und mit einer polaren Oberfläche von weniger als 140 \AA^2 .^[21] Das entspricht in etwa einer Verbindung mit weniger als 12 Wasserstoffbrückendonoren/-akzeptoren.

Alle diese Regeln postulieren Eigenschaften, die Verbindungen besitzen sollten, damit sie oral verfügbar sind. Jedoch ist die Erfüllung dieser Regeln auf keinen Fall eine Garantie für orale Bioverfügbarkeit, sondern viel mehr eine Voraussetzung. Sie sagen auch nichts über die metabolische Stabilität aus. Diese und andere pharmakologische Eigenschaften werden durch die ADMET-Parameter ausgedrückt. ADMET steht dabei für *adsorption, distribution, metabolism, elimination* und *toxicity*.^[22] Für die Entwicklung eines Medikaments müssen alle Parameter berücksichtigt und permanent verbessert werden.

3. N-methylierte Peptide

3.1. Natürlich vorkommende N-methylierte Peptide

Es gibt mehrere natürlich vorkommende, biologisch aktive Verbindungen, die aus N-methylierten Aminosäuren aufgebaut sind. Zu Ihnen gehören die Cyclosporine, Dolastatine, Didemnine u.a. Sie entstammen Pflanzen, Meeresorganismen und verschiedenen Mikroorganismen und haben sehr interessante pharmakologische Eigenschaften.^[23-25]

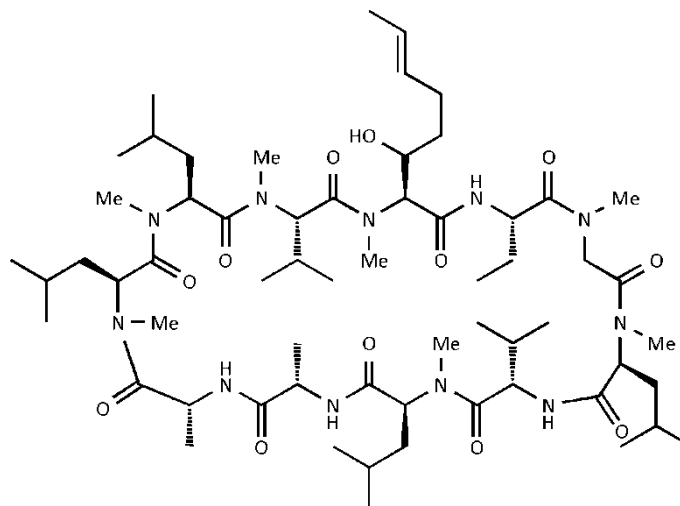


Abbildung 3-1: Cyclosporin A

Cyclosporin A (siehe Abbildung 3-1) beispielsweise wird aus *Trichoderma polysporum* gewonnen.^[26] Es handelt sich bei dieser Verbindung um ein cyclisches Undecapeptid, welches 7 N-methylierte Aminosäuren beinhaltet. Als Immunsuppressivum findet es breite Anwendung in der Transplantationsmedizin.

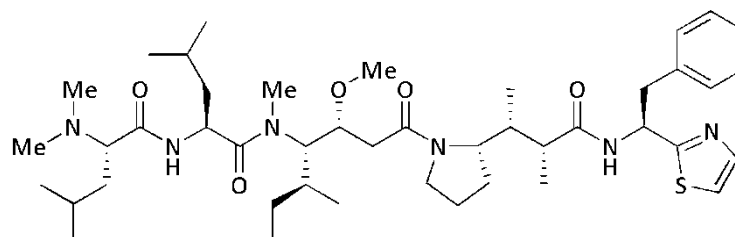


Abbildung 3-2: Dolastatin 10

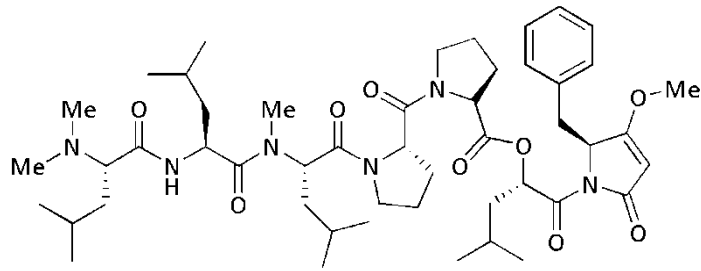


Abbildung 3-3: Dolastatin 15

Die Dolastatine (siehe Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3), eine weitere Gruppe N-methylierter linearer und cyclischer Peptide und Depsipeptide, wurden 1987 das erste Mal aus dem Seehasen (*Dolabella auricularia*) isoliert.^[27] Besonders Dolastatin 10 und Dolastatin 15 sind aufgrund ihrer stark zytostatischen Wirkung im Fokus der Krebsforschung.^[28]

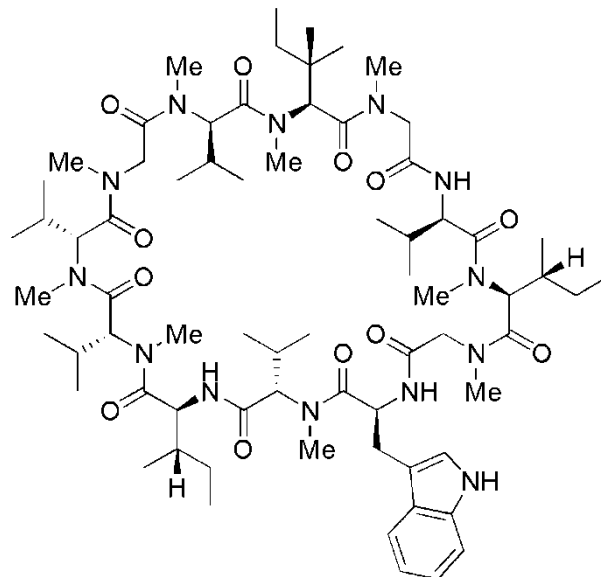


Abbildung 3-4: Omphalotin A

Omphalotin (siehe Abbildung 3-4) hingegen ist selektiv wirksam gegen phytopathogene Nematoden. Bei Omphalotin handelt es sich um ein Dodecapeptid mit 9 N-Methylgruppen. Es wurde aus dem Basidienpilz *Omphalotus olearius* isoliert.^[29]

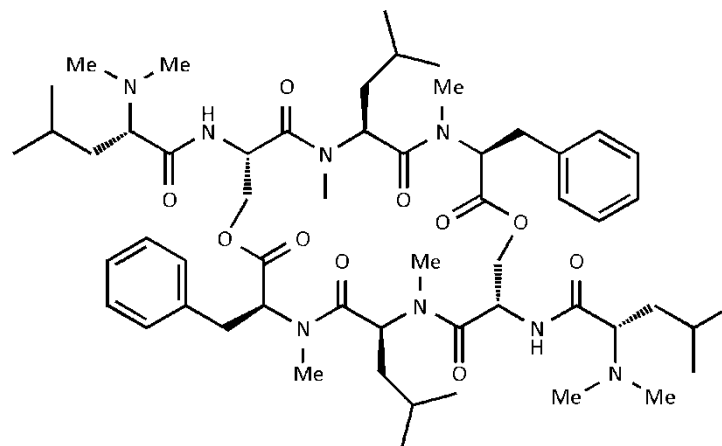


Abbildung 3-5: IB-01212

Weiterhin gibt es noch *N*-methylierte cyclische Depsipeptide, wie z.B. die Verbindung IB-01212, ein symmetrisches und cyclisches Octadepsipeptid, welches wachstumshemmend gegen zahlreiche Krebsarten wirkt (siehe Abbildung 3-5).^[30]

3.2. Strukturelle und pharmakologische Auswirkungen der *N*-Methylierungen

Im Abschnitt 2 wurden die Vorteile und die Nachteile peptidischer Wirkstoffe beschrieben. Die *N*-Methylierung wurde als eine Methode erwähnt, mit der sich die strukturellen Eigenschaften von Peptiden beeinflussen lässt, bei gleichzeitiger Verbesserung der proteolytischen Stabilität.^[31,32] Zudem kann man eine bessere Rezeptorselektivität,^[33-35] eine bessere Wirksamkeit^[36-38] und Bioverfügbarkeit^[39] erreichen. In extremen Fällen ist es sogar möglich, durch mehrfache *N*-Methylierung orale Bioverfügbarkeit zu erlangen.^[40-43]

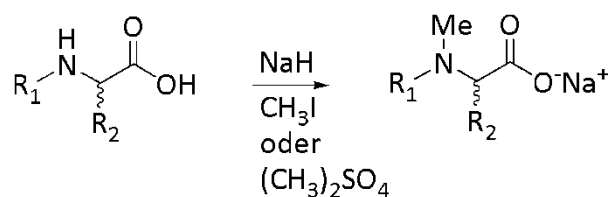
Das Konzept des *N*-Methyl-scans wurde 1973 von SUGANO *et al.* eingeführt^[44] und ist seitdem in zahlreichen Beispielen angewendet worden. Ein prominentes Beispiel ist die Synthese des cyclischen RGD-Peptids c[Arg-Gly-Asp-DPhe-(Me)Val], einem der aktivsten (0.5 nM) und selektivsten Inhibitoren für das $\alpha\beta 3$ -Integrin.^[38,45] Unter dem Namen „Cilengitide“ (Merck KGaA, Darmstadt) befindet es sich bereits in der klinischen Phase III als Medikament für die Behandlung von Gehirntumoren. Oral verfügbar ist Cilengitide jedoch nicht.

Die *N*-Methylierung beeinflusst nicht nur die Konformation der dadurch modifizierten Aminosäure, sondern auch die Konformation der in der Sequenz

vorausgehenden Aminosäure sowie des gesamten Peptid-Rückgrats.^[46] Dadurch werden intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken verhindert, die normalerweise die Konformation des Peptids stabilisieren. Es werden die enzymatischen Angriffspunkte blockiert, wodurch die proteolytische Stabilität und somit die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert werden. Gleichzeitig wird die Peptidbindung aufgrund dieser Modifikation lipophiler, wodurch das Molekül besser mit hydrophoben Bindungstaschen interagieren kann. Das wiederum kann zu einer verbesserten Membranpermeabilität führen.^[47,48] Zudem wird durch den Austausch von Amidprotonen mit Methylgruppen das Auftreten von *cis*-Peptidbindungen gegenüber *trans*-Peptidbindungen erleichtert.^[49]

3.3. Die Synthese N-methylierter Peptide

Bereits 1913 bzw. 1915 wurden von EMIL FISCHER die ersten Synthesen N-methylierter Aminosäuren durchgeführt. Damals wurden monomethylierte Aminosäuren mit Hilfe ihrer *p*-Toluolsulfonsäurederivate und Methyljodid hergestellt.^[50,51] In den frühen 1970er Jahren wurde dann eine Methode für die direkte N-Methylierung von *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc) und Benzyloxycarbonyl-geschützten (Cbz) Aminosäuren entwickelt. Dort wurde mit



R1 = Cbz, Boc
R2 = Aminosäureseitenkette

Abbildung 3-6: Die direkte Methylierung Cbz- und Boc-geschützter Aminosäuren.

Natriumhydrid und Methyljodid methyliert (siehe Abbildung 3-6), wobei eine passable Enantiomerenreinheit erreicht wurde. Es gibt zahlreiche weitere Methoden, die u.a. die direkte Methylierung,^[51-58] die reduktive Aminierung,^[59-66] die Generierung von Oxazolidinonen und deren Weiterreaktionen zu den N-Methyl-Aminosäuren^[67-71] für die Synthese N-methylierter Aminosäuren

verwenden. Einige Strategien befassen sich mit dem Gebrauch von Immoniumionen in Diels-Alder-/Retro-Diels-Alder-Sequenzen,^[72] der nucleophilen Substitution von Triflaten,^[73] der Hydroxyaminierung chiraler Enolate^[74] und der Mitsunobu-Reaktion.^[75] Es sollen im weiteren Verlauf die gebräuchlichsten und für diese Arbeit verwendeten Methoden beschrieben werden.

3.3.1. Die N-Methylierung von Aminosäuren in Lösung

Eine sehr gängige und allgemein anerkannte Methode, Fmoc-Aminosäuren zu methylieren, wurde von FREIDINGER *et al.* entwickelt.^[67] Bei dieser Methode handelt es sich um eine zweistufige Synthese, wobei im ersten Schritt die 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-geschützte (Fmoc) Aminosäure mit Paraformaldehyd zum 5-Oxazolidinon reagiert, welches im zweiten Schritt mit Trifluoressigsäure (TFA) und Triethylsilan geöffnet wird (siehe Abbildung 3-7). Als Produkt bleibt die N-methylierte Fmoc-Aminosäure, die dann direkt in der Festphasensynthese verwendet werden kann. Diese Reaktion liefert

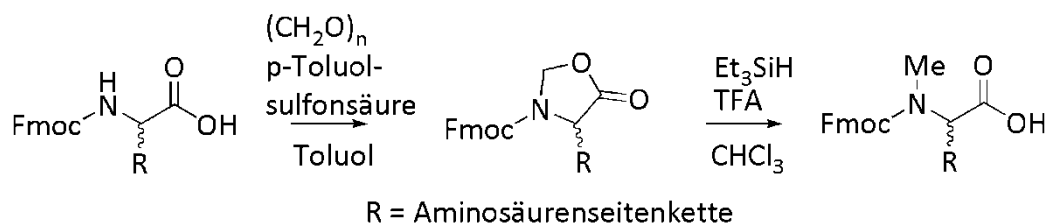
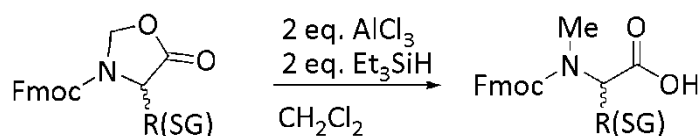


Abbildung 3-7: Die FREIDINGER-Methode^[67] zur N-Methylierung Fmoc-geschützter Aminosäuren.

oftmals sehr gute Ausbeuten. Leider funktioniert sie nur mit Aminosäuren ohne funktionelle Gruppen in den Seitenketten. Außerdem ist aufgrund des stark sauren zweiten Reaktionsschritts die Verwendung von säurelabilen Schutzgruppen nicht möglich. Durch eine Erweiterung dieser Methode konnte dies zum Teil ermöglicht werden. Dabei wird zum Öffnen des 5-Oxazolidinons anstatt Trifluoressigsäure (TFA) eine Lewissäure verwendet (Abbildung 3-8).^[76]

3 N-methylierte Peptide



SG = Boc, Bz, tBu, Alloc, Cbz

Abbildung 3-8: Die Oxazolidinonöffnung mit Hilfe von Lewis-Säure als Erweiterung der FREIDINGER-Methode erlaubt die Verwendung von säurelabilen Schutzgruppen.^[76]

Erkauft wird diese leicht universellere Anwendung mit einem weiteren Reinigungsschritt des finalen Produkts. Eine weitere Verbesserung der ursprünglichen Reaktion konnte durch den Einsatz von Mikrowellenstrahlung erreicht werden.^[77] Dadurch reduziert sich die Reaktionszeit von ca. einem Tag für beide Reaktionsschritte deutlich, da unter Mikrowelleneinfluss ca. drei Minuten für die Bildung des Oxazolidinons und nur eine Minute für den zweiten Reaktionsschritt, die Öffnung des Oxazolidinons zur N-methylierten Fmoc-Aminosäure, benötigt werden.

Eine weitere Methode zur N-Methylierung verschiedener Aminosäuren mit gängigen Seitenkettenschutzgruppen wurde von BIRON *et al.*^[78] in unserem Arbeitskreis eingeführt (siehe Abbildung 3-9). Diese Methode ist kompatibel mit der Fmoc-Strategie der Festphasensynthese und basiert auf der Synthese N-methylierter Aminosäuren über ihre Sulfonamide (siehe auch Abschnitt 3.3.2).

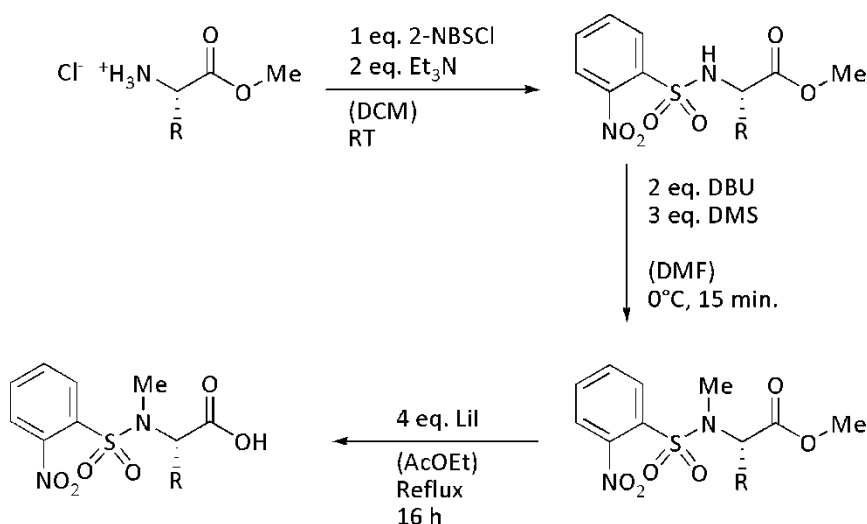


Abbildung 3-9: Die Synthese von N^α-Methyl-N^α-o-NBS-α-Aminosäuren in Lösung nach BIRON *et al.*^[78]

Sie umfaßt drei Schritte und geht von den α -Aminosäuremethylestern aus, die im ersten Schritt mit der SCHOTTEN-BAUMANN-Prozedur^[79] mit 2-NBSCl und Et₃N in die *ortho*-Nitrobenzolsulfonyl-geschützten (*o*NBS) Derivate überführt werden. Im zweiten Schritt wird die α -Aminofunktion mit Dimethylsulfat und DBU in nur 15 Minuten alkyliert. Im dritten Schritt erfolgt die Verseifung des Methylesters. Da N^α -Methyl- N^α -*o*-NBS- α -Aminosäuren bekanntermaßen leichter racemisieren als normale Aminosäureester,^[53,66,80] muß die Verseifung auf eine milde und neutrale Art und Weise erfolgen. Dabei hat sich Lithiumiodid in refluxierendem Essigsäureethylester als Methode der Wahl herausgestellt. Nach 16 Stunden erhält man die N^α -Methyl- N^α -*o*NBS- α -Aminosäuren ohne jede weitere Aufreinigung in Ausbeuten von 83-99%. Lediglich bei tritylgeschütztem Cystein und Histidin sind die Ausbeuten besonders im Verseifungsschritt eher schlecht (35% bzw. 33%).^[78] Anschließend können die *N*-methylierten Aminosäurederivate in der Festphasensynthese verwendet werden. Nach dem Ankuppeln wird die *o*-NBS-Schutzgruppe mit 2-Mercaptoethanol und Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), wie im Abschnitt 3.3.2 beschrieben, an der Festphase entfernt. Durch die direkte Verwendung der *o*NBS-geschützten Aminosäuren für die Festphasensynthese, erspart man sich eine etwas mühsamere und längere Entschützungsprozedur in Lösung mit geringeren Ausbeuten. Zudem sind die *o*-NBS-geschützten Aminosäuren länger lagerfähig.

3.3.2. Die *N*-Methylierung von Aminosäuren und Peptiden an der Festphase

Im Unterschied zu den oben erwähnten Methoden besteht die Möglichkeit, Aminosäuren an der Festphase zu *N*-methylieren. Die dafür gebräuchlichste und effizienteste Methode wurde zuerst von MILLER und SCANLAN beschrieben (siehe Abbildung 3-10).^[81,82]

3 N-methylierte Peptide

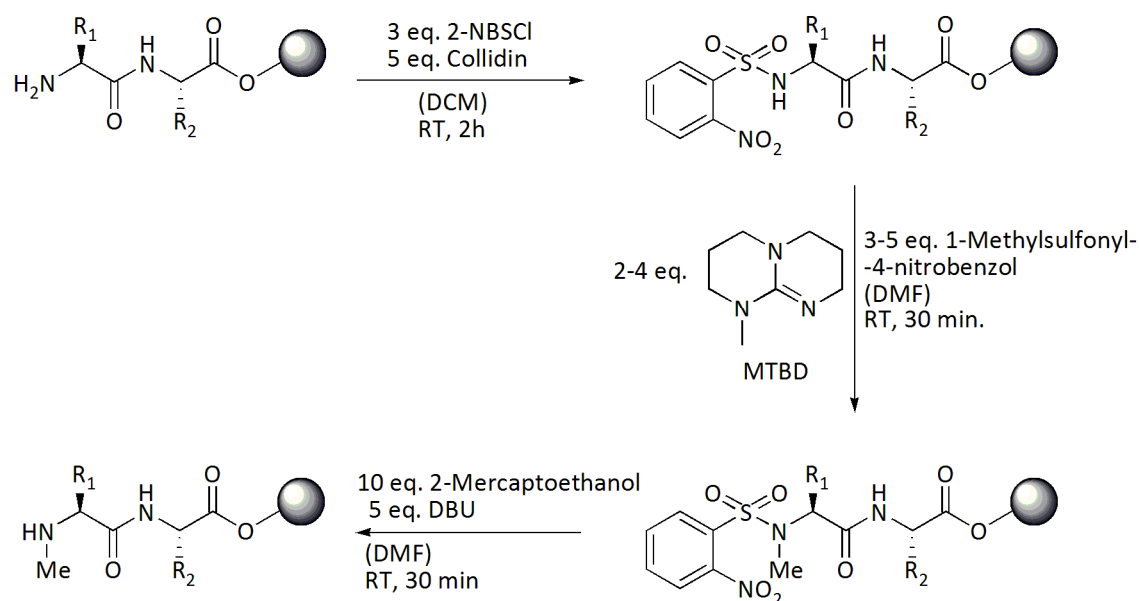


Abbildung 3-10: Die dreistufige Synthese für die N-Methylierung der N-terminalen Aminosäure an der Festphase nach MILLER und SCANLAN.^[81]

Das Peptid wird dabei bis zu der Aminosäure synthetisiert, die N-methyliert werden soll. Zunächst wird die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Als nächstes wird die freie Aminofunktion mit *o*-Nitrobenzolsulfonylchlorid (2-NBSCI) als Sulfonamid geschützt. Für die anschließende Alkylierung stehen mehrere Möglichkeiten zur Wahl. Zum einen kann sie durch Alkylierungsreagenzien wie Dimethylsulfat oder 1-Methylsulfonyl-4-nitrobenzol erfolgen. Die Deprotonierung des Sulfonamids wird hierbei mit der starken, sterisch anspruchsvollen und nicht-ionischen Base 7-Methyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-en (MTBD) vorgenommen. Zum anderen gelingt die Methylierung auch unter Mitsunobu-Bedingungen. Das harzgebundene Sulfonamid wird dabei mit Triphenylphosphin, MeOH und Diethylazodicarboxylat (DEAD) oder Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) umgesetzt.^[83] Nun erfolgt die Entfernung der *o*-NBS-Schutzgruppe durch nucleophile aromatische Substitution^[84] mit β -Mercaptoethanol und DBU.^[81] Ein Nachteil dieser Prozedur sind die relativ langen Reaktionszeiten. Alle drei Schritte zusammen benötigen eine Reaktionszeit von mehr als drei Stunden. Weiterhin ist die Base MTBD sehr teuer. Um diese Nachteile zu beseitigen, wurde dieses Verfahren von BIRON *et al.* optimiert (siehe Abbildung 3-11).^[78]

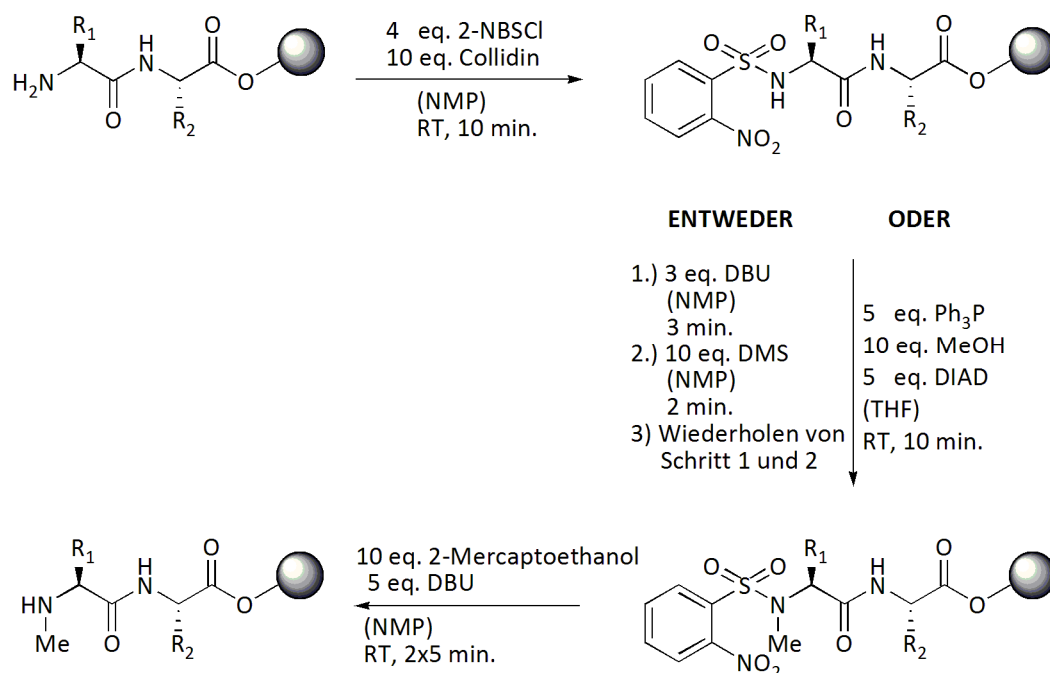


Abbildung 3-11: Die durch BIRON *et al.* verbesserte Festphasensynthese N-methylierter Aminosäuren und Peptide. ^[78]

Durch die Verwendung von N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) anstatt Dichlormethan (DCM) als Lösungsmittel und Collidin (10 eq.) als Base, erfolgt im ersten Schritt das Schützen der freien Aminofunktion mit *o*-NBSCl (4 eq.) als *o*-Nitrobenzolsulfonsäureamid in nur 15 Minuten mit einer Reinheit von > 99% ohne sichtbare Racemisierung. Auch der zweite Schritt, die Alkylierung, konnte durch die Verwendung von DBU (3 eq.) als Base anstatt MTBD wesentlich ökonomischer gestaltet werden. Mit 10 eq. Dimethylsulfat (DMS) als Alkylierungsmittel und NMP erhält man eine Ausbeute von > 99%, ebenfalls ohne Racemisierung. Alternativ kann man die Alkylierung auch unter MITSUNOBU-Bedingungen durchführen. Dadurch kann man Nebenreaktionen vermeiden, die bei der Alkylierung von His(Trt) mit DMS entstehen.^[85] Bei dieser Prozedur von YANG und CHIU^[83] reagieren 5 eq. PPh₃, 10 eq. MeOH und 5 eq. DEAD in Tetrahydrofuran (THF) mit dem NBS-geschützten N-Terminus innerhalb von einer Stunde zum methylierten Produkt. Auch hier konnte die Reaktionszeit durch BIRON *et al.*^[78] mit Hilfe von HPLC-monitoring auf 10 Minuten gesenkt werden. Somit ist diese Alkylierungsvariante eine sehr gute Alternative und kompatibel mit den gängigen Aminosäuren, auch mit His(Trt). Einzig den Lösungsmittelwechsel von NMP auf THF kann man als nachteilig auffassen. Allerdings ist kein absolutes THF nötig, wie teilweise angegeben wird.^[85]

3 N-methylierte Peptide

Das Entschützen der NBS-Schutzgruppe ist ebenfalls mit geringem zeitlichem Aufwand verbunden. Durch den Austausch von DMF gegen NMP konnte die Reaktionszeit bei Verwendung von 10 eq. β -Mercaptoethanol und 5 eq. DBU von 30 Minuten^[81,82] auf 2 x 5 Minuten gesenkt werden.^[78] Das Entschützen funktioniert vorteilhafterweise nur für methylierte Aminofunktionen.

Trotz dieser und zahlreicher weiterer Methoden, sind die käuflich erwerbbaeren N-methylierten Aminosäuren zu einem Großteil immer noch sehr teuer.^[86]

4. Allgemeine Methoden der Peptidsynthese

Für die Synthese der Peptide wurde im Rahmen dieser Arbeit die von R. B. MERRIFIELD 1963 entwickelte Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS) verwendet.^[87,88] Bei dieser Methode wird im ersten Schritt eine partiell geschützte Aminosäure über einen dazu orthogonalen *Linker* (siehe Abbildung 4-1) an einen polymeren Träger gebunden. Als polymere Träger werden v.a. mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrolharz und TentaGel-Harz (Polystyrolharz mit zusätzlichem Polyethylenglykol-*Linker*) verwendet. Die Festphasensynthese ermöglicht nahezu quantitative Umsätze durch den Einsatz von Reagenzien in hohen Überschüssen. Anschließend können sich in Lösung befindliche Nebenprodukte und nicht abreagierte Reagenzien von der Festphase durch Filtration abgetrennt werden.

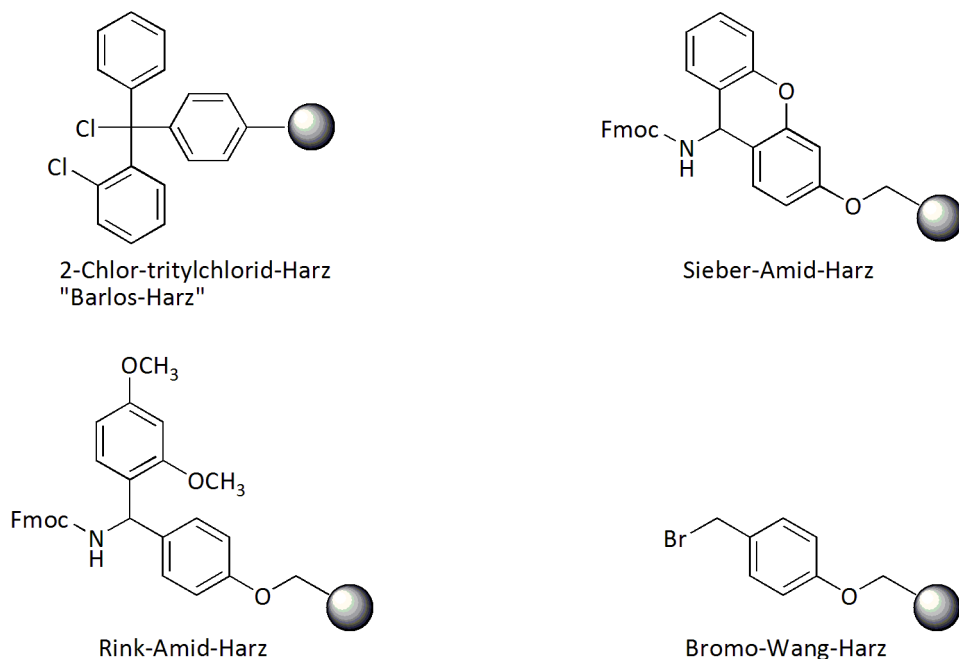


Abbildung 4-1: Verschiedene *Linker*-Typen für die SPPS.

Die Art des *Linkers* entscheidet über die Reaktionsbedingungen, unter denen die erste Aminosäure an den polymeren Träger gekuppelt wird und unter denen sich das fertige Peptid wieder abspalten lässt. Im Falle der Amid-Harze wird die erste Aminosäure an die zuvor Fmoc-entschützte Aminofunktion des

4 Allgemeine Methoden der Peptidsynthese

Linkers mit Hilfe von Kupplungsreagenzien gekuppelt. Beim Abspalten von der festen Phase durch 95%-ige TFA-Lösung erfolgt bereits eine Modifikation des Peptids: man erhält kein freie Carboxylfunktion am C-Terminus, sondern ein Säureamid. Beim Tritylchloridpolysterol-Harz (TCP-Harz) erfolgt eine Abspaltung schon durch Essigsäure bzw. Hexafluoroisopropanol (HFIP) (siehe Abbildung 4-2).

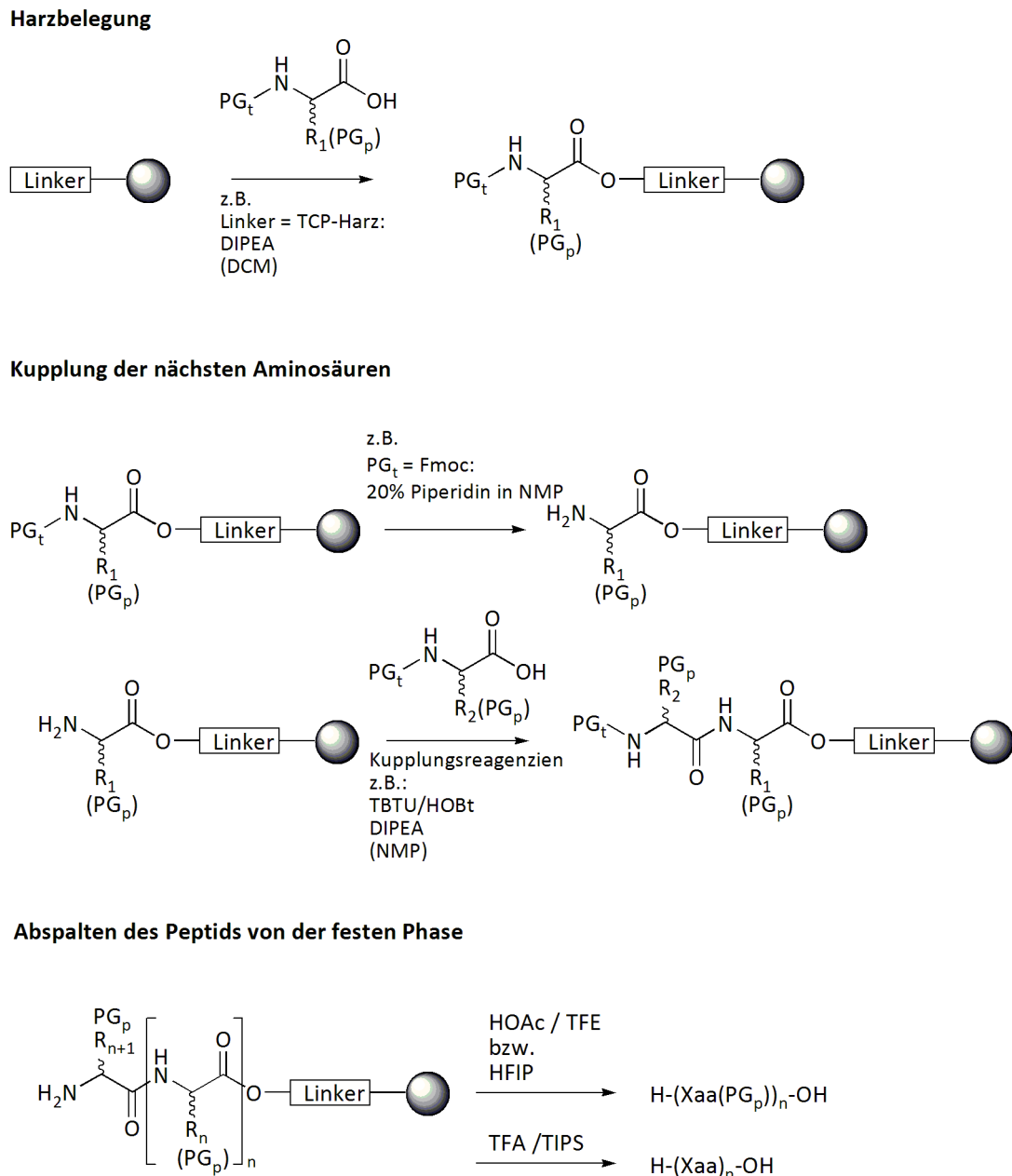
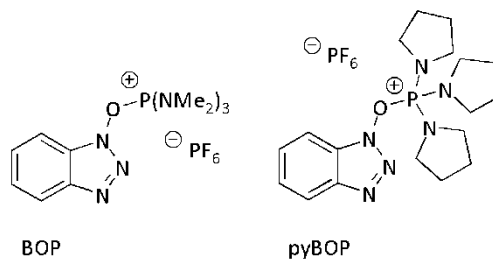


Abbildung 4-2: Systematische Darstellung der Synthese von Peptiden nach MERRIFIELD und CARPINO. PG_p: permanente Schutzgruppe; PG_t: temporäre Schutzgruppe; Xaa: Aminosäure.^[87,88]

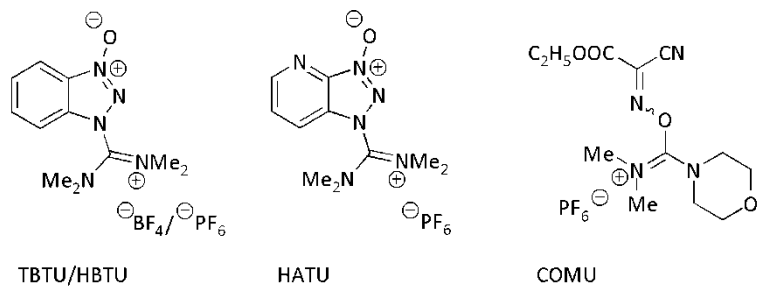
Die Peptide wurden mit Hilfe der Fmoc/*tert*-Butyl-Schutzgruppenstrategie von CARPINO *et al.* synthetisiert.^[87,88] Der Aufbau der Peptide erfolgt vom C-Terminus zum N-Terminus. Als temporäre Schutzgruppen dienen dabei die Fmoc-Schutzgruppe und die *o*NBS-Schutzgruppe. Diese können unter relativ milden basischen Bedingungen, z.B. im Falle der Fmoc-Schutzgruppe durch eine 20 %-ige Lösung aus Piperidin in NMP oder *N,N*-Dimethylformamid (DMF) abgespalten werden.

Tabelle 4-1: Übersicht über häufig verwendete Kupplungsreagenzien.

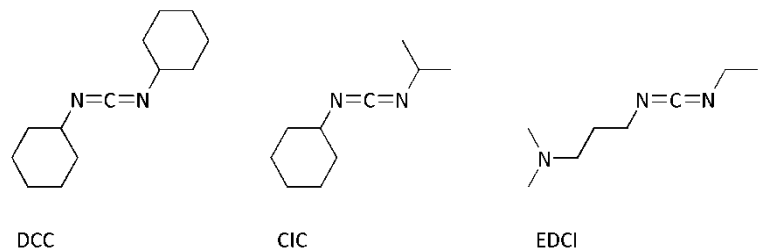
Phosphoniumreagenzien



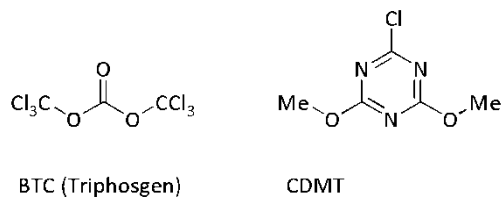
Uroniumreagenzien



Carbodiimidreagenzien



säurehalogenierende Reagenzien



Nachdem die erste Aminosäure über den *Linker* mit der festen Phase verbunden wurde, wird im nächsten Schritt zunächst die temporäre Schutzgruppe entfernt, bevor eine weitere temporär geschützte Aminosäure gekuppelt werden kann. Durch Wiederholung dieses Vorgangs wird die Darstellung der Peptidkette mit der gewünschten Aminosäuresequenz erreicht (siehe Abbildung 4-2).

Für das Kuppeln einer Aminosäure an eine andere steht inzwischen ein großes Arsenal an Kupplungsreagenzien zur Verfügung (siehe Tabelle 4-1). Dabei wurde im Rahmen dieser Arbeit für Kupplungen an nicht-*N*-methylierte Aminosäuren hauptsächlich 2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) verwendet. Für Kupplungen an *N*-methylierte Aminosäuren kam *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU) zum Einsatz, weil dort die Kupplungseffizienz von TBTU nicht mehr ausreicht. TBTU und HATU gehören zu der Klasse der Uronium-Reagenzien. Bei diesen wird im ersten Reaktionsschritt eine sehr reaktive Acyluronium-Spezies gebildet, die dann durch die gute Abgangsgruppe 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) bzw. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt) substituiert wird. Das Acyluroniumintermediat kann über den Urethansauerstoff einer Carbamatschutzgruppe zum 5(4*H*)-Oxazol cyclisieren, welches unter Basenkatalyse sehr leicht epimerisieren kann. Deshalb gibt man geeignete Additive (siehe Abbildung 4-3) zum Reaktionsgemisch, welche das reaktive Acyluroniumderivat abfangen und das Gleichgewicht zum Aktivester verschieben.^[89,90] Im Falle von TBTU gibt man beispielsweise HOBt, und im Falle von HATU gibt man HOAt zu. Es hat sich zudem gezeigt, dass durch Zugabe dieser Additive die Reaktionsrate erhöht werden kann.^[91] Bei Verwendung von Carbodiimiden, verhindert der Zusatz dieser Additive die Bildung der *N*-acylierten Carbodiimide. Durch den Einsatz sterisch anspruchsvoller bzw. schwacher Basen, kann die Racemisierung weiterhin unterdrückt werden.

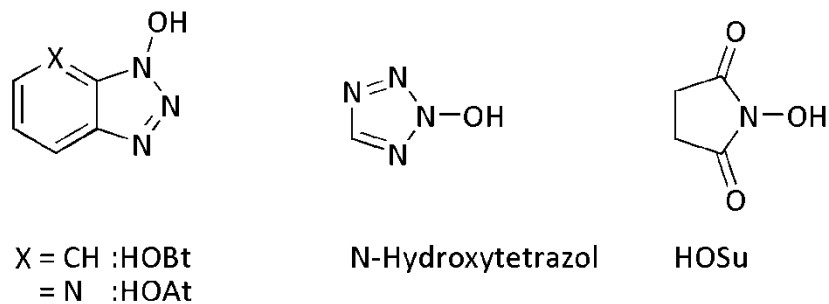


Abbildung 4-3: Einige Additive für die Kupplung von *in situ*-aktivierten Aminosäuren.

Damit es nicht zu Nebenreaktionen mit funktionellen Gruppen der Seitenketten kommt, werden diese durch permanente, orthogonale Schutzgruppen geschützt. Für Fmoc-Aminosäuren werden standardmäßig säurelabile Schutzgruppen verwendet. Werden diese abgespalten, entstehen Carbokationen, die u.U. nucleophile Aminosäureseitenketten irreversibel alkylieren. Dies lässt sich durch den Zusatz von Abfangreagenzien (*scavenger*) vermeiden. Dabei handelt es sich um Nucleophile wie Thioanisol oder Ethandithiol,^[92] welche die Kationen abfangen. Diese recht geruchsintensiven und teilweise stark giftigen Thiole werden neuerdings durch das geruchslose aber sehr effektive Triisopropylsilan (TIPS) ersetzt.^[93] Sollen einzelne Seitenketten selektiv entschützt werden, bietet sich der Einsatz von weiteren orthogonalen Schutzgruppen an (siehe Tabelle 4-2). Dafür eignen sich beispielsweise photolabile Schutzgruppen oder Schutzgruppen, die unter anderen chemischen Bedingungen abgespalten werden können, wie z.B. durch die Einwirkung von Pd^0 (Allyl/Alloc) oder Hydrazinhydrat (Dmab).

Tabelle 4-2: Häufig verwendete Seitenkettenschutzgruppen für ausgewählte Aminosäuren.

Aminosäure	Schutzgruppe	Abkürzung
Lysin	Allyloxycarbonyl	Alloc
	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	Boc
Tryptophan	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	Boc
Arginin	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl	Pbf
Histidin	Tryl	Trt
Asparaginsäure	<i>tert</i> -Butylester	<i>t</i> Bu
	Allylester	Allyl

Die Abspaltung des linearen Peptides erfolgt bei Verwendung eines Tritylchlorid-*Linkers* unter schwach sauren Bedingungen, z.B. mit HFIP^[94] oder durch eine Lösung aus Essigsäure und Trifluorethanol in DCM. Sollen gleichzeitig säurelabile Seitenkettenschutzgruppen entfernt werden, benötigt man stärker saure Bedingungen, welche man durch Gemische aus TFA, Wasser und TIPS als Abfangreagenz erreichen kann. Beim Rink-Amid-Harz wird zur Abspaltung eine 95%-ige TFA-Lösung benötigt, sodass man hier bei Verwendung von säurelabilen Schutzgruppen immer ein vollständig entschütztes Peptid als Abspaltprodukt erhält.

Bei Cyclisierungen unterscheidet man prinzipiell zwischen *backbone-to-backbone*-, *sidechain-to-sidechain*- und *backbone-to-sidechain*-Cyclisierungen.^[86] Diese können durch die Reaktion eines Carboxylats mit einer Aminofunktion unter Knüpfung einer neuen Amidbindung realisiert werden. Es sind aber auch andere Verknüpfungen denkbar, z.B. in Form von Disulfidbrücken. Wird über eine Amidbindung cyclisiert, muss wie bei der normalen Peptidkupplung die Carboxylfunktion aktiviert werden. Hierbei kann man sich der zahlreichen Kupplungsreagenzien bedienen, jedoch hat sich für diesen Zweck die Cyclisierung in Lösung mit DPPA und NaHCO₃ als Base sehr bewährt. Die Reaktion wird nach dem Verdünnungsprinzip durchgeführt, d.h. mit einer Peptidkonzentration von $\leq 1 \cdot 10^{-3}$ mol/L, um intermolekulare Reaktionen zwischen den linearen Peptiden auszuschließen. Bei *sidechain-to-sidechain*-Cyclisierungen ist aber durchaus eine Durchführung der Reaktion an der festen Phase möglich, obwohl sie erfahrungsgemäß den Cyclisierungen in Lösung oftmals unterlegen sind. Durch die relativ hohe effektive Konzentration der reaktiven Gruppen können Nebenreaktionen wie beispielsweise Cyclodimerisierungen viel öfter und stärker auftreten. Bei Cyclisierungen an der Festphase kann z.B. durch Zugabe von Kupplungsreagenzien eine entschützte Carboxylfunktion an eine Aminofunktion gekuppelt werden.

5. *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

5.1. Das Proopiomelanocortinsystem

Das Proopiomelanocortinsystem umfasst das Präprohormon Proopiomelanocortin (POMC), die aus POMC hervorgehenden zahlreichen hormonellen Spaltprodukte und die fünf verschiedenen Melanocortinrezeptoren, auf welche diese hormonellen Produkte agonistisch wirken, wodurch eine große Zahl physiologischer Funktionen im Körper reguliert wird. Zusätzlich zu den vom POMC abstammenden hormonellen *messengern* existieren noch zwei natürlich vorkommende und miteinander konkurrierende Antagonisten, Agouti und *agouti-related protein* (AGRP), die ebenfalls wichtige regulierende Rollen im POMC-System einnehmen.

5.2. Proopiomelanocortin

POMC ist ein 31 kDa großes Protein, welches die Aminosäuresequenzen einer Reihe biologisch wichtiger Hormone beinhaltet, selbst aber funktionell inaktiv ist (siehe Abbildung 5-1). Der Name „Proopiomelanocortin“ beinhaltet die drei Hormonklassen, für welche POMC das Präprohormon darstellt: die Melanotropine und Corticotropin, welche unter dem Begriff Melanocortine zusammengefasst werden, und die opiatähnlichen Peptide oder Opioiden. Das POMC-Gen wird hauptsächlich in zwei Bereichen der Hypophyse, nämlich dem Hypophysenvorderlappen und dem Hypophysenzwischenlappen, exprimiert. Die produzierenden Zellen im Hypophysenvorderlappen heißen kortikotrophe Zellen, und im Hypophysenzwischenlappen melanotrophe Zellen.^[95] POMC-mRNA wurde aber auch in zahlreichen anderen Gewebearten, wie z.B. im Gehirn, auf Lymphozyten, im Hoden, in der Haut, in der Schilddrüse, der Plazenta, der Bauchspeicheldrüse, im Darm, in der Nebenniere und der Leber

5 N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

nachgewiesen.^[96] Die Transkripte liegen jedoch zum Großteil nicht in voller Länge vor. Dadurch kann die Translation nicht in voller Effizienz durchgeführt werden und somit ist die Menge an produziertem Protein in diesen Geweben im Allgemeinen relativ gering.^[97]

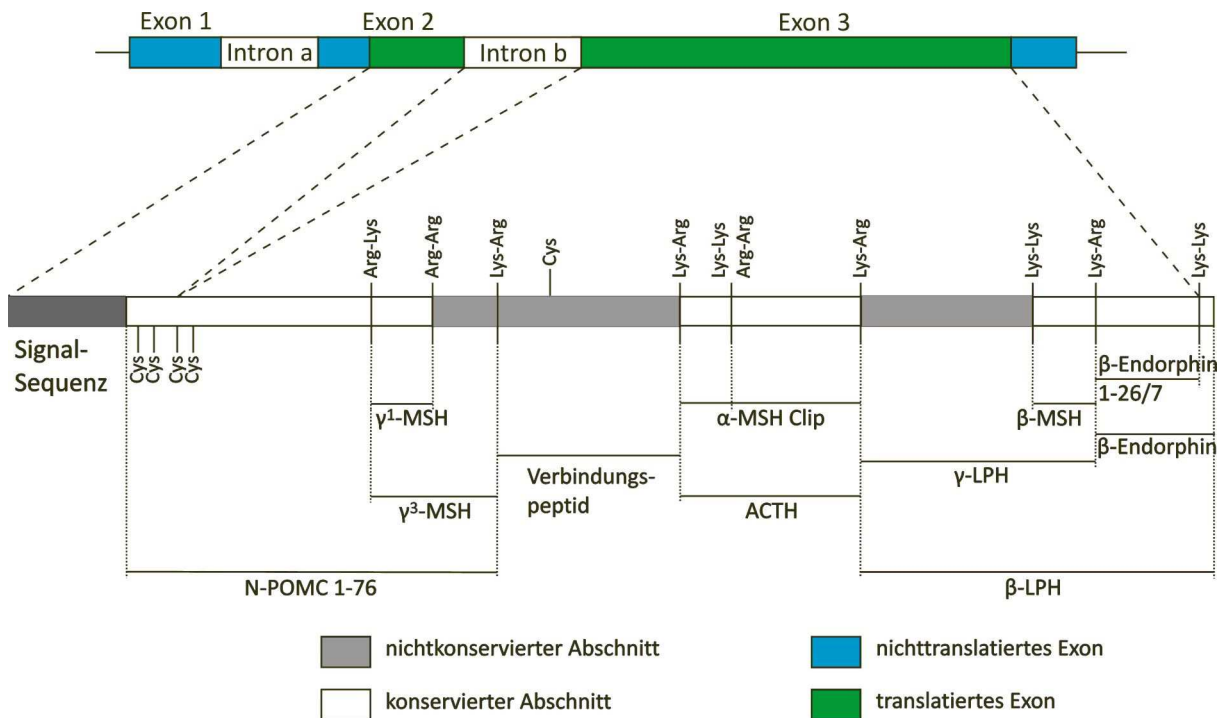


Abbildung 5-1: Schematische Darstellung des POMC-Gens und Proteins. Es sind die proteolytischen Schnittstellen und die daraus resultierenden peptidischen Schnittprodukte dargestellt.^[95]

Wie in Abbildung 5-1 dargestellt, existieren in der POMC-Sequenz acht Paare und ein Quadruplett von basischen Aminosäuren (Kombinationen aus Arg und Lys). Diese Paare markieren die Schnittstellen, an denen das Protein von Endopeptidasen in die hormonell wirksamen Peptide zerschnitten wird. Welche Peptidzusammensetzung nach der Prozessierung vorliegt, hängt vom Gewebetyp ab, in dem das Protein prozessiert wird, denn je nach Gewebe liegen die proteolytischen Enzyme in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Dabei unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Endopeptidasen, der Prohormonkonvertase 1 und 2 (PC1 & PC2), welche POMC an den basischen Aminosäurepaaren in einer spezifischen Reihenfolge zerlegen. PC1 spaltet POMC grob in N-POMC 1-76, in das Verbindungspeptid, adrenocorticotrophes Hormon (ACTH) und β -Lipotropin (β -LPH). PC2 prozessiert die Spaltprodukte von PC1 und erzeugt somit u.a. γ -MSH, α -MSH und β -MSH (MSH =

Melanozyten-stimulierendes Hormon). In der Adenohypophyse wird POMC beispielsweise hauptsächlich durch PC1 in pro- γ -MSH, ACTH und β -LPH gespalten. ^[98-100] β -LPH allerdings wird unter Bildung von β -Endorphin weitergespalten. Im *Pars Intermedia*, dem Hypophysenzwischenlappen, wie auch in vielen anderen Gewebetypen, findet die Aufspaltung durch PC2 zu den kleineren Peptiden in viel größerem Ausmaß statt.

5.3. Die Melanocortine

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, umfaßt der Begriff „Melanocortine“ die Melanotropine (α -MSH, β -MSH, γ -MSH) und Corticotropin (ACTH). Die Melanotropine haben ihren Namen aufgrund ihrer Wirkung auf die Melanozyten in der Haut, das Corticotropin aufgrund seiner Aktivität auf den *Cortex glandulae suprarenalis*, der Nebennierenrinde. ^[101]

Tabelle 5-1: Die Sequenzen der Melanocortine, wie sie im menschlichen Organismus vorkommen. Das fettgedruckte und umrandete Motiv ist in allen Melanocortinen vorhanden und ist notwendig für melanotropische Aktivität.

ACTH(1-39)	H-SYSME	HFRW	GKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESAEAFPLEF-OH
α -MSH	Ac-SYSME	HFRW	GKPV-NH ₂
β -MSH	H-AEKKDEGPYRME	HFRW	GSPPKD-OH
γ -MSH	H-YVMG	HFRW	DRF-OH

Allen Melanocortinen ist die *Core*-Sequenz HFRW gemein, welche als minimales Erkennungsmotiv für melanotropische Aktivität notwendig ist (siehe Tabelle 5-1). ^[102,103] Bis auf γ -MSH haben die Melanocortine eine konservierte Peptidheptasequenz. Die Aminosäuresequenz von α -MSH ist identisch mit der des N-Terminus' von ACTH, denn es geht aus diesem durch proteolytische Spaltung durch die PC2 hervor. Es unterscheidet sich jedoch von den anderen Melanocortinen durch seinen acetylierten N-Terminus und seinen amidierten C-Terminus.

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, findet man die einzelnen Melanocortine mit verschiedener Häufigkeit in den einzelnen Gewebetypen

eines Organismus, je nachdem, ob POMC dort exprimiert, und wie es anschließend durch PC1 und PC2 prozessiert wird.

So findet man α -MSH v.a. im *Pars Intermedia*, aber auch in anderen Teilen des Gehirns,^[99,104,105] wo es interessanterweise zum Großteil unacetyliert vorliegt.^[106] Natürlich lässt sich α -MSH auch in der Haut finden:^[107-109] dort entsteht es durch den Abbau von lokal exprimiertem POMC in Melanozyten und Keratinozyten^[107,109] sowie in mikrovaskularen Endothelzellen.^[108] Die Synthese und Freisetzung aus diesen Zellen wird durch Zytokine und UV-Strahlung reguliert, was auf eine autokrine bzw. parakrine Funktionsweise von α -MSH hindeutet.^[108,109] Ein weiteres Organ, in dessen Zellen α -MSH entsteht, ist die Plazenta.^[110,111] Die Expression des POMC-Gens findet dort in relativ geringem Ausmaß statt, aber aufgrund der großen Masse der Plazenta werden beachtliche Mengen an POMC-Spaltprodukten in den Kreislauf abgegeben. Neben α -MSH handelt es sich dabei auch um β -LPH, ACTH und β -Endorphin sowie um unprozessiertes oder nur teilweise prozessiertes POMC.^[110,111]

β -, γ -MSH und ACTH kommen weniger häufig vor. Im Hypophysenvorderlappen beispielsweise entsteht v.a. pro- γ -MSH und ACTH neben β -LPH, welches zu einem großen Anteil weiter zu β -Endorphin abgebaut wird.^[98-100,112,113] Weiterhin wird auch in den Lymphozyten ACTH generiert.^[114]

5.4. Das Agouti- und Agouti-Related Protein

Neben den oben beschriebenen Agonisten des Melanocortinsystems – den Melanocortinen – findet man in Organismen auch natürlich vorkommende Antagonisten, nämlich das Agouti-Protein und das dem Agouti-Protein verwandte *Agouti-related* Protein. Das Agouti-Protein, welches in Nagern vorkommt, wird auch ASP (*Agouti protein*) oder einfach Agouti genannt. Das menschliche Homologe, welches zu 85% mit dem murinen Agouti übereinstimmt, wird in der Literatur oft als ASIP (*Agouti signal protein*) bezeichnet. Das natürliche Vorkommen von Antagonisten macht die Melanocortinrezeptorfamilie einzigartig.

Der Name „Agouti“ bezeichnet eigentlich die klassische Fellzeichnung von Hauskatzen und von anderen Tierarten wie Degus, Kaninchen, Ratten, Mäusen

5 N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

oder Meerschweinchen, die auch „tabby“ oder „wildfarben“ genannt wird, und seinen Ursprung in den *Agoutis* hat, einer südamerikanischen Nagertiergattung, deren Fell eben diese Wildfarbe zeigt. Der dem Agouti-Protein zugehörige Genlocus wird ebenfalls Agouti genannt. Diese Fellzeichnung wird durch die Wechselwirkung des Agouti-Proteins mit dem MC1R ausgelöst.

Signalsequenz

Mensch	H ₂ N- MLTAAVLSCALLLALPATRG
Rind	H ₂ N- MLTAVLLSCALLLAMPPLQG
Maus	H ₂ N- MLTAMLLSCVLLLALPPTLG
Agouti	MDVTRLLATLVGF ^L LCFF ^T VHSHLALEETL

N-terminale Region

Mensch	AQMGLAPMEGIRRPDQALLPELPGLGLRAPLKKT TAEQA EEDLLQEAQALAEVLDLQDREPRSSRR
Rind	AQMGPAPLEGIGRP E ALFLELQGLSLQPSLKRIT EEQA EESLQEA EAKALAEVLDPEGRKPRSPRR
Maus	VQMGVAPLKGIRRPDQALFPEFPGLSLNGLKKT TADRA EVLLQKAEALAEVLD PQNRESRSPRR
Agouti	GDDRSLSRNSMNSLDFSSVSIV ALNKKKK ISRKE- AEKRKRSSK KKASMKKVARPPPPSPS

C-terminale Region

Mensch	CVRLHESCLGQQVPCCDPCATCYCRFFNAFCYCRKLG TAMN PCSRT -COOH
Rind	CVRLHESCLGHQVPCCDPCATCYCRFFNAFCYCRKLG T TNP CSRT-COOH
Maus	CVRLHESCLGQQVPCCDPCATCYCRFFNAFCYCRKLG TATN LC SRT-COOH
Agouti	CVATRDSCKPPAPACCDPCASCQ CRFF GSACT CRV LNP N ---C

Abbildung 5-2: Sequenzvergleich von bovinem, murinem und humanem AGRP mit murinem Agouti. Konservierte Aminosäuren sind fettgedruckt.^[115,116]

Antagonisten können zum einen an einen Liganden binden und blockieren oder an einen Rezeptor binden. Auf beiden Wegen ist es möglich, eine Signalweiterleitung zu verhindern. Agouti und AGRP tun dies auf letzterem Wege und verhindern somit die Wechselwirkungen der MCR's mit den Melanocortinen.^[116,117]

Das humane AGRP ist ein 132 Aminosäuren-langes Protein. Die Länge kann je nach Spezies unterschiedlich sein. Das AGRP wird im *Nucleus arcuatus* des Hypothalamus gebildet. Es ist ein potenter Antagonist für MC3R und MC4R und spielt dadurch eine entscheidende Rolle für die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt bei Säugetieren.^[116-118] So hat es zum Beispiel eine appetitanregende Wirkung. Es konnte gezeigt werden, dass AGRP zusätzlich als

inverser Agonist für MC4R agieren kann, indem es dort die cAMP-Produktion unterdrückt, die zu einem gewissen Ausmaß auch ohne die Anwesenheit von aktivierenden Melanocortinen stattfindet.^[119-121] Agouti hingegen ist ein Antagonist für MC1R und MC4R. Das ASIP wird beim Menschen in den Hoden, Eierstöcken, im Herzen und zu einem geringen Ausmaß in Leber, Nieren und Vorhaut exprimiert.^[122]

5.5. Die Melanocortinrezeptoren

5.5.1. Die Struktur der Melanocortinrezeptoren

Die oben erwähnten endogenen Liganden des Melanocortinsystems interagieren mit den Melanocortinrezeptoren. Im Jahre 1992 wurde von CHHAJLANI und WIKBERG^[123] und MOUNTJOY *et al.*^[124] unabhängig voneinander der erste Melanocortinrezeptor geklont. In den darauffolgenden zwei Jahren wurden dann vier weitere eng verwandte Rezeptoren entdeckt. Bis heute unterscheidet man fünf verschiedene Melanocortinrezeptoren.^[124] Die MCRs bilden eine Subfamilie innerhalb der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese wiederum stellt die größte, für die Kommunikation von Zellen mit Ihrer Umgebung verantwortliche Plasmamembran-Rezeptorfamilie dar. Sie besteht aus mehreren tausend Mitgliedern. Für ihre Codierung werden mehr als 1% des Genoms in Säugetieren benötigt.

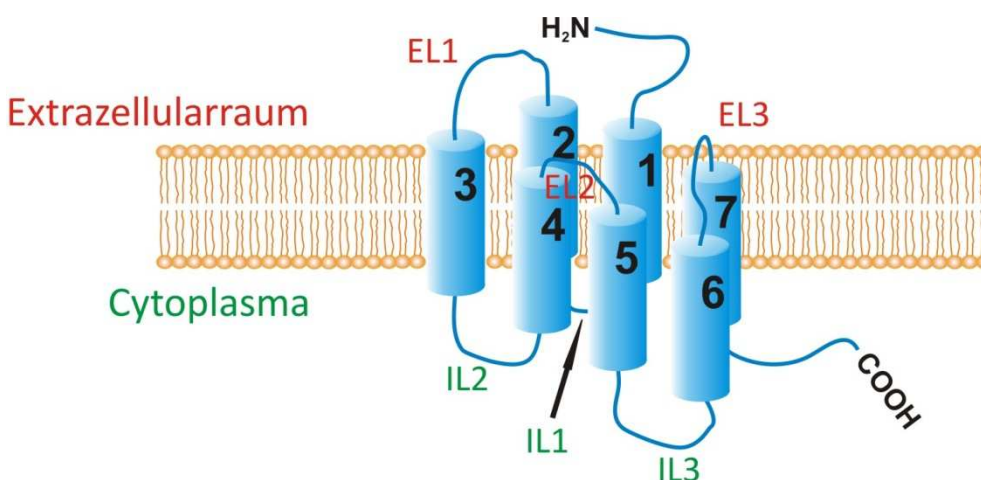


Abbildung 5-3: Schematische Darstellung der Melanocortinrezeptoren (IL – intrazellulärer Loop; EL – extrazellulärer Loop)

Entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit, gehören die Melanocortin-Rezeptoren zur Klasse A der GPCR-Rezeptoren. Der „Prototyp“ für diese GPCR-Rezeptorklasse ist Rhodopsin.^[125]

Der MC1R ist einer der am meisten untersuchten und daher am besten erforschten MCRs. Darum wird in diesem Kapitel besonderes Augenmerk auf diesen Rezeptor gelegt. Die Melanocortinrezeptoren weisen die typischen GPCR-Strukturmerkmale auf (siehe Abbildung 5-3): einen extrazellulären N-Terminus, sieben transmembrane helikale Domänen (TMs) und eine intrazelluläre C-terminale Verlängerung. Die transmembranen Helices sind durch intrazelluläre Loops (IL) und extrazelluläre Loops (EL) verbunden.

Die ELs der MCRs sind relativ kurz und besonders die kurze EL2 ist charakteristisch für alle MCRs. Diese Eigenschaft scheint im Zusammenhang mit der relativ hohen Grundaktivität mehrerer MCRs zu stehen.^[126] Verglichen mit anderen GPCRs, ist die Sequenz der EL3 der MCRs ungewöhnlich stark konserviert.

An die ILs der GPCRs binden die heterotrimeren G-Proteine. Außerdem befinden sich dort Phosphorylierungsstellen, welche an der Regulierung der Signalweiterleitung, der Internalisierung und des *Cyclings*^[127] („wandern“ des Rezeptors zwischen der Plasmamembran und Bereichen im Inneren der Zelle) beteiligt sind.^[128] An der Schnittstelle zwischen TM3 und IL2 befindet sich ein ¹⁴¹DRY¹⁴³-Tripeptid, welches charakteristisch für die Klasse A der GPCR-Rezeptoren und ein wichtiges Element für die Funktionsweise des Rezeptors ist.^[129] Der IL3 ist unter den hMCRs nur schwach konserviert.

Die TMs sind in etwa senkrecht zur Ebene der Plasmamembran angeordnet. Die Bindungstasche befindet sich bei den Klasse-A-GPCR-Rezeptoren unterhalb der Oberfläche der extrazellulären Seite der Plasmamembran, so auch beim hMC1R (Näheres siehe Abschnitt 5.5.3).^[130-133]

Die C-terminale zytosolische Verlängerung hat bei den GPCR-Rezeptoren mehrere wichtige Funktionen. Zum Einen interagiert der Rezeptor-Ligand-Komplex über diese Domäne mit dem heterotrimeren G-Protein.^[128] Zum Anderen wird der Rezeptor mit Hilfe dieser Verlängerung in der Plasmamembran fixiert. Dies geschieht durch Palmitoylierung oder Myristoylierung von Cystein-Resten und die Einlagerung der langen Alkylketten in der Lipiddoppelschicht.^[134] Weiterhin gewährleistet die C-terminale Verlängerung einen korrekten Transport des Rezeptors innerhalb der Zelle.^[135] Zudem befinden sich in diesem Teil des Proteins oftmals Serin- oder

Threoninreste, welche durch Phosphorylierung an der Desensibilisierung und der Internalisierung des Rezeptors beteiligt sind.^[136,137] Der zytosolische, C-terminale Teil des MC1R ist beispielsweise 19 Aminosäurereste lang. Unter den Melanocortinrezeptoren sind davon 6 Reste konserviert.

5.5.2. Distribution und physiologische Funktionen

1961 wurde der Melanocortin-Pfad mit der Regulierung der Hautpigmentierung beim Menschen in Zusammenhang gebracht.^[138] Bis in die 90er Jahre wurden hauptsächlich chemische und biologische Studien unternommen, um die physiologischen Pfade des Melanocortinsystems und seine beteiligten Liganden zu identifizieren. Die verschiedenen Melanocortinrezeptortypen kommen auf den Zellen der unterschiedlichen Gewebearten eines Organismus verschieden häufig vor. Der MC1R wird hauptsächlich auf Melanozyten und Keratinozyten exprimiert und steuert dort in vielen Spezies die Pigmentierung von Haut und Haaren. In zahlreichen wechselwarmen Organismen, z.B. Fröschen und Eidechsen, ermöglicht er den schnellen Farbwechsel (hell/dunkel) der Haut.^[101] Man findet ihn aber auch in der Hypophyse, auf Leukozyten,^[139] Makrophagen und Monozyten,^[140] auf antigenpräsentierenden und zytotoxischen Lymphozyten,^[141] auf neutrophilen Granulozyten,^[142] auf dendritischen Zellen^[143] und auch auf Melanomzellen.^[144] Das Vorkommen des MC1R auf fast allen zellulären Bestandteilen des Immunsystems deutet neben seiner Rolle bei der Hautpigmentierung auch auf eine Rolle in der Immunmodulation hin.^[145,146] Unter den endogenen Liganden binden α -MSH und ACTH mit der größten Affinität an den MC1R.

Im Gegensatz dazu steht der MC2R, welcher der einzige Rezeptor ist, der selektiv von ACTH angesprochen wird.^[124,147] Durch die anderen POMC-Derivate wird er nicht aktiviert. Den MC2R findet man fast ausschließlich in der *zona fasciculata* und der *zona glomerulosa* der Nebennierenrinde.^[124] In Nagern wurde er zudem auf Adipozyten entdeckt, wo er die Lipolyse stimuliert.^[148] Dieser Effekt konnte im menschlichen Fettgewebe jedoch nicht reproduziert werden.^[149] Der Rezeptor reguliert ansonsten die Produktion und Freisetzung von Steroiden in der Nebennierenrinde.^[150,151]

Der MC3R ist deutlich stärker distribuiert. In der Peripherie wird er in der Plazenta, im Milchdrüsengewebe, den Eierstöcken, den Hoden, im Herzen, den Nieren und im Gastrointestinaltrakt exprimiert.^[123,139,152] Weiterhin tritt er innerhalb des zentralen Nervensystems auf, z.B. im Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus, in der vorderen Amygdala und in der Hirnrinde.^[152-154] Es ist der einzige Melanocortinrezeptor, der eine signifikante Affinität zu γ -MSH zeigt. ACTH, α - und β -MSH werden jedoch mit ähnlichen Affinitäten gebunden.^[152] Die Funktionen, die der Rezeptor in der Peripherie einnimmt, sind noch unklar. Ansonsten scheint er eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Herzkreislauffunktionen und Körpertemperatur sowie der Nahrungsaufnahme und des Ernährungsverhaltens zu spielen.^[155,156]

Wie der MC3R, so hat auch der MC4R wichtige Funktionen bei der Energiehomöostase und bei der Nahrungsaufnahme. Er ist aber zusätzlich noch an Sexualfunktionen beteiligt. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass er das Sexualverhalten und die erektile Funktion beeinflusst.^[157] Der MC4R kommt hauptsächlich im Hypothalamus, im Rückenmark und in der Hirnrinde vor.^[154] In der Peripherie konnte er trotz zahlreicher Studien bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden.^[139,154,158] Der eigentliche endogene Ligand für den MC4R ist α -MSH, aber auch ACTH wird ähnlich stark gebunden.^[158]

Die Verbreitung des MC5R ist in Säugetieren sehr weit. Man findet ihn vornehmlich im Gewebe von exokrinen Drüsen, Talgdrüsen und auf Adipozyten sowie in Teilen des Gehirns, dem Kleinhirn und der Hirnrinde, allerdings nur in geringem Ausmaß. In exokrinen Drüsen wird er wiederum relativ stark exprimiert.^[159-163] Seine Funktionen sind noch nicht vollständig geklärt. Anscheinend spielt er aber zumindest bei Nagern bei der Thermoregulierung, bei der Regulierung der Talgproduktion und bei der stressabhängigen Freisetzung von Sekreten z.B. von Pheromonen aus exokrinen Drüsen eine Rolle.^[160,164,165] Zudem gibt es Hinweise, dass der MC5R auf entzündungs- und angstlösende Prozesse Einfluss haben könnte. Diese Ergebnisse sind bis jetzt allerdings für den Menschen noch nicht pharmakologisch bestätigt worden.^[166-170] Die weite periphere Verbreitung des Rezeptors deutet aber auf zahlreiche Funktionen hin. Auch an diesen Rezeptor bindet α -MSH mit der größten Affinität, gefolgt von ACTH und β -MSH.

5 N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Tabelle 5-2: Zusammenfassung der Vorkommen und Funktionen sowie der Expressionsorte und der Affinitäten zu den agonistischen und antagonistischen endogenen Liganden der fünf verschiedenen MCRs.

Rezeptortyp	Ligandenaffinität		mRNA-Expression	Funktion
	Agonisten	Antagonisten		
MC1R	α -MSH = ACTH > β -MSH > γ -MSH	Agouti	Melanozyten, Keratinozyten, Hypophyse, Leukozyten, Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Melanomzellen	Hautpigmentierung Immunomodulation
MC2R	ACTH		Nebennierenrinde	Produktion und Freisetzung von Steroiden
MC3R	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	AGRP	Plazenta, Milchdrüsengewebe, Eierstöcke, Hoden, Herz, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus, vordere Amygdala, Hirnrinde	Regulierung von Herzkreislauffunktionen, Körpertemperatur und Nahrungsaufnahme
MC4R	α -MSH = ACTH > β -MSH >> γ -MSH	Agouti, AGRP	Hypothalamus, Rückenmark, Hirnrinde	Energiehomöostase, Regulierung von Nahrungsaufnahme und Sexualfunktionen
MC5R	α -MSH > ACTH = β -MSH >> γ -MSH		exokrine Drüsen, Talgdrüsen, Adipozyten, Kleinhirn, Hirnrinde	Regulierung von exokrinen Drüsen, Talgproduktion

5.5.3. Der Aktivierungszyklus von Melanocortinrezeptoren

Die Aktivierung der Melanocortinrezeptoren und die daraus resultierende Signaltransduktion ist mit sehr komplexen biochemischen Prozessen verbunden, deren lückenlose Aufklärung noch längere Zeit in Anspruch nehmen wird. An dieser Stelle sollen Einblicke in die Funktionweise von Melanocortinrezeptoren, mit Betonung auf dem bereits sehr gut erforschten MC1R, gegeben werden (siehe auch Abbildung 5-4).

Der MC1R wird, wie oben beschrieben, hauptsächlich auf Melanozyten und Keratinozyten exprimiert, wo er die Pigmentierung der Haut steuert.^[101] Die Exprimierung des Rezeptors und von POMC in der menschlichen Epidermis wird v.a. durch UVB-Strahlung stimuliert.^[171,172] Die Aktivierung wird möglicherweise durch den von p38 aktivierten Transkriptionsfaktor USF-1 hervorgerufen.^[173] Weiterhin wird die Exprimierung des MC1R durch die Melanocortine selbst sowie durch Endothelin 1 und Interleukin-1 α/β (IL-1 α , IL1- β) promoviert.^[174,175] Um eine Regulierung zu ermöglichen, werden außerdem Signale benötigt, welche die Exprimierung des MC1R in den Melanozyten unterdrücken. Zu diesen gehören Agouti (bzw. ASP) und die Zytokine TNF- α und TGF- β .^[174,176,177] Auch durch geringe Wasserstoffperoxidkonzentrationen konnte eine reversible Drosselung der MC1R-Expression zumindest in Melanomzellen von Mäusen beobachtet werden.^[178] Da H₂O₂ ein Nebenprodukt bei der Melanogenese ist und reaktive Sauerstoffspezies in sonnenbestrahlter Haut entstehen,^[179] scheint H₂O₂ in der Tat ein geeignetes chemisches Signal zur negativen Regulierung der MC1R-Expression zu sein.

Das durch die Stimuli erzeugte Transkript wird aus dem Kern in das Zytosol transferiert, wo die Translation an den Ribosomen einsetzt. Das entstehende Protein assoziiert dann mit dem endoplasmatischen Retikulum, wo die Translation vervollständigt und das Protein posttranslational prozessiert wird. Die Prozessierung wird im Golgi-Apparat vervollständigt. Zu den co- und posttranslationalen Modifikationen für den MC1R und andere MCRs gehören Glykosylierung,^[180] Acylierung^[181,182] und die Bildung von Disulfidbrücken.^[181,183] Der fertige Rezeptor wird dann zur Plasmamembran transportiert. Kommt es zu Mutationen oder Fehlfaltungen des Proteins, wird der Transport blockiert oder behindert, wodurch es zu MC1R-Dysfunktion kommen kann, welche zum RHC-Phenotyp (*red hair and fair skin phenotype*) führt.^[184,185]

Wie eine große Anzahl anderer GPCR-Rezeptoren,^[186-188] so bilden vermutlich auch alle Melanocortinrezeptoren, zumindest aber MC1R,-3R und -4R, Dimere oder Oligomere.^[189,190] Die Oligomerisierung geschieht konstitutiv, d.h. sie kann auch ohne die Anwesenheit von Melanocortinen erfolgen, und ist ein sehr frühes Ereignis in der Biosynthese der Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum. Die funktionellen Konsequenzen der Dimerisierung sind zum Beispiel dominant-negativ-Effekte oder die Beeinflussung von pharmakologischen Eigenschaften.^[184] Mechanistisch wird die Dimerisierung des MC1R durch die Ausbildung von vier Disulfidbrücken und durch nicht-kovalente Interaktionen, vermutlich durch den Austausch von Domänen ermöglicht.^[191]

Die in der Membran verankerten Rezeptoren werden durch die Melanocortine aktiviert. Die Identifizierung der Bindungsstellen ist immer noch Bestandteil der Forschung. Ergebnisse von Mutageneseexperimenten deuten beispielsweise auf zwei Bindungstaschen auf dem hMC1R, mit Hilfe derer die Melanocortine an den Rezeptor binden: eine ionische Bindungstasche, gebildet durch Glu⁹⁴, Asp¹¹⁷ und Asp¹²¹ aus TM2 und TM3, und eine hydrophobe Bindungstasche, gebildet durch ein Netzwerk aus aromatischen Aminosäuren aus TM4, 5 und 6.^[133] Räumlich betrachtet befinden sich die Liganden, wie oben bereits erwähnt, unterhalb der äußeren Plasmamembranoberfläche. Die ionische Bindungstasche wird dabei durch die Argininseitenkette aus der HFRW-core-Sequenz der Melanocortine besetzt. Die hydrophobe Bindungstasche interagiert mit den Seitenketten des Phenylalanins und des Tryptophans. Die ionischen Wechselwirkungen scheinen die hydrophoben zu überwiegen.^[133] Allerdings wurden auch schon synthetische, nicht-peptidische Agonisten entdeckt, die ohne eine positiv geladene basische Gruppe auskommen.^[192] Möglicherweise könnten hydrophobe Interaktionen für die Aktivierung des Rezeptors schon ausreichend sein.

Für den hMC4R wurden basierend auf *Docking*-Studien mit einem GPCR-Rhodopsin-Struktur-Templat^[193] ebenfalls die entsprechenden zwei Bindungstaschen postuliert, mit welchen die Melanocortine aber auch humanes AGRP wechselwirken.^[194] Das AGRP scheint mit dem RFF-Motiv (siehe C-terminale Region Abbildung 5-2) zu interagieren, wobei die Arg¹¹¹-Seitenkette die ionische Bindungstasche, und Phe¹¹² und Phe¹¹³ die hydrophobe Tasche belegen.^[194] Interessanterweise führte der Austausch des RFF-Motivs im AGRP durch die Melanocortin-core-Sequenz HFRW in einem Ac-mini-AGRP-NH₂-

Templat von einem Antagonisten zu einem Agonisten mit 20-facher Selektivität für den MC4R gegenüber MC3R.^[194]

Durch die Identifizierung von Glu94 im hMC1R bzw. von Glu92 im MC1R der Maus, konnte anhand der E92K-*Sombre-3J*-Mutation ein Modell für die Aktivierung des Rezeptors geschaffen werden: durch das Binden der agonistisch wirkenden Melanocortine erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung. Dies wird vermutlich durch die Anwesenheit der positiven Ladung des pharmakophoren Arginins erreicht. Dabei kommt es zu einer Veränderung der Packung der TM2- und TM3-Domänen, wobei diese konformative Veränderung an die IL2 weitergegeben wird. Diese Veränderung der Konformation in der IL2 betrifft dann auch das oben schon erwähnte ¹⁴¹DRY¹⁴³-Motiv und andere Bereiche, die für die Interaktionen mit dem G-Protein wichtig sind. Die neue Konformation könnte diese Interaktionen dann ermöglichen.^[195]

Die ermöglichte Kupplung des heterotrimeren G-Proteins an den Melanocortinrezeptor aktiviert die Adenylylcyclase, wodurch die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cAMP steigt. Dies hat wiederum die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Folge. Die Signaltransduktion der Melanocortinrezeptoren erfolgt zwar hauptsächlich, aber nicht ausschließlich über den cAMP-Pfad. Für den hMC3R beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Signale zusätzlich zum cAMP-System auch über die Inositoltriphosphat- (IP₃) und Ca²⁺-Systeme weitergeleitet werden können.^[196-198] Auch für den hMC5R,^[199] für in Keratinozyten^[200] und Melanomzellen^[201] exprimierte hMC1R und hMC4R, sowie für die MC1,3-5R in Mäusen^[202] konnte die Signalweiterleitung über den Ca²⁺-Weg gezeigt werden.

Nachdem der Rezeptor mit seinen Agonisten in Kontakt getreten ist, wird der Rezeptor innerhalb einiger Minuten desensibilisiert, d.h. die Signalweiterleitung wird gedämpft. Dies konnte für Maus-MCRs und für den hMC1R in Melanomzellen nachgewiesen werden.^[182,203,204] Im Falle des MC1R wird die Desensibilisierung vermutlich durch die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) 1 und 6 hervorgerufen, welche in Melanozyten exprimiert werden. Der aktivierte Rezeptor ist ein Substrat für die GRK1 und GRK6, welche ihn phosphorylieren. Anschließend folgt oftmals die Internalisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes, was möglicherweise weitere Signalkaskaden auslöst.^[136] Dadurch ließe sich das Auftreten von

5 N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Melanocortinen im Zellinneren von Melanomzellen und deren anschließende Abgabe ins extrazelluläre Medium erklären.^[205-209]

Das weitere Schicksal des internalisierten Ligand-Rezeptor-Komplexes ist jedoch unklar. Die Internalisierung des phosphorylierten Rezeptors könnte zum

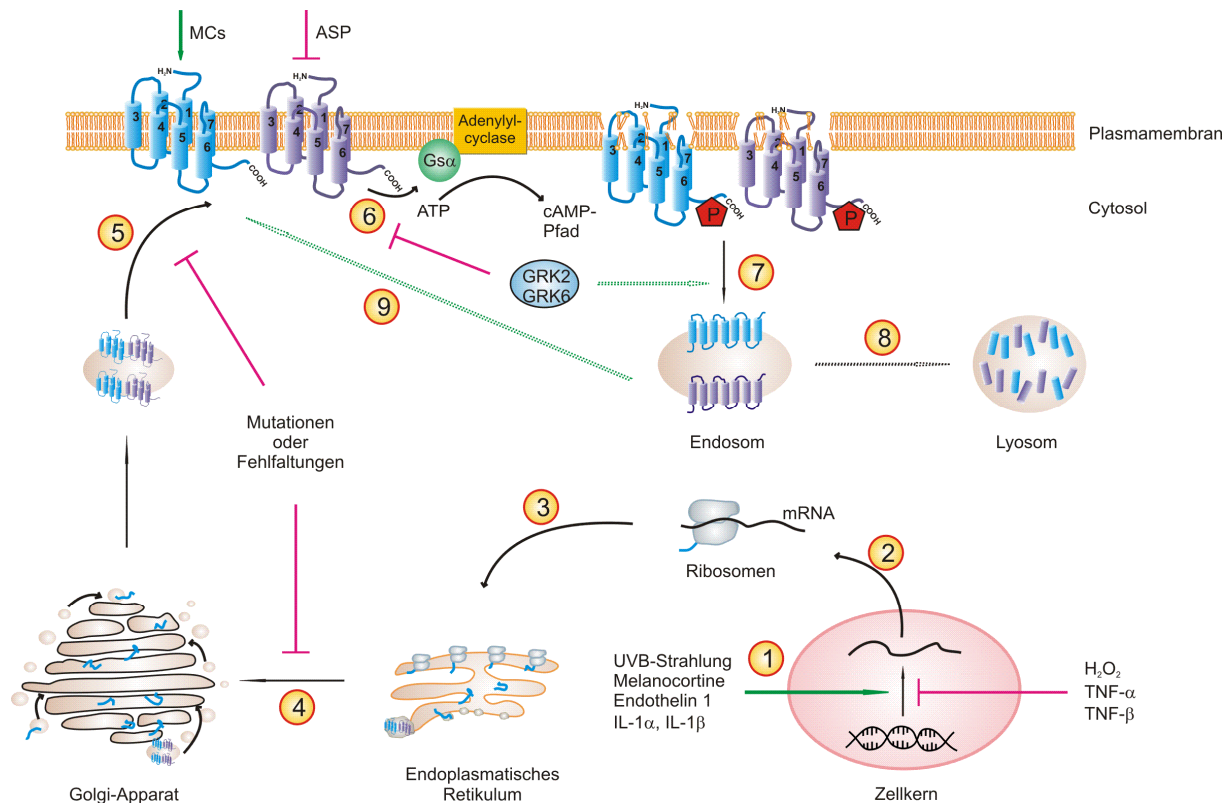


Abbildung 5-4: Schematische Darstellung des Aktivierungszyklus des MC1R. Aktivierende Ereignisse sind mit grünen, inhibierende mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Noch nicht ganz aufgeklärte Ereignisse sind durch Pfeile mit gepunkteten Linien markiert. (1) Die Transkription des MC1R-Gens wird durch UV-Strahlung, die Melanocortine, Endothelin 1 sowie IL-1 α und IL-1 β hervorgerufen. H₂O₂, TNF- α und TNF- β inhibieren diesen Vorgang. (2) Die Translation wird im Zytosol gestartet und im (3) ER vervollständigt. Dort wird das Protein posttranslational modifiziert. Es kommt ausserdem zur Dimerisierung. (4) Im Golgi-Apparat werden die Modifikationen vervollständigt. (5) Der Rezeptor wird zur Plasmamembran transportiert und dort verankert. Bestimmte Mutationen und Fehlfaltungen behindern oder blockieren den Transport. (6) Durch die Aktivierung interagiert der Rezeptor mit dem G-Protein. Die Adenylcyclase wird aktiviert, der cAMP-Level steigt. Der aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex ist Substrat für GRK2 und GRK6. (7) Der phosphorylierte, desensibilisierte Ligand-Rezeptor-Komplex wird internalisiert. (8) Höchstwahrscheinlich wird der Rezeptor ausschließlich lysosomatisch abgebaut. Zum Recycling kommt es daher im Falle des MC1R vermutlich nicht.^[210,211]

einen den lysosomalen Abbau zur Folge haben. Zum andern besteht die Möglichkeit, dass der Rezeptor *recycled* wird, also wieder zur Plasmamembran zurücktransportiert wird, so wie es für bestimmte GPCRs, z.B. für eine aktive Variante des Angiotensin II-AT_{1A}-Rezeptors, gezeigt werden konnte.^[127] Allerdings deutet zumindest im Falle des MC1R nichts darauf hin. Hier scheint der Abbau in den Lysomen Vorrang zu haben.^[208]

5.6. Synthetische Liganden der Melanocortinrezeptoren

Seit über 30 Jahren werden inzwischen *structure-activity-relationship*-Studien für Melanocortinliganden durchgeführt. Durch *truncation*-Studien ergänzt durch Alanin-scans mit α -MSH (Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂) wurde zunächst die für die biologische Aktivität minimal nötige Sequenz Ac-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-NH₂ bestimmt.^[103,212,213] Jede einzelne Aminosäure der Melanocortin-Peptide wurde durch ihr Stereoisomer ausgetauscht und die daraus resultierenden pharmakologischen Effekte untersucht.^[214-218] Im Allgemeinen war durch den Austausch eine reduzierte bzw. eine verlorene agonistische Aktivität zu beobachten, mit der Ausnahme von *D*Phe⁷. Auch die *core*-Sequenz wurde diesen Untersuchungen unterzogen.^[214,216,217] Die entstandenen Diastereomere zeigten ebenfalls reduzierte Potenz, bis auf die *D*Phe⁷-Variante.^[215] Ausgehend von diesen Kenntnissen, wurden zahlreiche peptidische und peptidmimetische Wirkstoffe für die Melanocortinrezeptoren entwickelt, von denen einige Beispiele im folgenden Abschnitt vorgestellt werden sollen.

5.6.1. Peptidische Liganden

Der Austausch von Met⁴ durch Nle und von Phe⁷ durch *D*Phe in α -MSH führte im Jahre 1980 zu NDP- α -MSH (Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Nle⁴-Glu⁵-His⁶-*D*Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂), einem superpotenten und hochaktiven, jedoch unselektiven α -MSH-Analogen, welches auch als MT-I (Melanotan I) bezeichnet wird (siehe Abbildung 5-5).^[219]

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

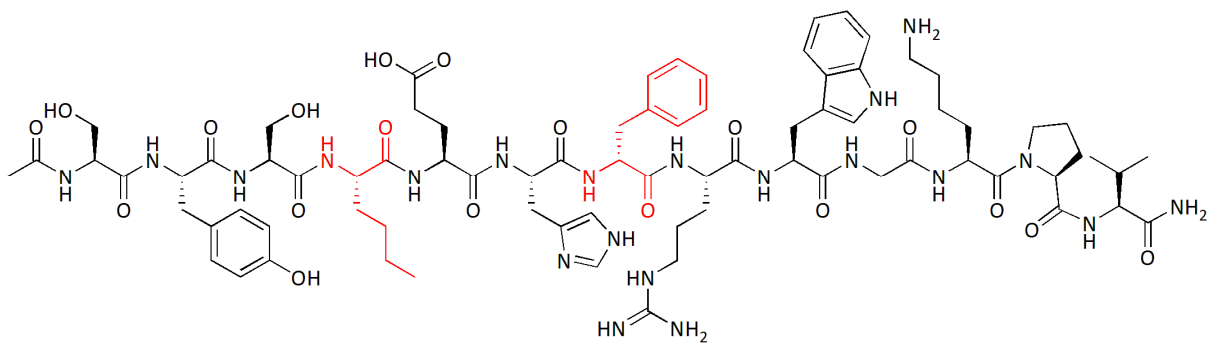


Abbildung 5-5: Das α -MSH-Analogon NDP-MSH (MT-I) geht aus diesem durch den Austausch (rot markiert) von Met⁴ mit Nle und von Phe⁴ mit dPhe hervor.

Es besitzt eine längere Aktivität und ist resistenter gegenüber enzymatischem Abbau.^[220] Es wurde bereits in mehreren klinische Phase-II-Studien hinsichtlich auf seine Wirkung als Sonnenschutz getestet.^[220] MT-I ist nicht oral verfügbar und muß subkutan injiziert werden. Bei Kaukasianern mit Hauttypen von I-IV konnte es bei tolerablen Nebeneffekten die Melanindichte deutlich erhöhen. Gleichzeitig konnte die Anzahl apoptotischer Keratinocyten (durch UV-Licht beschädigte Zellen) reduziert werden. Das weist darauf hin, dass MT-I durchaus Potenzial als Sonnenschutzmittel hat und durch seine Wirkung Schutz vor UV-induzierten Hautschäden und Carcinogenese bieten kann. MT-I wird allgemein als das potenteste Melanocortin angesehen, das jemals entwickelt worden ist. Das I¹²⁵-markierte Derivat ([¹²⁵I]-NDP-MSH) dient daher oft als Marker, beispielsweise in kompetitiven Bindungsassays, wie sie auch zum Testen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Melanocortinliganden verwendet wurden.

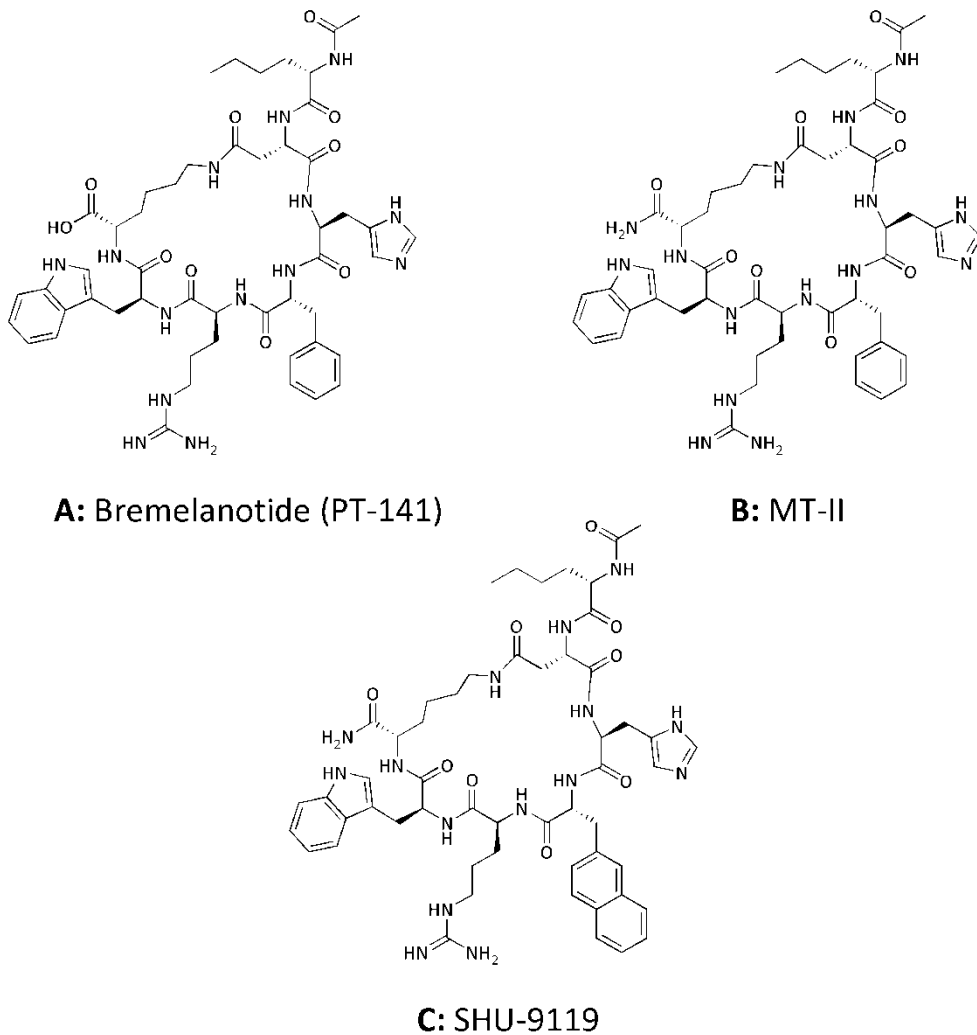


Abbildung 5-6: Drei Vertreter lactamverbrückter α -MSH-Analoga.

Neun Jahre später wurde von AL-OBEIDI *et al.* ein über eine Lactam-Brücke cyclisiertes α -MSH-Analogon synthetisiert, das später unter dem Namen Melanotan-II (MT-II) bekannt wurde (siehe Abbildung 5-6 B).^[221,222] MT-II basiert auf der Sequenz von NDP-MSH, jedoch verkürzt auf H-Nle⁴-Glu⁵-His⁶-Dphe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-OH. Zudem ist Glu⁵ durch Asp und Gly¹⁰ durch Lys ausgetauscht und das Molekül über die Seitenketten des Aspartats und des Lysins cyclisiert. Genau wie bei α -MSH und NDP-MSH ist der N-Terminus acetyliert und der C-Terminus amidiert. MT-II ist ähnlich wie MT-I superpotent, länger aktiv und resistent gegenüber enzymatischem Abbau, aber ebenso unselektiv.^[221,222] Bei einer klinischen Phase I-Studie, in der die Auswirkung von MT-II auf die Hautpigmentierung bei männlichen Probanden getestet werden sollte, wurde festgestellt, dass bei diesen eine spontane Erektion ausgelöst wurde.^[223]

Das Fehlen der Amidfunktion am C-Terminus unterscheidet PT-141 (siehe Abbildung 5-6 A) von MT-II. PT-141 kam unter dem Namen *Bremelanotide* bis in die klinischen Studien Phase II. Es wurde seine Wirkung als Medikament gegen erektile Dysfunktion und Frigidität bei Frauen (HSDD = *hypoactive sexual desire disorder*) untersucht. Durch nasale Verabreichung oder subkutane Injektion konnten diesbezüglich positive Effekte bei Männern und Frauen nachgewiesen werden.^[224-227] Eine geplante Phase-III-Studie wurde jedoch verschoben, nachdem die FDA Bedenken bezüglich der negativen Effekte von *Bremelanotide* auf das Herz-Kreislaufsystem angemeldet hat. Neben den relativ milden Nebenwirkungen wie Gesichtsrötung, Schläfrigkeit, Brechreiz, Übelkeit, Kopfschmerzen und Geschmacksstörungen, kam es bei zwei Probanden zu starkem Bluthochdruck.^[224]

Im Kontrast zu den oben erwähnten unselektiven, superpotenten Agonisten steht SHU-9119 (siehe Abbildung 5-6 C): durch den Austausch von D^7Phe in MT-II mit $\text{D}^7\text{Nal}(2')$ entstand ein unselektiver Antagonist.^[228] Schon durch den Austausch von D^7Phe mit *p*-Iod- D^7Phe wird MT-II zu einem Antagonisten für hMC1R, hMC3R und hMC4R und einem partiellen Antagonisten für hMC5R. Für antagonistische Aktivität benötigt man also sperrige Aminosäuren in Position 7. Die Parasubstitution des Phenylrings mit Fluor und Chlor reicht beispielsweise nicht aus, um MT-II in einen Antagonisten zu transformieren.^[228]

Im Laufe der Jahrzehnte ist eine große Anzahl an peptidischen Liganden für die Melanocortinrezeptoren entwickelt worden, die mehr oder weniger selektiv für bestimmte Rezeptoren sind. Zwei weitere Vertreter sind in Abbildung 5-7 abgebildet.

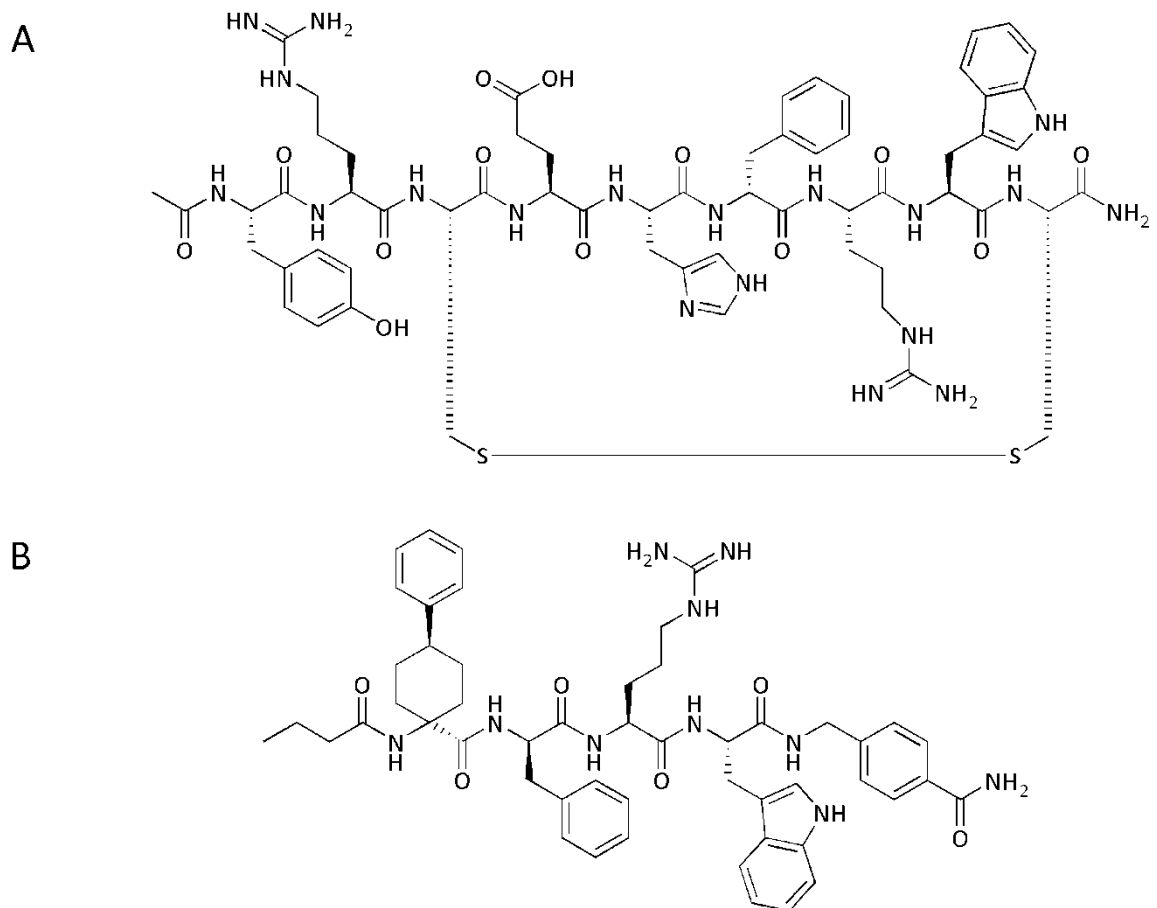


Abbildung 5-7: MC4R-selektive peptidische Liganden.^[229,230] A) Ein MC4R-selektiver Agonist mit einem $EC_{50} = 0.27$ nM und einer Selektivität gegenüber MC1R > 20, MC3R > 70 und MC5R > 500. B) Ein MC4R-selektiver Agonist mit einem $EC_{50} = 1$ nM und einer Selektivität gegenüber MC1R > 10000.

Auch das über Disulfidbrücken cyclisierte Peptid (Abbildung 5-7 A) entstammt der α -MSH-Sequenz. C-terminal wurde es um das Ser¹, und N-terminal um Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³ gekürzt. Ser² wurde durch ein Arg, Phe⁷ durch ein *D*Phe und Gly¹⁰ durch ein Met ersetzt. Die Verbindung ist ein MC4R-selektiver Agonist ($EC_{50} = 0.27$ nM). Die Selektivitäten gegenüber MC1R, MC3R und MC5R liegen bei >20, > 70 und > 500.^[229] Auch die lineare Verbindung aus Abbildung 5-7 B ist ein MC4R-selektiver Agonist ($EC_{50} = 1$ nM) mit einer Selektivität gegenüber MC1R von ≈ 10000 .^[230]

5.6.2. Nicht-peptidische Liganden

Um die Nachteile peptidischer Wirkstoffe zu vermeiden, wurden große Anstrengungen unternommen, nicht-peptidische Liganden für das Melanocortinsystem zu entwickeln. Aus einer Leitstruktur, die bei einem gerichteten *screening* basierend auf der Melanocortin-*core*-Sequenz gefunden wurde, ist vor 7 Jahren THIQ (siehe Abbildung 5-8 A) entwickelt worden. THIQ ist ein selektiver MC4R-Agonist. In Ratten kam es zu spontanen Erektionen und zur reduzierten Nahrungsaufnahme nach oraler und zentraler Verabreichung.^[231,232] In einer anderen Studie wiederum kam es zu keinen merklichen Effekten nach der Einnahme von THIQ.^[233]

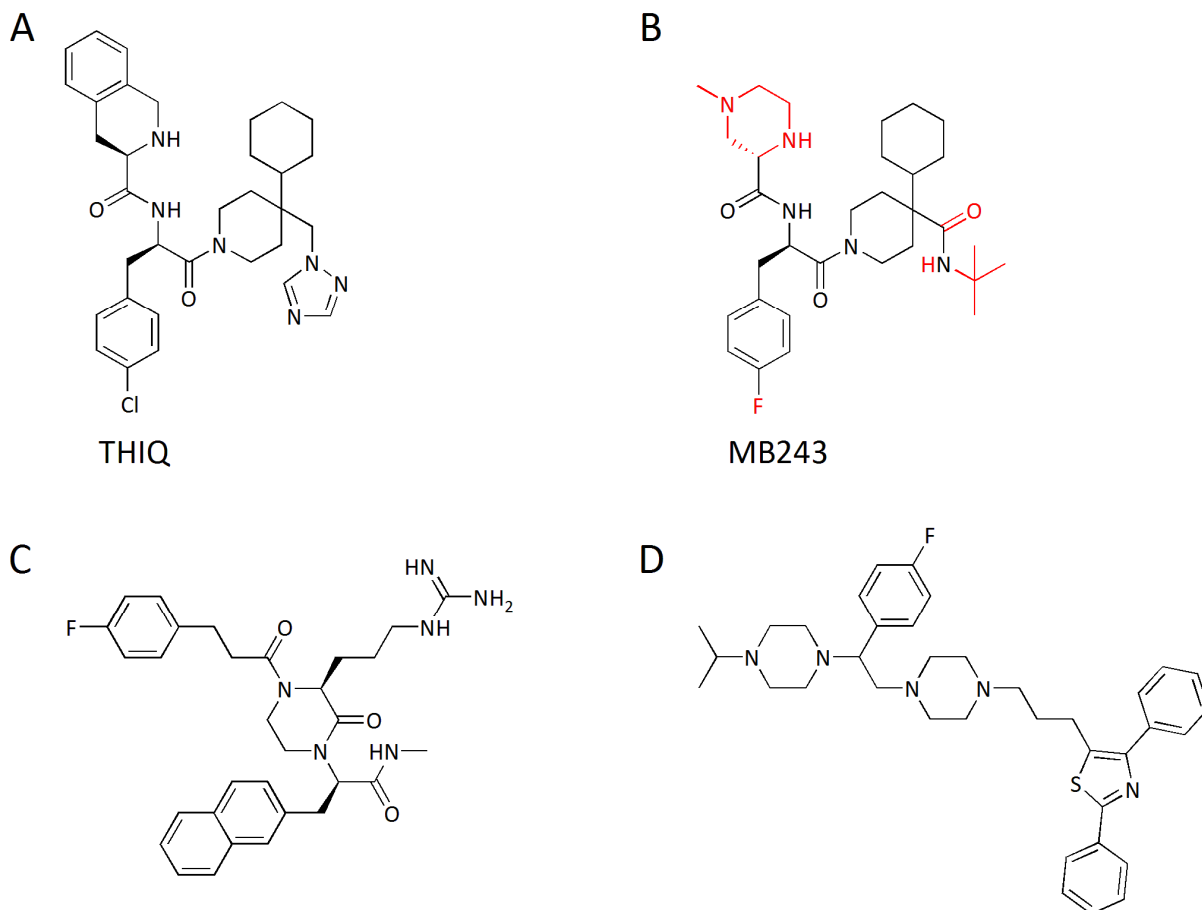


Abbildung 5-8: Eine Auswahl nichtpeptidischer Liganden für den MC4R. A| THIQ, ein MC4R-selektiver Agonist. B| MB243, eine THIQ-Variante (Variationen sind rot markiert).^[234] C| Ein MC4R-selektiver Agonist.^[235] D| Ein stark basischer MC4R-Antagonist mit einem $IC_{50} = 160 \text{ nM}$.^[236]

Die Struktur von THIQ wurde als Leitstruktur verwendet, welche als Startpunkt für Optimierungen diente und in zahlreichen Versuchen modifiziert wurde. Viele dieser THIQ-Derivate zeigten Aktivität *in vivo*. So konnte mit THIQ-Derivaten in Ratten, welche antagonistisch auf den MC4R wirken, die spontane Nahrungsaufnahme stimuliert werden.^[237,238] Im Gegensatz dazu wurde mit THIQ-Abkömmlingen, die agonistisch auf den MC4R wirken, die Nahrungsaufnahme reduziert und die erektile Aktivität verstärkt.^[234] Einige dieser Derivate mit Cyclohexylpiperidin- und Cyclohexylpiperazinresten sind oral bioverfügbar und in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen.^[238-240] Trotz allem wurden aber auch toxische Nebenreaktionen beobachtet, wie beispielsweise das Binden an Mikrosomalproteine in der Leber bei Verwendung von MB243 (siehe Abbildung 5-8 B). Dies wird dem Entstehen von aktiven Metaboliten dieses THIQ-Derivates *in vivo* zugeschrieben.^[241] Weiterhin gibt es zahlreiche Verbindungen nicht peptidischer Struktur, die nicht von THIQ abstammen (siehe Abbildung 5-8 C und D). Einige dieser Verbindungen entstammen Leitstrukturen, die durch *high-throughput screening* (HTS) oder durch Modifikationen der aktiven peptidischen *core*-Sequenz des MSH erhalten wurden.^[235,242-253]

5.7. MT-II als Leitstruktur für einen *N*-Methyl-*scan*

MT-II ist für einen *N*-methyl-*scan* eine ideale Leitstruktur. Es ist ein superpotenter Agonist für vier von fünf Melanocortinrezeptoren. Die *N*-Methylierung der zahlreichen Amidstickstoffatome liefert eine relativ große Bibliothek *N*-methylierter Verbindungen, deren Rückgrate gegenüber MT-II eingeschränkte konformationelle Freiheit haben sollten. Daher besteht eine relativ große Wahrscheinlichkeit eine Verbindung zu schaffen, die einen Affinitätsverlust und somit einen Selektivitätsgewinn für einzelne Rezeptoren aufweist. Durch seine cyclische Struktur besitzt MT-II *per se* eine erhöhte metabolische Stabilität, die sich durch die Einführung von *N*-Methylgruppen weiter steigern läßt. MT-II ist nicht oral verfügbar. Eine Konversion in eine oral verfügbare peptidische Verbindung wäre einer zukünftigen pharmazeutischen Anwendung zuträglich.

5.8. Syntheseeziele und Synthesestrategie

Die MT-II-Sequenz besteht aus sieben Aminosäuren. Insgesamt existieren im Molekül neun Amidfunktionen: sechs innerhalb des lactamverbrückten Cyclus', eine am C-terminalen Ende sowie zwei ausserhalb des Cyclus', am N-Terminus (siehe Abbildung 5-9). Primäres Ziel war es, einen kompletten *N*-Methyl-*scan* der sechs sich im Cyclus befindlichen Aminofunktionen durchzuführen. Dafür gibt es $2^6 - 1 = 63$ Möglichkeiten. Weiterhin sollten ausgewählte MT-II-Derivate hergestellt werden, in denen die exocyclischen Aminofunktionen methyliert vorliegen. Um diese Ziele zu erreichen, benötigt man die N^α -methylierten Derivate von Trp, Arg, *D*Phe, His, Asp und Nle sowie alle drei möglichen Kombinationen N^α - und N^ϵ -methylierter Derivate des Lys.

Unter den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 sind Methoden für die N^α -Methylierung von Aminosäuren und Peptiden aufgeführt. Für die Synthese *N*-methylierter Peptide steht zunächst zur Wahl, ob man die Aminosäuren in Lösung *N*-methyliert und anschließend in N^α -Fmoc- oder N^α -NBS-geschützter Form an die Festphase kuppelt oder aber die Aminosäuren während der SPPS an der Festphase *N*-methyliert. Beide Varianten sind kompatibel mit der unten beschriebenen MT-II-Synthese und liefern dasselbe Ergebnis. Die N^α -methylierten Aminosäurederivate sollten aus Gründen der etwas einfacher zu handhabenden Festphasensynthese der Peptide so weit wie möglich in Lösung hergestellt werden, was jedoch für den Fall des NBS-NMe-His(Trt)-OH mit nur geringen Ausbeuten funktioniert.^[78] Für diese Aminosäure ist es daher praktikabler, die Synthese an der Festphase durchzuführen. Auch für die N^α -methylierten Derivate des Lysins und des Arginins ist die *N*-Methylierung an der Festphase die bessere Wahl. Die nötigen Aminosäure-Edukte für die Synthesen in Lösung sind sehr teuer bzw. kommerziell nicht erhältlich.

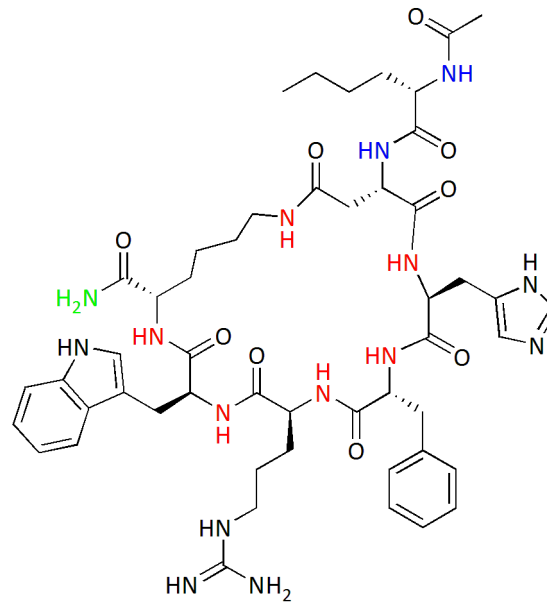


Abbildung 5-9: MT-II mit seinen Amidstickstoffatomen – sechs innerhalb des Cyclus' (rot markiert), eines am C-Terminus (grün markiert) und zwei am N-Terminus (blau markiert).

Die Synthese von MT-II wurde im Laufe der Jahre variiert. Die ursprüngliche Synthese wurde mit Boc-Schutzgruppenstrategie durchgeführt.^[221] Durch den Einsatz von Rink-Amid-Harz konnte die Fmoc-Strategie zur Anwendung kommen (siehe Abbildung 5-10). Die Verwendung von Allyl- und Alloc-Schutzgruppen ermöglichten weiterhin eine einfache Cyclisierung an der festen Phase.^[254] Rink-Amid-Harz hinterlässt beim finalen Abspalten des fertigen Cyclopeptids einen amidierten C-Terminus. Nach dem Belegen des Harzes mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH, werden nacheinander die Aminosäuren Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-DPhe-OH, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Asp(OAllyl)-OH und Fmoc-Nle-OH gekuppelt. Die Fmoc Schutzgruppe des Norleucins wird

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

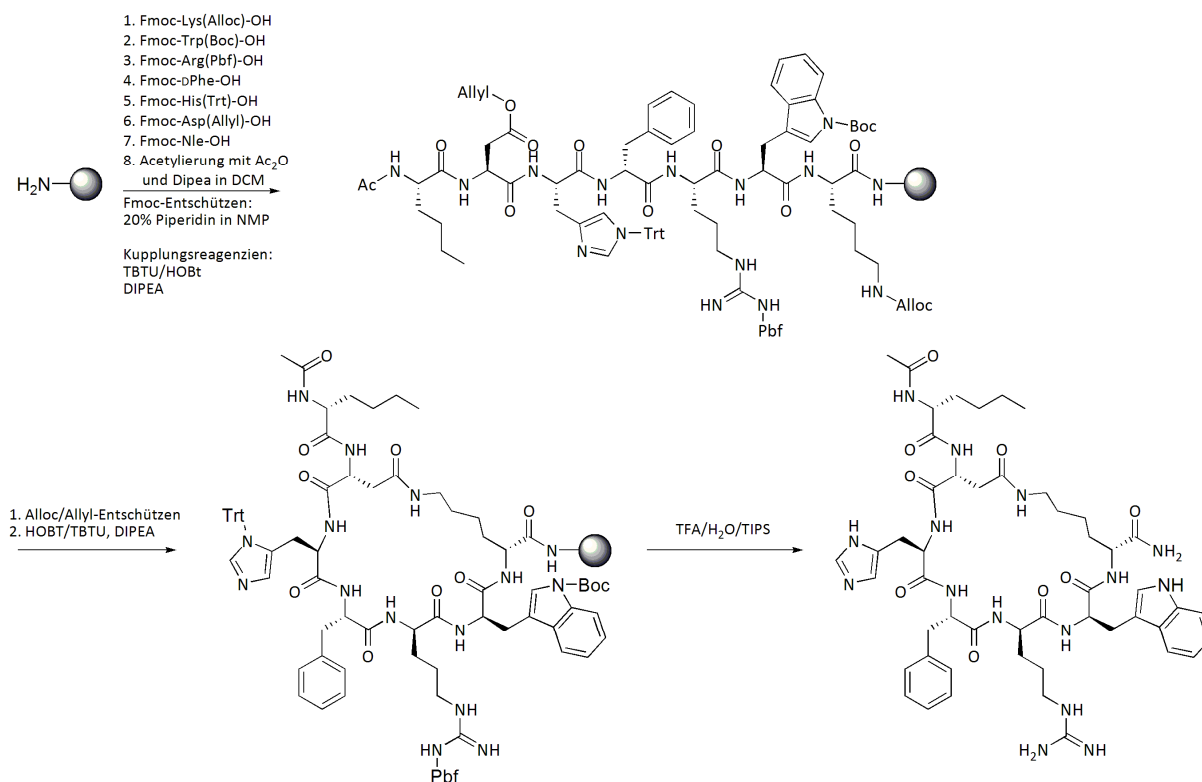


Abbildung 5-10: Schematische Darstellung der Synthese von MT-II.

entfernt und anschließend die freie N-terminale Aminofunktion acetyliert. Die Allylschutzgruppe des Aspartats und die Alloc-Schutzgruppe des Lysins können darauf gleichzeitig Pd⁰-katalysiert abgespalten werden. Durch das Hinzufügen von Kupplungsreagenz und DIPEA reagieren die Seitenketten des Aspartats und des Lysins zur Lactambrücke. Mit einer 95%-igen TFA-Lösung wird das fertige Cyclopeptid abgespalten und komplett von den säurelabilen Schutzgruppen befreit.

5.8.1. Strategien für die Synthese der Aminosäurederivate in Lösung

5.8.1.1. Synthesestrategien für die *N*^α-methylierten Aminosäurederivate

Für die Synthese der *N*^α-methylierten Aminosäuren in Lösung eignen sich verschiedene Methoden. Fmoc-DPhe-OH und Fmoc-Nle-OH sollten am besten nach der Freidinger-Methode alkyliert werden.^[67,78] Tryptophan lässt sich laut

BIRON *et al.* über die *o*NBS-Prozedur *N*^α-methylieren (siehe Abschnitt 3.3.1 und Abbildung 3-9).^[78]

5.8.1.2. Synthesestrategien für *N*-methylierte MT-II-Derivate mit *N*^ε-methyliertem Lysin

Die *N*^ε-Methylierung des Lysins könnte auf vielfältige Weise geschehen. Im Folgenden sollen verschiedene mögliche Synthesewege genannt werden. So könnte ein möglicher Weg ebenso über die *o*NBS-Prozedur erfolgen. Als Ausgangsverbindung benötigt man für diese Strategie einen Lysin-Ester, welcher an den α- und ε-Aminofunktionen über orthogonale Schutzgruppen geschützt ist. Basenlabile Schutzgruppen wie z.B. Fmoc sind zum Schutz vom α-Stickstoff eher ungeeignet, da die Reaktionsbedingungen für die Methylierung unter *o*NBS-Schutz und für das Entfernen der *o*NBS-Schutzgruppe zu basisch sind und dadurch ein ungewolltes Entschützen erfolgt. Durch das selektive Entschützen der Lysin-Seitenkette könnte anschließend das Abspalten der *o*NBS-Gruppe und Methylieren der ε-Aminofunktion erfolgen. Um Kompatibilität des Lysin-Derivats mit der MT-II-Festphasensynthese zu gewährleisten, müßte die Seitenkette allerdings wieder von der *o*NBS-Schutzgruppe befreit werden und anschließend Alloc-geschützt werden. Ausgehend von diesem Derivat wäre es möglich die α-Aminofunktion zu entschützen und diese dann mit derselben Prozedur zu *N*-methylieren. In beiden Fällen muß dann nur noch der Ester verseift werden um eine freie Carboxylfunktion zu erhalten.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

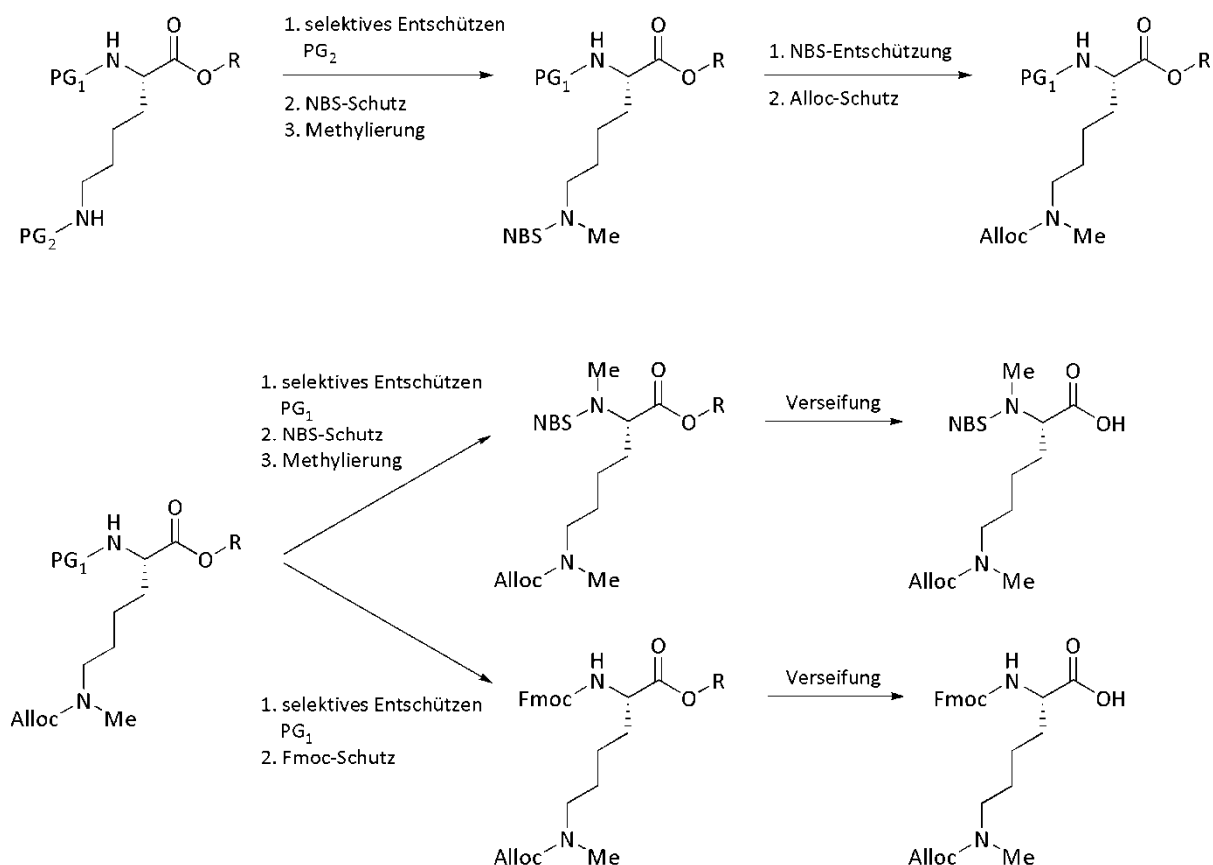


Abbildung 5-11: Ein möglicher Syntheseweg zur Darstellung N^ϵ - und $N^{\alpha/\epsilon}$ -methylierter Lysin-Derivate über *o*NBS-geschützte Aminofunktionen, wobei PG₁ keine basenlabile Schutzgruppe sein sollte.

Die Reaktionsfolge umfaßt hauptsächlich Schutzgruppentransformationen. Daher wäre es wesentlich einfacher und eleganter, wenn die Methylierung der ϵ -Aminofunktion über einen Lysin-Metall-Komplex erfolgen könnte (siehe Abbildung 5-12). Als Ausgangsverbindung würde komplett ungeschütztes und daher billiges L-Lysin dienen. Nach dem Maskieren der α -Aminofunktion und der Carboxylfunktion durch Kupfer^(II), würde im nächsten Schritt die ϵ -Aminofunktion geschützt werden, entweder mit einer *o*NBS-Schutzgruppe oder mit einer anderen Schutzgruppe, welche die anschließende Alkylierung des Stickstoffs zuläßt. Nach der Alkylierung müßte diese gegen eine Alloc-Schutzgruppe ausgetauscht werden. Nach der Zerstörung des Komplexes könnte die α -Aminofunktion Fmoc-geschützt werden. Das Fmoc-L-Lysin(NMeAlloc)-OH wäre fertig für die Festphasensynthese, bei der man gegebenenfalls die α -Aminofunktion methylieren könnte. In Lösung müßte man vor dem Fmoc-Schützen die Carboxylfunktion verestern, den freien Stickstoff *o*NBS-schützen und anschließend methylieren und zuletzt den Ester verseifen.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

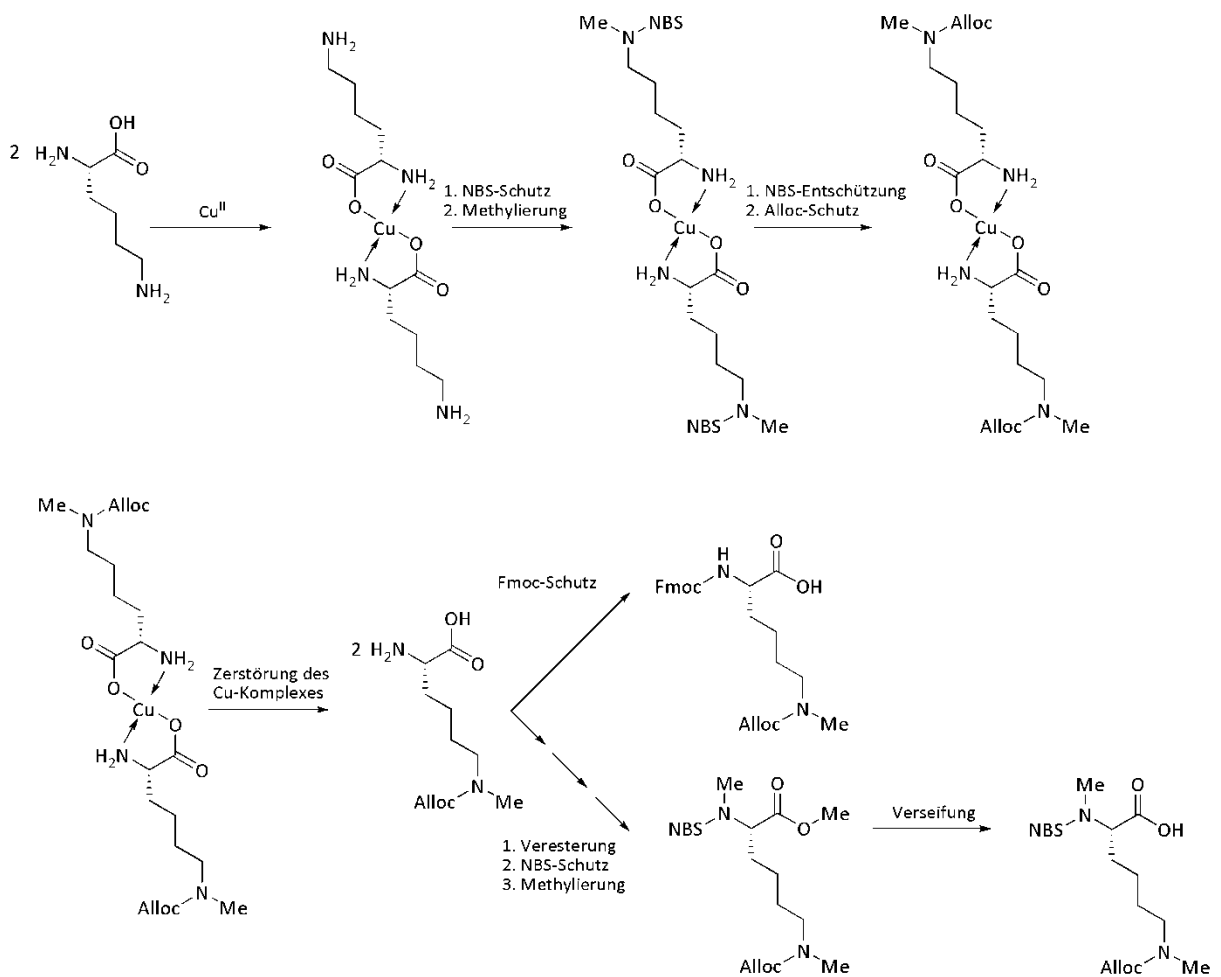


Abbildung 5-12: Ein möglicher Syntheseweg über kupferkomplexiertes Lysin zur Darstellung N^ϵ - und $N^{\alpha/\epsilon}$ -methylierter Derivate.

Neben dem Maskieren über einen Kupferkomplex besteht weiterhin die Möglichkeit, das Lysin in ϵ -Caprolactam zu transformieren und somit die Carboxylfunktion und die ϵ -Aminofunktion in einem Schritt als Amid zu schützen (siehe Abbildung 5-13). Nach dem Installieren einer Schutzgruppe für die freie Aminogruppe könnte der Amidstickstoff selektiv methyliert werden. Nach dem Öffnen des Lactamrings, müsste die ϵ -Aminogruppe Alloc-geschützt werden. Anschließend könnte man die α -Aminofunktion entweder Fmoc-schützen oder über die *o*NBS-Prozedur methylieren. Die erfordert allerdings eine vorherige Veresterung und als letzten Schritt die Verseifung dieses Esters, bevor das Derivat in der Festphasensynthese verwendet werden kann

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

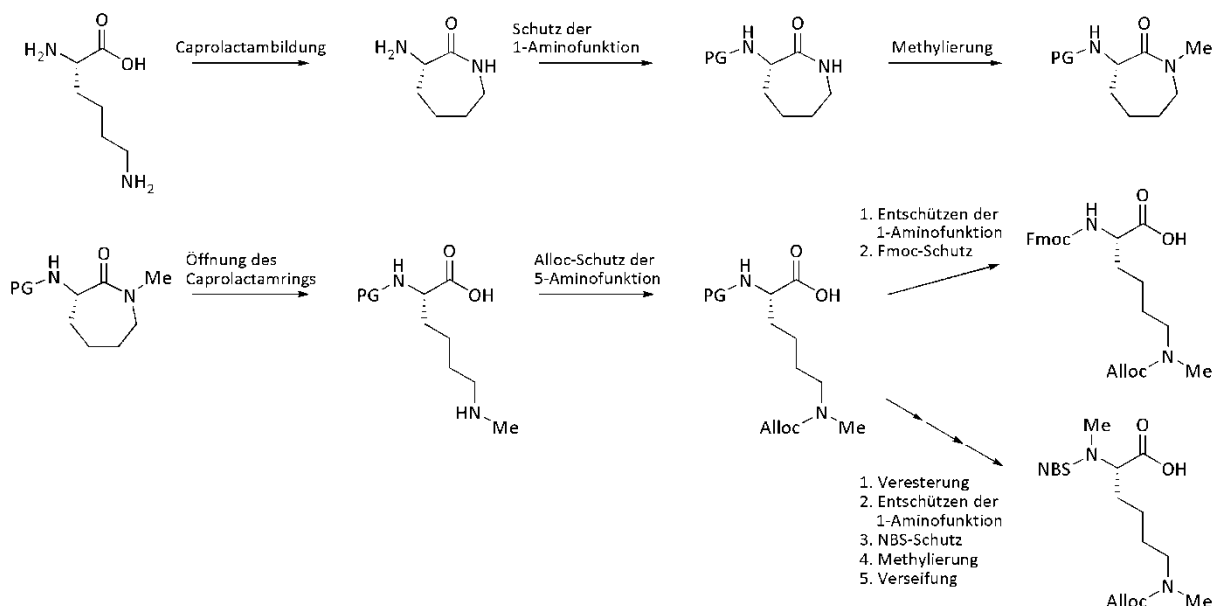


Abbildung 5-13: Schematische Darstellung des möglichen Synthesewegs N^ϵ - und $N^{\alpha/\epsilon}$ -methylierter Lysinderivate über ϵ -Caprolactam.

5.8.2. Strategien für die Synthese der Aminosäurederivate an der Festphase

5.8.2.1. Synthesestrategien für die N^α -methylierten Aminosäurederivate

Die Festphasensynthese aller benötigten α -*N*-methylierten Aminosäurederivate sollte ausgezeichnet mit der von BIRON *et al.*^[78] verbesserten Methode von MILLER und SCANLAN^[81,82] funktionieren (siehe Abschnitt 3.3.2 und Abbildung 3-11). Für die Methylierung der Seitenkettenaminofunktion des Lysins ist diese Prozedur genauso denkbar. Allerdings müsste dafür die MT-II-Synthese, wie sie unter Punkt 5.8 beschrieben ist, abgewandelt werden.

5.8.2.2. Synthesestrategien für *N*-methylierte MT-II-Derivate mit N^ϵ -methyliertem Lysin

Eine Möglichkeit wäre, ein Lysinderivat an das Rink-Amid-Harz zu koppeln, dessen Aminofunktionen orthogonal zueinander und zum *Linker* des Harzes geschützt sind. Dafür würde sich beispielsweise eine photolabile Schutzgruppe

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

oder eine Dde-Schutzgruppe für die α -Aminofunktion und ein Fmoc-Schutzgruppe für die ϵ -Aminofunktion eignen. Nach dem Entschützen der Seitenkette würde die NBS-Prozedur durchgeführt werden. Auch hier müsste die NBS-Schutzgruppe nach dem Methylierungsschritt entfernt werden und anschließend wieder mit einer Alloc-Schutzgruppe versehen werden. Danach könnte man nach dem Entfernen der photolabilen- oder Dde-Schutzgruppe mit der Peptidsynthese fortfahren oder aber die verbleibende Aminofunktion methylieren.

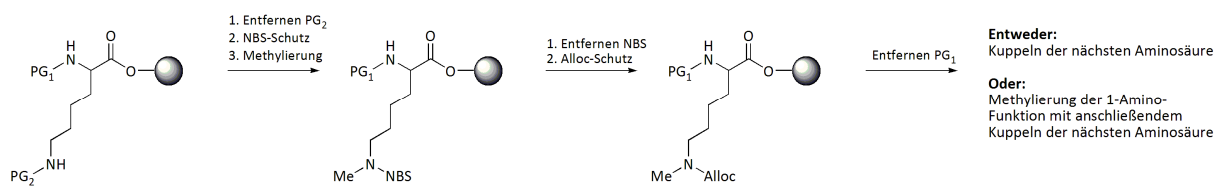


Abbildung 5-14: Ein möglicher Weg für die Methylierung der ϵ -Aminofunktion des Lysins an der Festphase. PG₁ und PG₂ müssen dabei untereinander und zum Linker der Festphase orthogonal sein.

Mit einer anderen Variante könnte man die Schritte des NBS-Entfernens und anschließenden Alloc-Schützens der Lysinseitenkette einsparen. Dafür benötigte man ein Asparaginssäurederivat, dessen Seitenkette mit einer Schutzgruppe versehen ist, welche zum Linker und zu den anderen permanenten Schutzgruppen orthogonal ist. Man könnte dann dem ursprünglichen MT-II-Syntheseprotokoll bis zur Alloc-Entschützung der Lysinseitenkette folgen. Die dann noch geschützte Carboxylfunktion der Aspartat-Seitenkette würde beim Methylieren der freien Lysinseitenkette mit der NBS-Prozedur nicht stören. Nach dem Entfernen der NBS-Schutzgruppe und der Aspartat-Seitenkettenschutzgruppe, würde man das lineare Peptid wie gewohnt cyclisieren. Alternativ könnte man aber auch Fmoc-L-Lys(*t*Bu)-OH verwenden, und nach dem NBS-Entschützen der Lysinseitenkette das lineare Peptid unter Entfernung aller verbleibenden permanenten Schutzgruppen von der Festphase abspalten und anschließend in Lösung cyclisieren.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

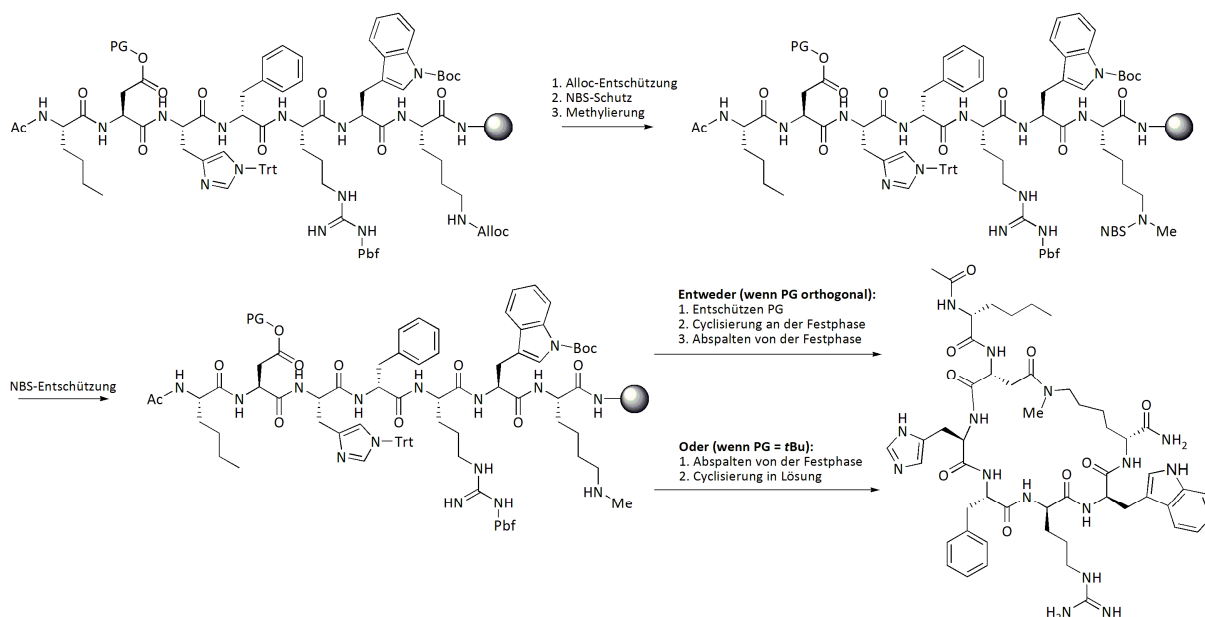


Abbildung 5-15: Durch die Variation der Seitenkettenschutzgruppe des Aspartats, eröffnen sich zwei weitere Synthesewege zu MT-II-Derivaten mit N^E-methyliertem Lysin.

5.9. Ergebnisse und Diskussion

5.9.1. Synthese der Aminosäurederivate

Für die Synthese der *N*^α-methylierten Aminosäurederivate eignen sich am besten *N*^α-ungeschützte Aminosäuremethylester mit den entsprechenden Schutzgruppen versehenen Seitenketten als Ausgangsstoffe. Sind diese nicht kommerziell verfügbar, wird eine Synthese des entsprechenden *N*^α-NBS-*N*^α-Me-Aminosäurederivats an der Festphase immer attraktiver. Dies kann zum einen, wie oben beschrieben, während der Synthese des eigentlichen Peptids erfolgen, aber auch eine Synthese des gewünschten Derivats an der Festphase mit der anschließenden Abspaltung zur Aufbewahrung und späteren Verwendung in der eigentlichen Peptidsynthese ist für nicht allzu große Mengen durchaus denkbar. Dadurch spart man sich u.U. viel Zeit und einige Reinigungsschritte, die bei der Synthese in Lösung durch die zahlreichen Schutzgruppentransformationen von Nöten sind.

Lysin

Die N^α -Methylierung wurde direkt am Harz, wie unter Abschnitt 3.3.2 (Abbildung 3-11) beschrieben, durchgeführt. Die Synthese der N^ϵ -methylierten Lysin-Derivate in Lösung wurde vom Boc-L-Lys-OH ausgehend gestartet. Nach dem Schützen der Seitenkette durch eine Z-Schutzgruppe mit Hilfe von Benzyloxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimid, wurde als nächstes die Carboxylfunktion mit *tert*-Butylbromid verestert. In der Literaturvorschrift für diesen Reaktionsschritt wird mit einem 48-fachen Überschuß an *tert*-Butylbromid und einem 26-fachen Überschuss an K_2CO_3 gearbeitet.^[255] Es hat sich gezeigt, dass ein 35-facher Überschuss an *tert*-Butylbromid eine Ausbeute von 97 % ermöglicht. Ein weiteres Absenken der Äquivalente sollte durchaus möglich sein. Nachdem die Z-Schutzgruppe wieder entfernt wurde, konnte die Aminofunktion der Seitenkette mit der *o*NBS-Schutzgruppe versehen werden. Der anschließenden Methylierung mit Dimethylsulfat folgte eine säulenchromatographische Reinigung, bevor die *o*NBS-Schutzgruppe wieder entfernt wurde. Für diesen Schritt wird oftmals Thiophenol und K_2CO_3 verwendet, was hier allerdings nicht optimal funktionierte. Besser war eine Kombination aus β -Mercaptoethanol und LiOH. Das erhaltene Produkt konnte ohne weitere Reinigung mit Allylchloroformat umgesetzt und somit Allocgeschützt werden. Erst nach diesem Schritt wurde ein weiteres Mal säulenchromatographisch gereinigt. Mit TFA und TIPS als Abfangreagenz wurden im Anschluß die Boc-Schutzgruppe und der *tert*-Butylester entfernt, bevor die α -Aminofunktion mit der Fmoc-Schutzgruppe versehen wurde. Ein letzter säulenchromatographischer Reinigungsschritt bildet den Abschluß dieser neunstufigen Synthese, die Fmoc-Lys(NMeAlloc)-OH (**10**) mit einer Gesamtausbeute von 42 % liefert. Für die Synthese des NBS-NMe-Lys(NMeAlloc)-OH koppelt man Verbindung **10** an die Festphase und *N*-methyliert über die dreistufige NBS-Methode.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

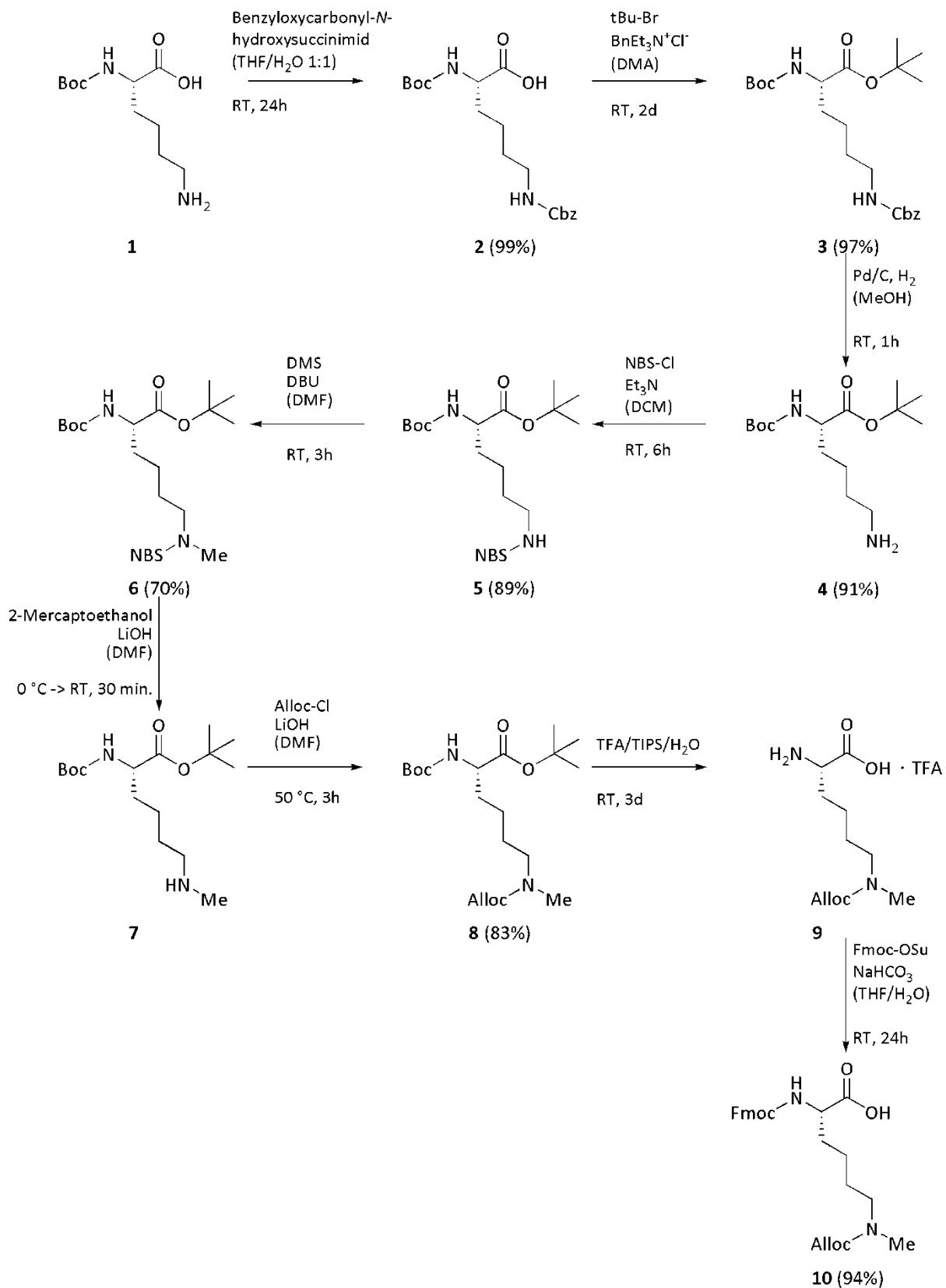


Abbildung 5-16: Die Synthese von *Fmoc*-Lys(*N*Me*Alloc*)-OH.

Tryptophan

Da H-L-Trp(Boc)-OMe·HCl kommerziell verfügbar ist, kann man NBS-NMe-L-Trp(Boc)-OH über die dreistufige Synthese^[78] in Lösung in guten Ausbeuten (90%) erhalten. Anstatt des N^{ind} -Boc-geschützten Tryptophans, kann man ebenso auch das ungeschützte Derivat verwenden, da es billiger ist und es weder bei der Synthese zur N^{α} -NBS-NMe-Variante noch bei der anschließenden Festphasensynthese zu Nebenreaktionen kam.

D-Phenylalanin und Norleucin

Die Synthese der Fmoc-NMe-Derivate wurde mit der FREIDINGER-Methode durchgeführt.

Histidin

Prinzipiell gelingt die Synthese des NBS-NMe-His(Trt)-OH in Lösung. Jedoch ist die Ausbeute bekanntermaßen schlecht.^[78] Daher wurde Histidin ausschließlich an der Festphase methyliert.

Asparaginsäure

Da H-Asp(OAllyl)-OMe nicht kommerziell verfügbar ist, synthetisiert man am besten an der Festphase.

Arginin

Auch Arginin wurde aus Kostengründen an der Festphase synthetisiert.

5.9.2. Die Synthese der *N*-methylierten MT-II-Derivate

Mit den unter Abschnitt 5.9.1 beschriebenen *N*-methylierten Aminosäurederivaten kann man nun alle theoretisch möglichen *N*-methylierten MT-II-Derivate synthetisieren. Der Aufbau des Peptids erfolgt dank der Kompatibilität der NBS-Aminosäuren zur Fmoc-Synthesestrategie genau wie bei MT-II (siehe Abschnitt 5.8). Lediglich beim Kuppeln an *N*-methylierte Aminosäuren werden TBTU und HOBT durch HATU und HOAt ersetzt. Außerdem wurde als Base Collidin anstatt DIPEA verwendet, um Racemisierung der NBS-Aminosäuren zu vermeiden.

Die Synthese der MT-II-Derivate mit *N*^α-methyliertem Lysin, Tryptophan, Arginin, D-Phenylalanin und Histidin funktionierte relativ zuverlässig. Gewisse Sequenzen konnten nicht beim ersten Mal hergestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass das konsequente Wiederholen der Synthese letztendlich zum Erfolg führte. Wodurch diese Fehlversuche zustande kamen ist nicht exakt nachvollziehbar. Es ist jedoch bekannt, dass die Synthese *N*-Methyl-reicher Peptide nach wie vor herausfordernd und mit vielen Problemen behaftet ist.^[256] Dabei ist nicht nur die Anzahl der *N*-Methylgruppen von Bedeutung, sondern auch die Position in der Sequenz. Sequenzen mit isolierten *N*-Methylgruppen sind im Allgemeinen stabiler als andere, die ganze *cluster* von *N*-methylierten Aminosäuren enthalten. Auch zeigt sich im Allgemeinen eine zunehmende Labilität des Peptids gegenüber sauren Bedingungen mit jeder weiteren eingeführten *N*-Methylgruppe. Dass dennoch alle MT-II-Derivate mit *backbone*-ständigen *N*^α-Methylgruppen darstellbar waren, spricht für eine für einen *N*-Methyl-*scan* günstige Sequenz. Gerade auch die Verwendung von Pbf als permanente und mit TFA abzuspaltende Schutzgruppe für die Argininseitenkette hätte durchaus Probleme machen können, besonders weil sich gezeigt hat, dass zum Abspalten dieser Schutzgruppe bei den methylierten MT-II-Derivaten gegenüber dem nichtmethylierten MT-II eine längere Reaktionszeit benötigt wird. Über die Gründe, welche die längeren Reaktionszeiten zum Abspalten von Seitenkettenschutzgruppen (nicht nur bei Pbf!) bei *N*-methylierten Cyclopeptiden erforderlich machen, kann hier nur spekuliert werden. Vermutlich ergeben sich durch die Methylierungen Konformationen der Rückgrate, welche sich derart auf die Seitenketten auswirken, dass diese teilweise durch andere Reste abgeschirmt werden. Da sich aber die *N*-methylierten MT-II-Derivate überraschenderweise als sehr

stabil in TFA-saurem Milieu erwiesen, mußte keine andere Synthesestrategie angewendet werden.

Nicht ganz unproblematisch war die Synthese der drei MT-II-Derivate mit ausschließlich *N*-methyliertem Aspartat und Norleucin. Es konnten nur die beiden monomethylierten Varianten realisiert werden. Ac-NMe-Nle-NMe-c[Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Lys] konnte nach dem Abspalten von der Festphase nicht isoliert werden. Ein acetylierter *N*-Terminus und zwei aufeinanderfolgende *N*-Methylaminosäuren sind Strukturelemente, die die Stabilität gegenüber TFA negativ beeinflussen.^[256] Durch die Acetylgruppe kann es zu einem Verlust der *N*-terminalen Aminosäure kommen (siehe Abbildung 5-17). Für die Synthese dieser Derivate durch Methylierung an der Festphase mußte das Protokoll der MT-II-Synthese etwas modifiziert werden. Der Aufbau dieser Derivate über den regulären MT-II-Syntheseweg mit *N*-Methylierung der exocyclischen Aminogruppen des Aspartats und des Norleucins über die dreistufige NBS-Prozedur gelang nicht. Anscheinend ist Allyl-geschütztes

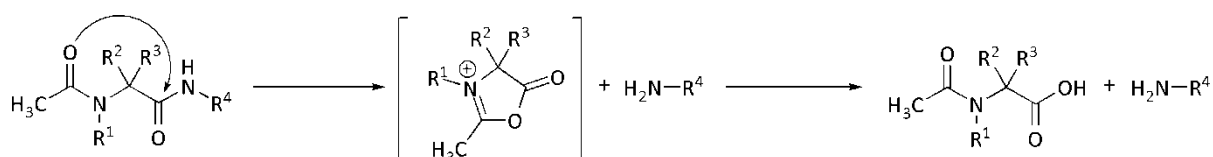


Abbildung 5-17: Darstellung des Verlusts der acetylierten *N*-terminalen Aminosäure unter dem Einfluß von Säuren. R^4 representiert die verbleibende Peptidsequenz.^[256]

Aspartat nicht inert genug für die Prozedur der Festphasenmethylierung, denn es kommt dabei vermutlich zu Nebenreaktionen mit der allylgeschützten Seitenkette. Umgehen kann man diese, indem man nach dem Kuppeln der Asparaginsäure die Alloc- und Allylschutzgruppe entfernt, das Peptid mit TBTU/HOBt/DIPEA cyclisiert, erst danach die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe entfernt und anschließend *N*-methyliert und weiterkuppelt.

Auch für die Synthese der MT-II-Verbindungen mit N^{ϵ} -methyliertem Lysin gibt es mehrere Wege. Am einfachsten ist die Verwendung von Fmoc-Lys(NMeAlloc)-OH (**12**). Damit kann man alle möglichen methylierten MT-II-Varianten über die originale MT-II-Syntheseprozedur darstellen. Für die Cyclisierung an der Festphase muss allerdings HATU verwendet werden. Aber auch eine Synthese, die ausschließlich an der Festphase (bis auf die

Cyclisierung) stattfindet, ist möglich. Hierbei muß man Fmoc-Asp(OAllyl)-OH gegen Fmoc-Asp(OtBu)-OH austauschen. Nach der Acetylierung der Norleucin-Aminofunktion wird die Alloc-Schutzgruppe des Lysins entfernt. Da die β -Carboxylfunktion des Aspartats dabei geschützt bleibt, gelingt die Methylierung der ϵ -Aminofunktion über die NBS-Prozedur ohne Probleme. Nach dem Entfernen der NBS-Schutzgruppe spaltet man das lineare Peptid ab und cyclisiert in Lösung mit DPPA. Die entschützten Seitenketten des Tryptophans, des Arginins und des Histidins stören dabei nicht. Eine Abtrennung der überschüssigen Cyclisierungsreagenzien und Nebenprodukte kann bei dieser Methode allerdings erst durch die HPLC erfolgen, da die vollentschützten Cyclopeptide eine ähnliche Hydrophilie wie diese Reagenzien und Verunreinigungen besitzen und somit nicht durch Einwirkung wäßriger Lösung ausfallen. Mit geschützten Peptiden gelingt dies. Sie kann man auf diese Art und Weise z.B. durch Filtration von den wasserlöslichen Nebenprodukten trennen. Prinzipiell ist die Cyclisierung in Lösung der Cyclisierung an der Festphase durch das geringere Auftreten von Cyclooligomerisierungen vorzuziehen, jedoch wird die Reinigung der Cyclopeptide mittels HPLC durch die überschüssigen Cyclisierungsreagenzien erschwert, da diese sehr ähnliche Retentionszeiten besitzen.

Tabelle 5-3: Zusammenstellung von Kombinationen verwendeter Seitenkettenschutzgruppen für Lysin und Aspartat, von deren Abspaltbedingungen und den auftretenden Problemen bei der Synthese von MT-II-Derivaten mit N^ϵ -methylierter Lysinseitenkette an der Festphase.

Seitenkettenschutzgruppenkombinationen	Abspaltprozedur	Problem
Lys : ivDde	Hydrazinhydrat (2% in DMF)	Allyl wird durch Hydrazin substituiert
Asp : Allyl	Pd(PPh ₃) ₄ (kat.), PhSiH ₃	
Lys : Alloc	Pd(PPh ₃) ₄ (kat.), PhSiH ₃	Nebenreaktionen bei Alloc-Abspaltung und Methylierung der Lysinseitenkette
Asp : Dmab	Hydrazinhydrat (2% in DMF)	

Durch die Wahl anderer Seitenkettenschutzgruppen für Lysin und Aspartat, welche zueinander, zu den restlichen permanenten Schutzgruppen und zum *linker* der Festphase orthogonal sind, wäre prinzipiell auch eine Cyclisierung an der Festphase möglich. Es wurde einige Kombinationen mit verschiedenen Schutzgruppen probiert, jedoch kam es bei allen zu unerwünschten

Nebenreaktionen (siehe Tabelle 5-3). Es existieren natürlich viele weitere Schutzgruppen, welche sich - zumindest rein theoretisch - für diese Synthese eignen. Aufgrund der erfolgreichen, oben bereits beschriebenen Synthesewege für MT-II-Derivate mit *N*^ε-methylierter Lysinseitenkette, wurden weitere Kombinationen jedoch nicht ausprobiert.

5.9.3. Ergebnisse der biologischen Tests

5.9.3.1. Kompetitive Bindungs- und Adenatcyclaseassays

5.9.3.1.1. Einführung

Die Verbindungen der Peptidbibliothek wurden in kompetitiven Bindungsassays und in Adenylatcyclaseassays auf ihre biologische Aktivität getestet. Die Tests wurden von der Arbeitsgruppe VICTOR J. HRUBY an der *University of Arizona* in Tucson durchgeführt. Für beide Assays wurden HEK293-Zellen verwendet, welche die Rezeptoren hMC1R und hMC3-5R stabil exprimieren.^[257-259]

Für den Bindungsassay werden die Zellen mit Lösungen verschiedener Konzentrationen des jeweiligen Peptids und markiertem [¹²⁵I]-NDP-MSH inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen gewaschen und aufgeschlossen. Anschließend wird die Radioaktivität des Zelllysats registriert.^[257-259] Dadurch läßt sich die Verdrängung des sehr stark bindenden [¹²⁵I]-NDP-MSH durch das entsprechende Peptid analysieren und somit der IC₅₀-Wert berechnen. Der IC₅₀-Wert gibt die mittlere inhibitorische Konzentration an, bei der in vitro eine 50 %-ige Inhibition beobachtet wird.

Die Ermittlung der EC₅₀-Werte erfolgt im Adenylatcyclaseassay. Dazu werden die HEK293-Zellen mit Aliquoten der jeweiligen Peptidlösung unterschiedlicher Konzentration für einen gewissen Zeitraum inkubiert. Die Reaktion wird abrupt gestoppt, die Zellen aufgeschlossen und das Lysat anschließend zentrifugiert. Aliquote des Überstands werden wiederum für mehrere Stunden mit [³H]-cAMP in PKA-Puffer gegeben. Die Menge an [³H]-cAMP wird durch einen Lumineszenz-Zähler und durch einen Szintillationszähler ermittelt. Mit Hilfe einer cAMP-Standardkurve, die auf die gleiche Weise erhalten wurde, lassen sich dann die cAMP-Ansammlungen und somit die EC₅₀-Werte bestimmen.^{[257-}

^{259]} Die EC₅₀-Werte geben die mittlere effektive Konzentration an, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird.

Die im nächsten Abschnitt angegebenen Werte sind der Durchschnitt von zwei Experimenten, die jeweils dreifach ausgeführt wurden. Die IC₅₀- und EC₅₀-Werte und die damit verbundenen Standardfehler wurden durch das Angleichen der Daten mit Hilfe einer nichtlinearen Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Für die MT-II-Derivate mit *N*-methylierten exocyclischen Amidbindungen können an dieser Stelle leider keine Testergebnisse präsentiert werden.

5.9.3.1.2. Ergebnisse der kompetitiven Bindungs- und Adenylatcyclaseassays für die *N*^α-methylierten MT-II-Derivate

Die MT-II-Derivate mit einfacher *N*^α-Methylierung zeigen größtenteils keinen dramatischen Verlust der Bindungsaktivität (siehe Tabelle 5-4; Peptide **2-6**). Nur die *N*-Methylierung des D₂Phe in Peptid **5** verursacht einen kompletten Verlust der Bindung an die Rezeptoren hMC1R und hMC3-5R. Im cAMP-Assay erweisen sich die Peptide **2**, **3** und **6** weiterhin als volle oder partielle Agonisten für alle Rezeptorsubtypen (Tabelle 5-6). Bereits in früheren Studien erwies sich D₂Phe als besonders wichtige Aminosäure in Hinsicht auf die cAMP-Aktivität.^[219,260,261] Der Phenylring interagiert bei Agonisten mit den aromatischen Gruppen der 3. und der 6. Transmembranhelix.^[262] Diese Interaktionen werden durch die *N*-Methylierung in Peptid **5** anscheinend unterbunden. In Peptid **6** hingegen lässt sich eine erhöhte Bindungsselektivität für die Rezeptoren hMC1R und hMC3R beobachten.

5 N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Tabelle 5-4: Ergebnisse des kompetitiven Bindungsassays der N^α-methylierten MT-II-Derivate (Teil 1).

#	Sequenz	hMC1R		hMC3R		hMC4R		hMC5R	
		IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]
1	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	3.5 ± 0.23	100.0 ± 0.00	6.8 ± 0.87	100.0 ± 0.00	4.2 ± 1.06	100.0 ± 0.00	12.1 ± 2.28	100.0 ± 0.00
2	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	670 ± 100	100 ± 20	23 ± 4.5	98 ± 0.58	88 ± 32	99 ± 1.5	77 ± 29	97 ± 0.43
3	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	88 ± 11	100 ± 10	27 ± 3	100 ± 10	1700 ± 16	100	780	100 ± 10
4	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	90 ± 11	100 ± 20	14 ± 1	100 ± 10	2000	100	450	89 ± 6
5	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
6	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	100 ± 20	97	37 ± 1	100 ± 11	1300	1101 ± 100	3400	85 ± 6
7	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	4.3 ± 1.6	98 ± 0.12	65 ± 4.6	98 ± 1.7	370 ± 120	10 ± 0.15	2200 ± 330	78 ± 2
8	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	12 ± 4	100 ± 20	28 ± 1	100 ± 1	720 ± 80	100 ± 9	840 ± 100	89 ± 10
9	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
10	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	270 ± 30	100	200 ± 64	72 ± 16	1300 ± 150	91 ± 9	580 ± 380	63 ± 14
11	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	6.7 ± 0.38	89 ± 0.97	13 ± 1	69 ± 5	440 ± 50	54 ± 9	1600 ± 110	87 ± 55
12	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	NB	NB	890 ± 180	84 ± 3.2	NB	NB	NB	NB
13	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	56 ± 26	98 ± 0.78	81 ± 24	98 ± 1.54	NB	NB	130 ± 11	80 ± 77
14	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	6700 ± 3400	73 ± 3.5	1400 ± 100	77 ± 8	NB	NB	840 ± 33	81 ± 22
15	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	35 ± NA	100 ± NA	120 ± 100	97 ± 9	1700 ± 200	88 ± 9	1800 ± 200	92 ± 10

■ grau hinterlegte Aminosäuren sind N-methyliert

IC₅₀ = Konzentration des Peptids für halbmaximale, spezifische Bindung (N=4). NB = 0% ¹²⁵I-NDP-MSH-Verdrängung bei 10 μM. Prozentuale Bindungseffizienz = maximaler Prozentsatz an ¹²⁵I-MSH-Verdrängung bei 10 μM.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Tabelle 5-5: Ergebnisse des kompetitiven Bindungsassays der *N*^α-methylierten MT-II-Derivate (Teil 2).

#	Sequenz	hMC1R		hMC3R		hMC4R		hMC5R	
		IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]
16	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
17	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	8.2 ± 4.6	100 ± 1.9	120 ± 22	94 ± 1.9	400 ± 190	890 ± 66	200 ± 28	95 ± 32
18	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
19	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	190 ± 92	92 ± 6.3	1900 ± 200	83 ± 3	NB	43 ± 4	580 ± 81	83 ± 1.4
20	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
21	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	31 ± 8.1	88 ± 67	320 ± 20	95 ± 10	6000 ± 100	65 ± 6	215 ± 84	83 ± 11
22	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
23	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
24	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	57 ± 12	95 ± 1.1	NB	NB	NB	NB	NB	NB
25	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
26	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	620 ± 60	95 ± 10
27	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	2500 ± 110	55 ± 10	NB	NB	NB	NB	NB	NB
28	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	14 ± 4.0	95 ± 1	2200 ± 480	95 ± 4.2	NB	NB	NB	NB
29	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	690 ± 70	92 ± 10
30	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	720 ± 80	100 ± 10
31	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB
32	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NB	NB	NB	NB	NB	NB	160 ± 20	89 ± 8

■ grau hinterlegte Aminosäuren sind *N*-methyliert

IC₅₀ = Konzentration des Peptids für halbmaximale, spezifische Bindung (N=4). NB = 0% ¹²⁵I-NDP-MSH-Verdrängung bei 10 μM. Prozentuale Bindungseffizienz = maximaler Prozentsatz an ¹²⁵I-MSH-Verdrängung bei 10 μM.

5 N-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Tabelle 5-6: Ergebnisse des Adenatcyclaseassays der N^α-methylierten MT-II-Derivate (Teil 1).

#	Sequenz	hMC1R		hMC3R		hMC4R		hMC5R	
		EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]
1	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	2.0 ± 0.38	100	5.6 ± 1.9	100	7.3 ± 1.5	100	5.6 ± 1.1	100
2	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	1.1 ± 0.30	100 ± 2.7	62 ± 6.5	52 ± 6.2	62 ± 2.2	78 ± 8	3.7 ± 0.77	82 ± 8.6
3	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	1.8 ± 0.40	77 ± 13	2.1 ± 0.2	100 ± 1	19 ± 15	86 ± 33	5.6 ± 2.5	66 ± 12
4	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	1.7 ± 0.03	60 ± 2	3.4 ± 2.1	97 ± 11	3.3 ± 0.3	73 ± 10	6.0 ± 2.2	77 ± 19
5	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	5.3 ± 1.3	58 ± 12	9400	260	79 ± 7	55 ± 5	22 ± 16	73 ± 14
7	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	7.6 ± 6.0	79 ± 36	47 ± 36	25 ± 4	100 ± 10	80 ± 8	NA	NA
8	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	9.5 ± 7.7	100 ± 1.3	19	60	27 ± 3	53 ± 5	12 ± 1	53 ± 2
9	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
10	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	13 ± 9.8	70 ± 28	19	90	470 ± 36	83 ± 13	1000 ± 100	67 ± 3
11	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	2.7 ± 0.04	100 ± 5	61 ± 35	58 ± 8.7	440 ± 220	86 ± 11	420 ± 220	65 ± 1
12	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	NA	NA	800 ± 760	84 ± 5.5	NA	NA	NA	NA
13	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	18 ± 16	110 ± 7.0	7.0	20 ± 3	NA	NA	NA	NA
14	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	110 ± 20	77 ± 1	570	85 ± 10	9200 ± 6000	130 ± 33	1400 ± 69	58 ± 14
15	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ^α]	13 ± 10	97 ± 10	4.6	75 ± 8	370 ± 50	43 ± 5	480 ± 50	71

■ grau hinterlegte Aminosäuren sind N-methyliert

EC₅₀ = Effektive Peptidkonzentration, welche nötig war, um halbmaximale intrazelluläre cAMP-Ansammlung zu generieren (N=4). Prozentuale Aktivität = prozentualer Anteil cAMP bei 10 μM Ligandenkonzentration in Relation zu MT-II. NA = 0% cAMP-Konzentration bei 10 μM Ligandenkonzentration. Es wurde für Peptidkonzentrationen von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁵ M getestet.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Tabelle 5-7: Ergebnisse des Adenatcyclaseassays der *N*^α-methylierten MT-II-Derivate (Teil 2).

#	Sequenz	hMC1R		hMC3R		hMC4R		hMC5R	
		EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]
16	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	1.8 ± 1.3	78 ± 24	120 ± 21	19 ± 6.4	NA	NA	400 ± 360	78 ± 2.1
18	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	18 ± 3.5	100 ± 0.25	NA	NA	1600 ± 500	62 ± 24	NA	NA
20	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
21	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	2.3 ± 1.2	88 ± 11	NA	NA	290 ± 30	65 ± 1	220 ± 180	47 ± 5
22	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
24	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	40 ± 18	100 ± 8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	520 ± 60	6 ± 1
27	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	750 ± 280	87 ± 25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
28	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	13 ± 10	98 ± 66	NA	NA	NA	NA	NA	NA
29	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
30	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	670 ± 150	42 ± 13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
31	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
32	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

■ grau hinterlegte Aminosäuren sind *N*-methyliert

EC₅₀ = Effektive Peptidkonzentration, welche nötig war, um halbmaximale intrazelluläre cAMP-Ansammlung zu generieren (N=4). Prozentuale Aktivität = prozentualer Anteil cAMP bei 10 μM Ligandenkonzentration in Relation zu MT-II. NA = 0% cAMP-Konzentration bei 10 μM Ligandenkonzentration. Es wurde für Peptidkonzentrationen von 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁵ M getestet.

Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen früherer Untersuchungen,^[263] in denen die Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Histidin-Restes zu potenten Antagonisten besonders für hMC3R führte. In der Gruppe der zweifach *N*^α-methylierten MT-II-Derivate (siehe Tabelle 5-4 bis Tabelle 5-7; Peptide **7-16**) lassen sich einige interessante Beobachtungen machen. Wie Peptid **5** verlieren alle methylierten Derivate, in denen mit *N*Me-DPhe kombiniert wird (Peptide **9, 12, 14, 16**), fast vollständig ihre Bindung und Aktivität und bestätigen somit die Ergebnisse der Monomethylierung. Die Kombinationen mit *N*Me-Lys (Peptide **7, 8, 10**) weisen eine reduzierte Bindungsaffinität für hMC4R und hMC5R auf. Mit Ausnahme von Peptid **7** am hMC5R bleiben diese Verbindungen jedoch partielle Agonisten. Die Kombinationen mit *N*Me-Trp führen zu einem starken Verlust an Bindung und funktioneller Aktivität zu den Rezeptoren hMC4R und hMC5R und somit zu einer höheren Selektivität zum hMC3R (Peptid **12**). Für die Peptide **11** und **13** läßt sich eine selektivere agonistische Aktivität für den hMC1R, sowie im Falle von Peptid **13** eine selektivere antagonistische Aktivität für den hMC3R beobachten. Die Kombination von *N*Me-His und *N*Me-Arg in Peptid **15** reduziert die Affinität zu den Rezeptoren hMC4R und hMC5R und steigert somit die agonistische Selektivität zu hMC1R und hMC3R.

Auch in der Gruppe der dreifach methylierten Peptide (Peptide **17-26**) verlieren alle Derivate mit *N*-methyliertem DPhe, mit Ausnahme von Peptid **26**, ihre Bindungs- und Aktivierungsfähigkeit für alle Rezeptorsubtypen. Die meisten anderen Kombinationen behalten eine gewisse Bindungsfähigkeit zu den hMCRs (Peptide **17, 19, 21, 24**) jedoch mit einer geringeren cAMP-Aktivierung außer am hMC1R. Allgemein ausgedrückt läßt sich festhalten, dass die dreifache *N*-Methylierung die agonistische Selektivität zum hMC1R steigert. Peptid **24** beispielsweise verliert sämtliche Bindungsaffinität zu den hMCRs außer zum hMC1R. Dieser wird noch relativ stark gebunden und aktiviert.

Der Trend hin zu größerer Selektivität aber geringerer Aktivität setzt sich in der Gruppe der fünf vierfach methylierten MT-II-Derivate fort (Peptide **28-31**), in der eine Abnahme der Bindungsaffinität und der Aktivität für alle hMCRs beobachtet werden kann, außer bei Peptid **28**, dem einzigen ohne *N*Me-DPhe. Peptid **28** bindet mit hoher Affinität (14 nmol) an den hMC1R, und das mit voller agonistischer Aktivität (13 nmol), und ist somit ein hochpotenter und selektiver Agonist für den hMC1R. Die übrigen Verbindungen, die Peptide **29**

und **30** und auch das fünfmal methylierte Peptid **32**, sind zwar schwache, aber selektive Antagonisten für den hMC5R.

5.9.3.1.3. Ergebnisse der kompetitiven Bindungs- und Adenylatcyclaseassays für die MT-II-Derivate mit N^{ϵ} -methyliertem Lysin

Bei den Ergebnissen des kompetitiven Bindungsassays und des Adenylatcyclaseassays (siehe Tabelle 5-8) der ein- und zweifachmethylierten MT-II-Derivate mit N^{ϵ} -methyliertem Lysin fällt sofort auf, dass auch hier eine Methylgruppe an der Aminofunktion des D-Phenylalanins (Peptid **37**) in einem kompletten Verlust der Bindungsfähigkeit für alle Melanocortinrezeptoren resultiert und sie somit konform mit den Ergebnissen der N^{α} -methylierten MT-II-Derivate sind. Dementsprechend findet auch keine Aktivierung dieser Rezeptoren statt. Die anderen Verbindungen verlieren nur partiell ihre Affinität, besonders zum hMC4R, aber auch zum hMC3R, wodurch die Selektivität steigt. Besonders interessant ist Peptid **33**, welches identische IC_{50} -Werte wie MT-II vorweisen kann, außer am hMC4R: dort beträgt der IC_{50} 3.2 μ M. Nur hMC1R und hMC3R werden aktiviert, wodurch dieses Derivat zu einem Agonisten für hMC1R und hMC3R, sowie zu einem Antagonisten für hMC4R und hMC5R wird. Alle anderen Verbindungen wirken an allen Rezeptoren agonistisch. hMC3R und hMC4R werden nur mit IC_{50} -Werten im dreistelligen nanomolaren Bereich gebunden. Die Aktivität bleibt aber auf MT-II-Niveau. Vergleicht man diese Werte mit denen der entsprechenden monomethylierten Verbindungen ohne N^{ϵ} -methyliertes Lysin (siehe Tabelle 5-4 und Tabelle 5-6, Peptide **2-6**), dann kann man bei diesen - mit Ausnahme des hMC3R - an allen Rezeptoren und vor allem am hMC4R und hMC5R einen stärkeren Verlust ihrer Bindungsfähigkeit feststellen.

Tabelle 5-8: Ergebnisse des kompetitiven Bindungsassays und des Adenatcyclaseassays der *N*^ε-methylierten MT-II-Derivate.

#	Sequenz	hMC1R		hMC3R		hMC4R		hMC5R	
		IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]	IC ₅₀ [nM]	Bindungs-effizienz [%]
1	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	3.5 ± 0.23	100.0 ± 0.00	6.8 ± 0.87	100.0 ± 0.00	4.2 ± 1.06	100.0 ± 0.00	12.1 ± 2.28	100.0 ± 0.00
33	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	1.7 ± 0.21	97 ± 1.2	6.8 ± 0.25	98 ± 1.2	3200 ± 580	33 ± 1.3	9.3 ± 0.01	96.0 ± 4.2
34	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα/ε]	3.0 ± 0.3	100	169 ± 20	100	400 ± 30	100	5 ± 1	95
35	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	7.0 ± 0.7	100	109 ± 10	100	174 ± 92	96	94.5 ± 20.0	100
36	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	4.9 ± 0.3	100	142 ± 10	100	757 ± 501	88	44 ± 27	99
37	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	NB	0	NB	0	>5000	30	NB	0
38	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	3.0	100	12 ± 2	100	170 ± 18	100	3 ± 0.1	100

■ grau hinterlegte Aminosäuren sind *N*-methyliert

IC₅₀ = Konzentration des Peptids für halbmaximale, spezifische Bindung. NB = 0% ¹²⁵I-NDP-MSH-Verdrängung bei 10 μM. Prozentuale Bindungseffizienz = maximaler Prozentsatz an ¹²⁵I-MSH-Verdrängung bei 10 μM

#	Sequenz	hMC1R		hMC3R		hMC4R		hMC5R	
		EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]	EC ₅₀ [nM]	Aktivität [%]
1	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	2.0 ± 0.38	100	5.6 ± 1.9	100	7.3 ± 1.5	100	5.6 ± 1.1	100
33	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	1.8 ± 1.2	99 ± 4.6	9.1 ± 4.8	68 ± 43	NA	NA	NA	NA
34	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kα/ε]	3.24 ± 0.55	99	7.6 ± 3.3	100	9.4 ± 1.3	96	2.2	75
35	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	6.99 ± 1.1	100	4.0 ± 1.8	100	5.6 ± 2.7	87	2.4	80
36	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	4.91 ± 0.8	83.3	6.4 ± 1.3	100	53.4	78	6.1	80
37	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	>10000	100	1062 ± 314	100	>10000	130	>4000	100
38	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-Kε]	2 ± 0.2	100	10 ± 1	100	28.5 ± 11.5	98	2.4	100

■ grau hinterlegte Aminosäuren sind *N*-methyliert

EC₅₀ = Effektive Peptidkonzentration, welche nötig war, um halbmaximale intrazelluläre cAMP-Ansammlung zu generieren. Prozentuale Aktivität = prozentualer Anteil cAMP bei 10 μM Ligandenkonzentration in Relation zu MT-II. NA = 0% cAMP-Konzentration bei 10 μM Ligandenkonzentration.

5.9.3.2. Untersuchung der intestinalen Wirkstoffabsorption

5.9.3.2.1. Einführung

In Kapitel 2 wurde bereits die „Pfizer’s rule of five“ vorgestellt, mit denen sich die orale Verfügbarkeit von Wirkstoffen abschätzen läßt. Bei der oralen Einnahme von Medikamenten ist der Gastrointestinaltrakt der bevorzugte Resorptionsort. Dessen Epithel dient dem Flüssigkeits- und Stoffaustausch. Die Darmschleimhaut ist somit die erste biologische Barriere, die der Wirkstoff überwinden muß. Für den Transport und die Transportleistung sind verschiedene spezifische Transportwege verantwortlich. Dabei lassen sich vier verschiedene Wege unterscheiden:

- passiv transzellulär
- passiv parazellulär
- aktiv Carrier-vermittelt
- Transport durch Transzytose.

Zur Untersuchung der intestinalen Absorption gibt es verschiedene Methoden, die in *in vivo*-, *in situ*- und in *in vitro*-Methoden unterteilt werden können. Zu den *in vitro*-Methoden gehört auch die Verwendung der Caco-2-Zelllinie. Dies sind adhärente Zellen, die morphologische und physiologische Ähnlichkeit zum menschlichen Dünndarmepithel besitzen. So besitzen sie einen Bürstensaum und Dome, sie polarisieren und bilden *tight junctions* zwischen benachbarten Zellen aus. Daher eignen sich Caco-2 *monolayer* besonders, um den Transportmechanismus von Wirkstoffen durch das Epithel zu untersuchen. Die Tests wurden von der Gruppe um CHAIM GILON an der *Hebrew University of Jerusalem* durchgeführt.

5.9.3.2.2. Ergebnisse der Caco-2-Zelltests

Die Caco-2-Permeabilitätstests wurden mit einer Auswahl unterschiedlich stark N^{α} -methylierter MT-II-Derivate durchgeführt, aber auch mit MT-II selbst. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-18 dargestellt.

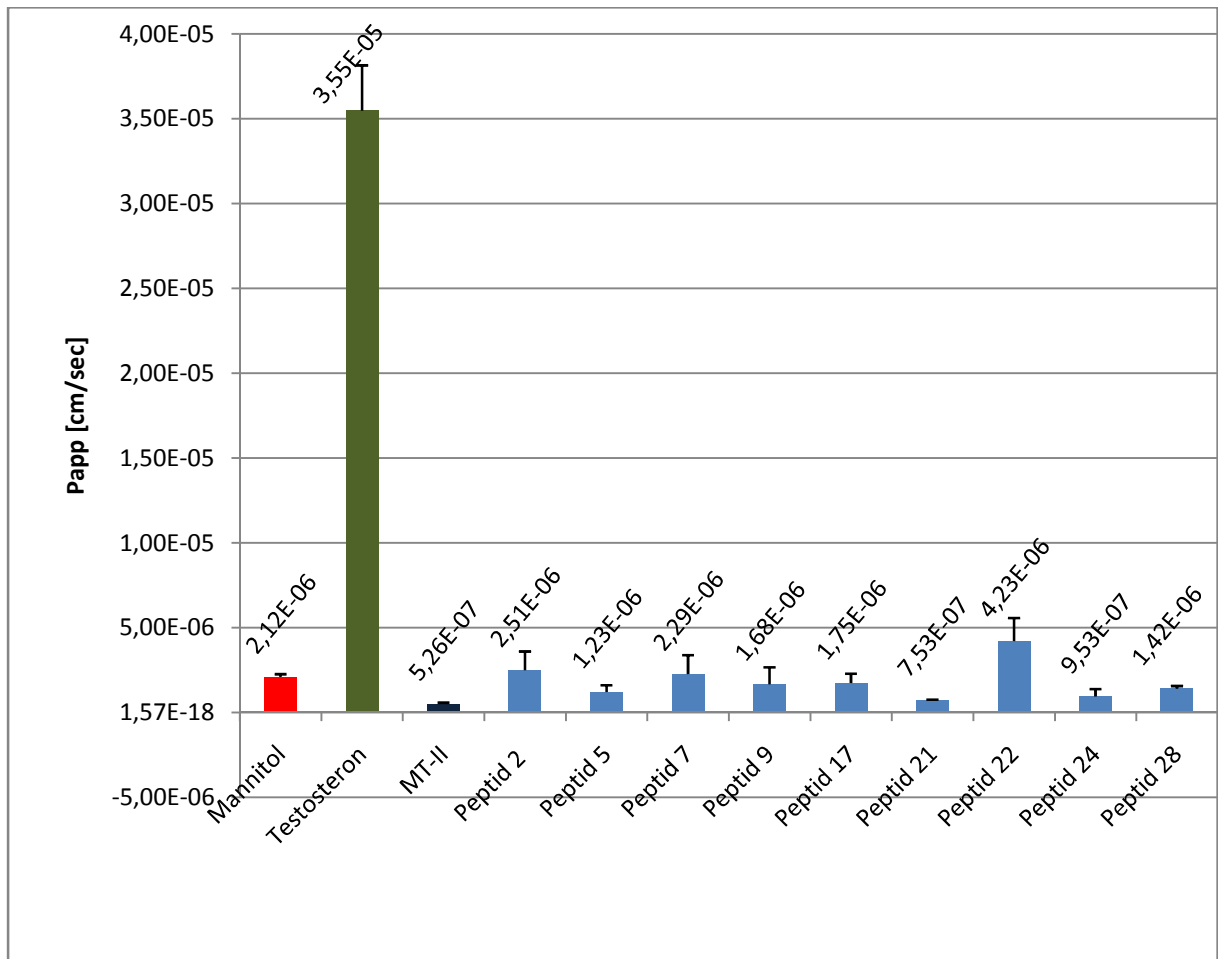


Abbildung 5-18: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Caco-2-Permeabilitätstests mit einer Auswahl N^{α} -methylierter MT-II-Derivate. Die Bezeichnungen der Peptide entspricht denen aus Tabelle 5-4 bis Tabelle 5-7 (siehe Seite 61-64).

Alle methylierten Verbindungen haben Permeationskoeffizienten zwischen $P_{app} = 7,53 \cdot 10^{-7}$ bis $4,23 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$. Obwohl es einige Variabilität gibt, liegen alle Werte im Bereich des Permeationskoeffizienten von Mannitol, einem Marker für die parazelluläre Permeabilität. Tendenziell läßt sich kein Trend der höhergradig methylierten Verbindungen zu höheren Permeabilitätskoeffizienten feststellen, jedoch wird der

Permeabilitätskoeffizient von MT-II von allen methylierten MT-II-Derivaten übertroffen. Dabei stellt Peptid **22**, das ebenso wie die Peptide **17**, **21** und **24** an drei Positionen methyliert ist, mit seinem hohen Permeabilitätskoeffizienten eine Ausnahme dar. Anscheinend ist nicht nur die Anzahl an *N*-Methylierungen von Wichtigkeit, sondern auch deren Position. Die Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen.^[41] Obwohl die Messwerte der Verbindungen durchweg für einen parazellulären Transportweg sprechen, kann man auch an diesen Beispielen erkennen, daß hochgradige *N*-Methylierung einen parazellulären Transport durch die wässrige Umgebung der Poren in den *tight junctions* beschleunigen kann.

5.9.3.3. Blutserumstabilitätstests

Wie bereits in Kapitel 2 erwähnt wurde, werden Peptide durch Cyclisierung und *N*-Methylierung metabolisch stabiler. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden verschiedene *N*-methylierte MT-II-Derivate in menschliches Blutserum gegeben. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und der Gehalt an intaktem Peptid analysiert. In Tabelle 5-9 sind einige Ergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle 5-9: Ergebnisse der enzymatischen Stabilitätstest einiger *N*-methylierter MT-II-Verbindungen sowie vom nichtmethylierten MT-II und dessen linearer Version. *N*-methylierte Aminosäuren sind grau unterlegt. k.A. = es liegt kein Messwert vor. Die Messwerte sind in mAU · min angegeben = Konzentration der Probenlösung.

#	Peptid	Zeit in min (h)						Fläche in mAU · min
		5 (0.08)	10 (0.17)	15 (0.25)	120 (2)	1140 (19)	1740 (29)	
1	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	60.81	k.A.	115.02	49.52	50.88	62.31	
33	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K ₆]	k.A.	91.19	146.38	168.95	132.64	75.44	
24	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	88.87	k.A.	95.14	k.A.	231.08	140.08	
28	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	114.70	140.34	125.1	158.07	202.12	149.96	
32	Ac-Nle-c[D-H-f-R-W-K]	127.79	133.5	147.1	32.49	135.25	128.58	
52	Ac-Nle-D-H-f-R-W-K-NH ₂	0	0	k.A.	k.A.	0	k.A.	

Die Ergebnisse schwanken recht stark und lassen daher keine exakten quantitativen Rückschlüsse zu. Als Referenz diente MT-II (siehe Peptid **1**, Tabelle 5-9), das nach einer Verweilzeit von 29 Stunden im Prinzip in der anfänglichen Konzentration in der Probenlösung vorlag. Aufgrund seiner cyclischen Struktur ist es bereits sehr stabil. Da verwundert es nicht, daß auch für die methylierten Derivate nach 29 Stunden Werte in der Größenordnung der Anfangswerte vorliegen. Um die Funktionstüchtigkeit des Assays zu demonstrieren wurde zudem MT-II in seiner offenkettigen Version getestet (Peptid **52**). Bereits nach 5 Minuten ist diese Verbindung nicht mehr in der Probenlösung auffindbar. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die *N*-methylierten MT-II-Derivate in humanem Blutserum sehr stabil sind.

5.9.4. Ergebnisse der NMR-Konformationsanalyse (durchgeführt von Johannes Beck in unserer Gruppe)

Die Tatsache, dass MT-II an vier Melanocortinrezeptoren bindet, spricht für ein relativ flexibles Rückgrat des Cyclopeptids, wodurch es ihm erleichtert wird, diejenigen Konformationen anzunehmen, die für das Binden und die Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren nötig sind (*induced fit*). Im Gegensatz dazu besitzt das Rückgrat von Peptid **28** eine eindeutige und bevorzugte Struktur. Dies ergibt sich aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen, sowie aus eingeschränkten Distanzgeometrieberechnungen (DG), eingeschränkten 150 ps *molecular-dynamics*-Simulationen (MD) und uneingeschränkten 30-ns-MD-Simulationen in explizitem Wasser. Lediglich die lactamverbrückten Seitenketten von Asp⁵ und NMe-Lys¹⁰ sind flexibel. Die gemessenen und berechneten Abstände zeigen eine gute Übereinstimmung und sprechen für eine bevorzugte Konformation der aus den eingeschränkten MD-Simulationen erhaltenen Struktur.^[264] Außer kleinen Änderungen bei vier Diederwinkeln des Rückgrats, die in einem Bereich von 20° bis 40° liegen, erwies sich die Struktur in einer, über einen sehr langen Zeitraum (30 ns) reichenden, uneingeschränkten MD-Simulation in Wasser als explizitem Lösungsmittel als sehr stabil. Weitere Indikatoren, die für zuverlässige Strukturinformationen sprechen, sind die hauptsächliche Parallelorientierung der Bindungsvektoren von CO(i) zu C^αH^α(i+1) und die weite Streuung der chemischen Verschiebungen der Signale des Rückgrats.^[265] Im Gegensatz dazu

ist die Streuung der chemischen Verschiebungen dieser Signale bei MT-II nur gering, was genauso für ein viel flexibleres Peptid-Rückgrat spricht, wie die fehlende starke Differenzierung von H^N -Temperaturgradienten (-8.61 bis -5.24 ppb/K) und Amidprotonenaustauschraten sowie die weniger stark ausgeprägte Neigung zu unterschiedlichen Konformationen der Seitenketten.

Alle Peptidbindungen von Peptid **28** sind trans-konfiguriert (siehe Abbildung 5-19). Dies wird durch das ROE-Muster dieser Verbindung manifestiert. Die NMe-His⁶-Rückgratdiederwinkel ($\phi = -98^\circ$ und $\psi = 78^\circ$) der durch die eingeschränkte MD-Simulation erhaltenen Struktur sprechen für einen um das NMe-His⁶ zentrierten invertierten γ -turn.^[266] Aufgrund des Abstands zwischen dem Carbonylsauerstoff des Asp⁵ und dem Amidstickstoff des D⁷Phe⁷ (3.4 Å) und aufgrund des Winkels der Wasserstoffbindung (141°) sowie aufgrund eines nur leicht negativen Temperaturgradienten für D⁷Phe⁷ H^N (-5.92 ppb/K in wässrigem

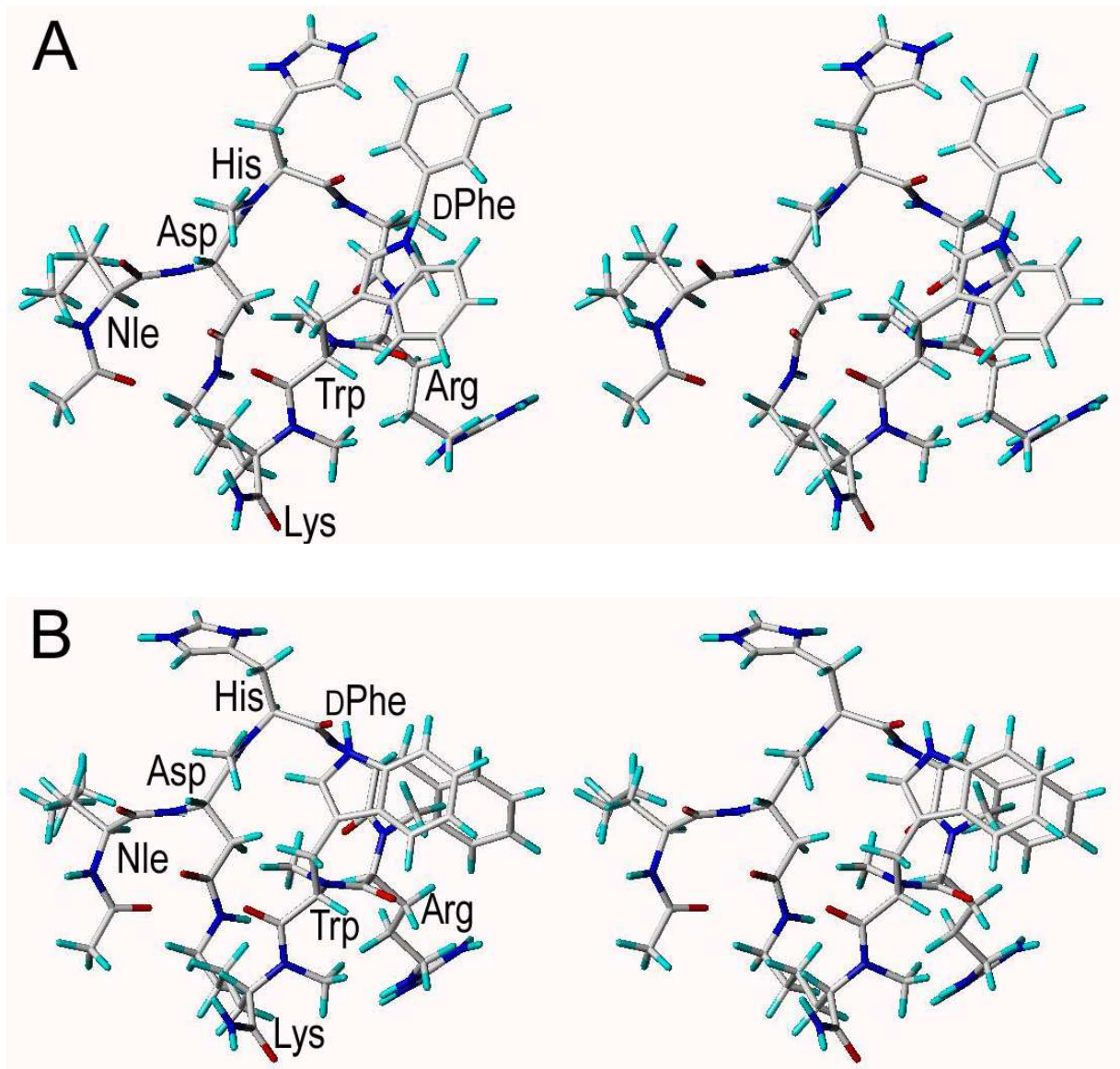


Abbildung 5-19: Stereobilder der durch NMR-Spektroskopie und MD-Berechnungen ermittelten Lösungsstruktur von Peptid **28**. Die backbone-Strukturen der in **A** und **B** abgebildeten Konformere sind identisch, jedoch unterscheiden sie sich durch unterschiedliche Konformation der Seitenketten von NMe-His⁶, DPhe⁷ und NMe-Arg⁸. Dies spiegelt sich in dynamischen Diederwinkeln χ bei den MD-Kalkulationen wieder.^[267]

Puffer; -5.55 ppb/K in DMSO) kann angenommen werden, dass die Wasserstoffbrücke innerhalb dieses γ -turns relativ schwach ist und nur unvollständig vom Solvenz geschützt wird. Der γ -turn liegt nicht nur innerhalb eines β -turns, der vom Asp⁵ zum NMe-Arg⁸ reicht, sondern wird beinahe von einem zweiten β -turn mit annähernder β II'-Geometrie zwischen NMe-His⁶ und NMe-Trp⁹ überlagert. Der Abstand zwischen den beiden C ^{α} -Atomen dieser Aminosäuren beträgt 7.6 Å, während der Abstand zwischen den Asp⁵- und

*N*Me-Arg⁸-C^α-Atomen 6.4 Å beträgt. Das Minimalkriterium für einen β -turn ist ein Abstand von 7 Å von C^α_i zu C^α_{i+3}.^[268] Diese überlappenden *turns* resultieren in einer nahezu vollständigen helikalen Umdrehung (α -turn) die sich vom Asp⁵ zum *N*Me-Trp⁹ erstreckt und die vermutlich durch hydrophobes *clusters* der *N*Me-Trp⁹-Methylgruppe mit Asp⁵-H^β, *N*Me-Arg⁸-H^α, *N*Me-Lys¹⁰-H^γ und der Methylgruppe vom *N*Me-His⁶ stabilisiert wird, was durch die entsprechenden ROESY-Kreuzpeaksignale indiziert wird.

Leichte Veränderungen für einige wenige *backbone*-Diederwinkel ergeben sich in der uneingeschränkten 30-ns-MD-Simulation mit der in der eingeschränkten MD-Simulation erhaltenen gemittelten Struktur als Ausgangsbasis. Am stärksten betroffen sind dabei ψ von Asp⁵, *N*Me-His⁶ und *N*Me-Trp⁹ sowie ϕ von *p*Phe⁷ (siehe Tabelle 5-10). Der γ -turn ist demnach in der Struktur der uneingeschränkten MD-Simulation weniger stark ausgeprägt. Diesen Rückschluss lassen die aus der uneingeschränkten MD-Simulation erhaltenen Diederwinkel für *N*Me-His⁶ ($\phi = -102^\circ$ und $\psi = 117^\circ$) zu. Trotz einiger

Tabelle 5-10: Die Diederwinkel ψ und ϕ der Aminosäurereste aus der gemittelten Struktur der eingeschränkten (eMD) und der Trajektorie der uneingeschränkten (MD) MD-Simulation.

Aminosäure	$\phi_{\text{eMD}} [^\circ]$	$\phi_{\text{MD}} [^\circ]$	$\psi_{\text{eMD}} [^\circ]$	$\psi_{\text{MD}} [^\circ]$
Nle ⁴	-101	-75.5 ± 39.6	109	29.4 ± 82.5
Asp ⁵	71	-89.7 ± 32.7	144	112.7 ± 16.9
<i>N</i> Me-His ⁶	-98	-102.4 ± 15.7	78	117.4 ± 19.2
<i>p</i> Phe ⁷	96	75.0 ± 18.8	-126	-116.0 ± 10.1
<i>N</i> Me-Arg ⁸	-135	-122.9 ± 8.0	80	83.2 ± 9.9
<i>N</i> Me-Trp ⁹	-120	-136.6 ± 14.0	63	96.0 ± 12.7
<i>N</i> Me-Lys ¹⁰	-114	-120.7 ± 9.9	0	83.0 ± 63.4

Distanzverstöße innerhalb der cyclischen Kernstruktur bei der uneingeschränkten MD-Simulation, die vermutlich durch künstlich hervorgerufene Spannungen in den amidverknüpften Seitenketten von Asp⁵ und *N*Me-Lys¹⁰ verursacht werden, scheint das aus der eingeschränkten MD-Simulation erhaltene Konformer das beste Strukturmodell für das Peptidrückgrat zu sein.

Für die verschiedenen Konformationen der Seitenketten von Peptid **28** in wässriger Lösung sind, wie oben bereits erwähnt, hydrophobe Wechselwirkungen von Wichtigkeit. Wie in Strukturanalysen anderer α -MSH-Analoga berichtet wurde, so lässt sich auch bei Peptid **28** *stacking* der NMe-His⁶- und DPh⁷-Seitenketten beobachten (siehe auch Abbildung 5-19 A).^[267] Weiterhin existieren hydrophobe Kontakte zwischen den Seitenketten von DPh⁷ und NMe-Arg⁸ (siehe Abbildung 5-19 B). Außerdem kommt es zum *clustern* zwischen dem Indolring von NMe-Trp⁹ und der *N*-Methylgruppe des NMe-Arg⁸ (siehe Abbildung 5-19 A und B).

Soweit bekannt, wurde das Strukturmerkmal des His⁶-zentrierten inversen γ -turns bei anderen nichtmethylierten aber ähnlichen α -MSH-Analoga, wie beispielweise MT-II, nicht gefunden. In guter Übereinstimmung mit der ermittelten Struktur von Peptid **28** und den oben bereits erwähnten $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\alpha$ -Abständen, wurde von β -turns, welche von Asp⁵ zu Arg⁸ reichen, öfter berichtet als von His⁶ zu Trp⁹ reichende.^[269] Im Gegensatz zu den Ähnlichkeiten, die sich im Auftreten der β -turns widerspiegeln, unterscheidet sich Peptid **28** von MT-II deutlich durch die Orientierung der Seitenketten von NMe-Arg⁸ und NMe-Trp⁹. Bei einer *backbone*-Orientierung, wie sie in Abbildung 5-19 dargestellt ist, zeigt im MT-II die Arg⁸-Seitenkette nach oben und die Seitenkette von Trp⁹ nach unten.^[269] Dies ist bei Peptid **28** genau umgedreht. Das deutet erneut auf die wichtige Rolle der positiv geladenen Arginin-Seitenkette für die Bindung und Aktivierung von hMC3R und hMC4R hin.^[218,262,270] In früheren Untersuchungen mit mutierten und Chimären-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die positiv geladene Guanidinogruppe des Arg⁸ über die Reste Asp¹²² und Asp¹²⁶ der TM3 an hMC3R und hMC4R bindet und sie aktiviert. Neben der Erhöhung der Hydrophobie, werden diese Wechselwirkungen durch die mehrfachen *N*-Methylierungen reduziert, was zu einem Verlust der Bindungs- und Aktivierungsfähigkeit führt.^[262] Dies bedeutet aber gleichzeitig, dass sich die Orientierungen der Seitenketten für die Aktivierung der unterschiedlichen Rezeptorsubtypen stark voneinander unterscheiden. Die Flexibilität von MT-II scheint genügend groß zu sein, um die für die Aktivierung der Rezeptoren erforderlichen Orientierungen der Seitenketten zu adaptieren.^[269,270] Diese Flexibilität ist in Peptid **28** nicht vorhanden und somit wird eine korrekte Wechselwirkung des MT-II-Pharmakophors mit den Bindungstaschen der Rezeptoren hMC3-5R verhindert, was zur Selektivität für den hMC1R führt.

5.9.5. Zusammenfassung und Ausblick

Dank der in letzter Zeit verbesserten Synthesemöglichkeiten für *N*-methylierte Aminosäuren gelingt die Synthese der *N*^α-methylierten MT-II-Derivate. Dies ist auch der Sequenz von MT-II zuzuschreiben, die sich als „*N*-methylierungsfreundlich“ erwiesen hat. Die bekannten Probleme *N*-methylierter Peptide gegenüber sauren Bedingungen machen sich hingegen bei der Synthese der MT-II-Derivate mit exocyclisch *N*-methylierten Amidbindungen bemerkbar: die Synthese der Verbindung mit *N*-methyliertem Aspartat und gleichzeitig *N*-methyliertem Norleucin konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Durch Veränderungen des Syntheseweges gelingt dies aber für die Varianten mit *N*-methyliertem Aspartat oder *N*-methyliertem Norleucin. Biologische Tests wurden mit diesen bisher noch nicht durchgeführt. MT-II-Derivate mit *N*^ε-methyliertem Lysin können mit Hilfe der hier präsentierten Synthese von Fmoc-NMe-Lys(Alloc)-OH ebenso dargestellt werden. Eine Synthese der vollständigen Bibliothek steht aber noch aus.

Die biologischen Tests der *N*-methylierten MT-II-Derivate bestätigen die theoretischen Erwartungen: mit zunehmendem *N*-Methylierungsgrad verlieren die Derivate ihre Bindungsfähigkeit zu einzelnen Rezeptorsubtypen, woraus eine größere Selektivität resultiert. Dadurch ergeben sich zwei Verbindungen (Peptid **24** und Peptid **28**), die selektiv und sehr potent an hMC1R binden und dort agonistisch wirken. Beiden Verbindungen gemein ist ein D-Phenylalanin ohne *N*-Methylgruppe. Eine *N*-Methylierung dieser Aminosäure ergibt konsequent einen Verlust der Bindungsfähigkeit für alle Melanocortinrezeptorsubtypen. Dies gilt auch für die Verbindungen mit *N*^ε-methyliertem Lysin, von denen alle zweifachmethylierten Varianten synthetisiert wurden. Verglichen mit MT-II bindet Peptid **33** aufgrund seiner *N*-methylierten Lysin-*N*^ε-Aminofunktion viel schwächer an den hMC4R bei vergleichbarer Affinität zu den anderen Melanocortinrezeptoren.

Weiterhin wurde die intestinale Wirkstoffabsorption von MT-II und ausgewählten MT-II-Varianten mit unterschiedlichen *N*^α-Methylierungsgraden mit Hilfe des Caco-2-Zelltests überprüft. Alle Verbindungen scheinen parazellulär transportiert zu werden. Die methylierten Verbindungen haben größere Permeabilitätskoeffizienten als MT-II, jedoch sind mehr *N*-Methylgruppen nicht gleichbedeutend mit einem schnelleren Transport durch

die Zellen. Die Position der Methylgruppen in der Sequenz hat einen Einfluß auf die Größe der Permeabilitätskoeffizienten.

Außerdem wurde MT-II, seine lineare Variante und eine Auswahl unterschiedlich stark methylierter MT-II-Derivate in menschlichem Blutserum auf ihre metabolische Stabilität getestet. Während das lineare Peptid bereits nach 5 Minuten nicht mehr zu detektieren ist, sind alle anderen Peptide auch nach 29 Stunden noch nachweisbar. Aufgrund der stark schwankenden Ergebnisse dieses Tests, lassen sich keine genauen quantitativen Aussagen machen.

Die NMR-Konformationsanalyse ergibt eine eindeutige und bevorzugte Struktur für Peptid **28**. Während MT-II durch seine relativ große Flexibilität verschiedene Konformationen annehmen und somit an die Rezeptorsubtypen hMC1R und hMC3-5R binden kann, ist dies bei Peptid **28** aufgrund seiner Rigidität nicht möglich. Es besitzt die Strukturmerkmale eines um das NMe-His⁶ zentrierten γ -turns, welcher von beinahe zwei β -turns überlagert wird. Wie bei MT-II kommt es auch bei Peptid **28** zum *stacking* der Seitenketten des Histidins und des D-Phenylalanins. Deutlich unterschiedlich ist jedoch die Orientierung der Seitenketten des Arginins und des Tryptophans, welche im Peptid **28** gegenüber MT-II viel stärker fixiert ist. Gerade die positiv geladene Argininseitenkette hat eine wichtige Rolle bei Bindung und Aktivierung von hMC3R und hMC4R.

Zusammenfassend betrachtet erweist sich das „Werkzeug“ N-Methylierung erneut als wertvoll bei der Transformation von unselektiven peptidischen Liganden zu selektiven Liganden. Bisher wurden hauptsächlich Monomethylscans routinemäßig durchgeführt. Hier wurde das Konzept zur Darstellung hochgradig N-methylierter Verbindungen weitergeführt. Durch seine Anwendung ergeben sich aus dem hochaffinen aber unselektiven MT-II zwei selektive und sehr affine Agonisten für den hMC1R, dem Rezeptor, der hauptsächlich für die Hautpigmentierung und Immunomodulation verantwortlich ist. Entsprechende Anwendungen v.a. von Peptid **28** sind denkbar und Bestandteil zukünftiger Forschung.

Ob Peptid **28** oder auch Peptid **24** durch die hochgradige N-Methylierung eine bessere Wirksamkeit und Bioverfügbarkeit, evtl. sogar orale Bioverfügbarkeit besitzt, muß noch erforscht werden. Beide besitzen auf jeden Fall eine hohe proteolytische Stabilität.

5 *N*-methylierte MTII-Analoga als Liganden für die Melanocortinrezeptoren

Der Grad der Methylierung läßt sich noch steigern. Die zweifachmethylierten Derivate mit *N*^ε-methylierten Lysin lieferten bereits gute Ergebnisse. MT-II-Derivate mit exocyclischen methylierten Amidstickstoffen sind im Rahmen dieser Arbeit dargestellt aber noch nicht getestet worden. Eine vollständige Bibliothek könnte weitere interessante Verbindungen hervorbringen.

6. *N-Methylierte Cyclopeptide als Liganden für Integrinrezeptoren*

6.1. Integrine

Zellen sind in einem physischen Gerüst, der extrazellulären Matrix (ECM), positioniert, das zugleich als Schnittstelle dient, durch welche die Zellen über kurze Distanzen hinweg miteinander kommunizieren können. Ohne die Möglichkeit der Kommunikation wäre es Zellen unmöglich, ihre Funktionen auszuüben, denn dazu ist es erforderlich, die unmittelbare Umgebung abzutasten und schnell auf deren Veränderungen zu reagieren.^[271] Die Übertragung dieser Informationen zwischen ECM und Zelle erfolgt u.a. über Zelloberflächenrezeptoren. Die größte und vielseitigste Zelloberflächen-Rezeptorfamilie der Zelladhäsion ist die Familie der Integrine. Neben der Übertragung von Informationen, werden über die Integrine adhäsive Kontakte zwischen dem Zytoskelett einer Zelle zu anderen Zellen und zur ECM hergestellt.^[272-274] Um dies und ihre Rolle als integrale Membrankomplexe zu betonen, wurde diesen Zelloberflächenproteinen von TAMKUN und HYNES im Jahre 1986 der Name „Integrine“ gegeben.^[274] Die ersten Vertreter der Integrinfamilie und ihre Beteiligungen bei der Zelladhäsion, der Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation, dem Lenken von Leukozyten und bei der Immunantwort, wurden bereits 1980 entdeckt. Das molekulare Klonen und Sequenzieren führte zu einer Klassifizierung dieser Rezeptoren zusammen mit anderen Adhäsionsrezeptoren, wie dem Plättchen-Fibrinogenrezeptor, den *very-late-antigen*-Rezeptoren (VLAs) und dem *leucocyte-function associated antigen* (LFA) zur Familie der Adhäsionsrezeptoren.^[275] Durch die Identifizierung der starken Beteiligung des ECM-Proteins Fibronectin an der Zelladhäsion, konnte das Arginin-Glycin-Aspartat-Motiv (RGD-Motiv) als eine entscheidende Erkennungssequenz isoliert werden.^[276] Anfänglich ging man beim RGD-Motiv von einem universellen Erkennungsmotiv aus, da es neben dem Fibronectin auch in vielen anderen ECM-Proteinen, wie im Vitronectin, Fibrinogen, Laminin, Osteopontin usw. vorkommt. Inzwischen sind aber zahlreiche andere Erkennungssequenzen in verschiedenen Integrinliganden identifiziert worden.^[272,277] Neben der Klasse der Integrine^[278,279] stellen auch Cadherine,^[280,281] die Immunglobulin-Superfamilie^[282,283] und die

Selectine^[283,284] adhäsive Kontakte her. In mehrzelligen Organismen sind diese adhäsiven Kontakte essentiell für den Erhalt und die Neubildung verschiedener Gewebetypen, sowie bei der Embryogenese, Hämostase, Homöostase, Wundheilung und der Immunantwort.^[285-287] Weiterhin sind sie an vielen pathologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. bei Thrombosen,^[285,288] Arthritis,^[289] Retinopathie,^[290] Osteoporose,^[291,292] akutem Nierenversagen,^[293,294] chronischen Entzündungen^[295,296] und beim Tumorwachstum.^[297,298]

6.2. Einteilung und Struktur der Integrine

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine vom Typ 1. Sie sind aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut, die nichtkovalent miteinander verknüpft sind. Zurzeit sind 18 α - und 8 β -Varianten bekannt. Die Ergebnisse des *Human Genom Projects* (HUGO) sagen jedoch die Existenz sechs weiteren α - und einer weiteren β -Untereinheit voraus.^[299] Durch bestimmte Kombinationen der Untereinheiten (siehe Abbildung 6-1) werden die 24 bis dahin bekannten Integrine gebildet, die man bis jetzt in Säugetieren gefunden hat.^[278,300-302] Die Integrine besitzen lange extrazelluläre (800-1100 Reste) und kurze zytoplasmatische (30-50 Reste) Domänen. Verbunden werden diese durch eine kurze transmembrane Region.^[302]

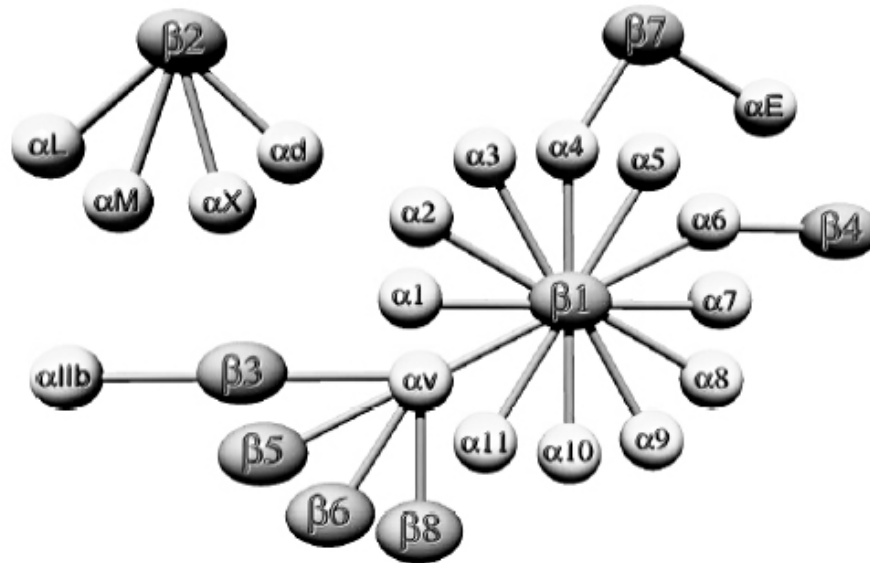


Abbildung 6-1: Diese schematische Übersicht zeigt die bisher bekannten α - und β -Untereinheiten, und deren mögliche Kombinationen zu den bis dato entdeckten Integrintypen.^[278]

6.3. Die Bindung von Liganden durch Integrine

Integrine ohne I-Domäne (z.B. $\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta3$, $\alpha v\beta5$ und $\alpha11b\beta3$) binden Liganden zwischen dem β -Propeller der α -Untereinheit und der β I-Domäne der β -Untereinheit. In Abbildung 6-2 ist Cilengitide gebunden an $\alpha v\beta3$ und Tirofiban gebunden an $\alpha11b\beta3$ dargestellt. Die Guanidiniumgruppe des Arginins im Cilengitide wird durch eine zweizählige Salzbrücke zum (αv)-Asp²¹⁸ am Boden einer recht engen Furche fixiert. Die Furche wird durch die D3-A3- und D4-A4-loops des β -Propellers in der αv -Untereinheit gebildet. Es existiert eine weitere

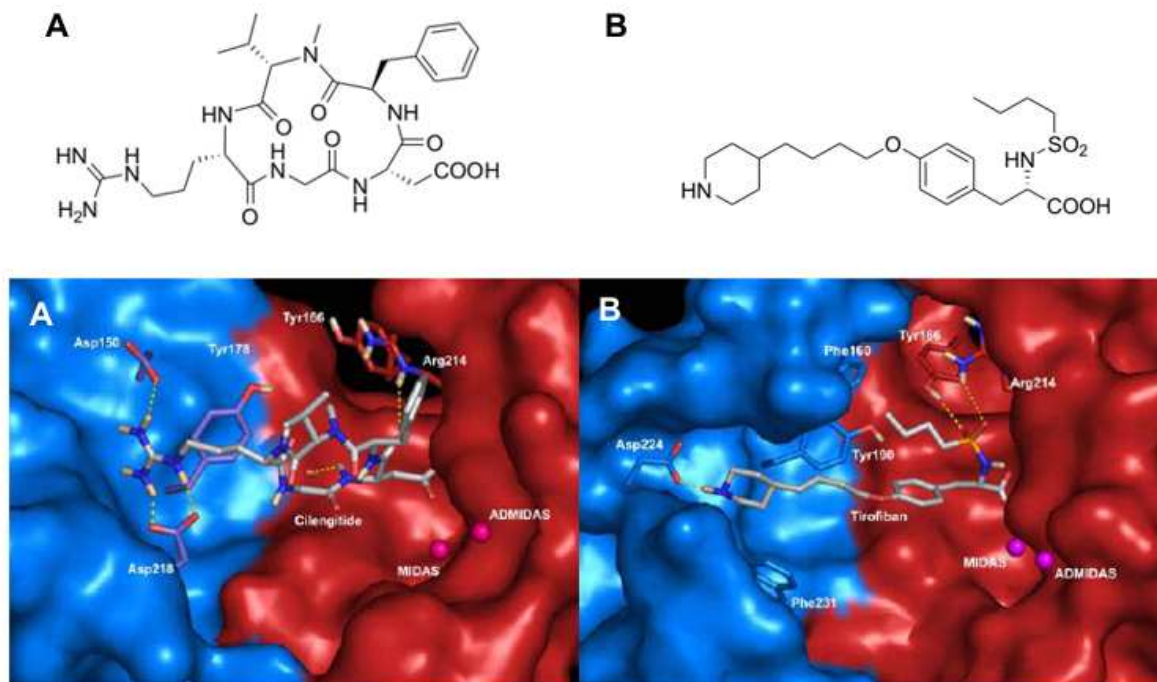


Abbildung 6-2: Vergleich der Ligandenbindung von (A) Cilengitide an das $\alpha v \beta 3$ -Integrin sowie von (B) Tirofiban an das $\alpha II b \beta 3$ -Integrin. Die Bindungsmodi wurden über Kristallstrukturen abgeleitet. Die Conollyoberflächen der α -Untereinheiten sind blau, die der β -Untereinheiten rot, Wasserstoffbrücken gelb und Metallkationen sind als pinke Kugeln dargestellt.^[303]

Salzbrücke der Guadiniumgruppe zum (αv)-Asp¹⁵⁰ am Ende der Furche. Weiterhin wechselwirkt der Ligand über das Carboxylat des Aspartats mit der βI -Domäne. Die A'- $\alpha 1$ - und C'- $\alpha 3$ -loops der βI -Domäne bilden eine Spalte, in die das Carboxylat ragt. Dort koordiniert es ein Mn²⁺-Ion in der MIDAS-Region und ist weiterhin an einer Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat-Amid Proton des ($\beta 3$)-Asn²¹⁵ beteiligt (in Abbildung 6-2 nicht sichtbar). Weitere Wasserstoffbrücken werden mit der Carbonylgruppe des Rückgrats vom ($\beta 3$)-Arg²¹⁶ und der Seitenkette des ($\beta 3$)-Arg²¹⁴ gebildet. Das D-Phe trägt durch schwache π - π -Wechselwirkungen mit dem ($\beta 3$)-Tyr¹²² zur Bindung bei. Das Glycin befindet sich in einem γ -turn, aber wechselwirkt nicht mit dem Rezeptor. Die Bindung des Tirofiban an $\alpha II b \beta 3$ erfolgt auf sehr ähnliche Art und Weise. Die Carboxylfunktion des Tyrosins koordiniert an das Metallion der MIDAS und der Piperidinrest bildet eine Salzbrücke mit ($\alpha II b$)-Asp²²⁴. Dieser Aspartatrest liegt tiefer im Rezeptor, wodurch die Furche im β -Propeller länger ist. Im Vergleich zu einem Liganden für αv , muß ein $\alpha II b$ -Ligand länger sein, um beide Bindungspunkte erreichen zu können. Während der durch zahlreiche SAR-

Studien bestimmte, optimale Abstand vom Arg-C^ζ zum Asp-C^β im Cilengitide ~ 14 Å beträgt,^[304] so ist der optimale Abstand für einen αIIbβ3-Liganden ~ 16 Å. Weiterhin ist die oben erwähnte Furche von αIIb hydrophober als die der αv-Untereinheit. Dies resultiert aus dem Austausch von (αv)-Asp²¹⁸ mit (αIIb)-Phe²³¹. Zusammen mit (αIIb)-Phe¹⁶⁰ und (αIIb)-Tyr¹⁹⁰ entsteht eine bedeutend hydrophobere Umgebung als in αv.

6.4. Integrinliganden

6.4.1. Natürliche Integrinliganden

Die Integrine besitzen, je nach Kombination von α- mit β-Untereinheit, eine bestimmte Ligandenspezifität. Die meisten Integrine haben keine spezifischen Liganden und binden oftmals an mehrere ECM-Proteine (z.B. Osteopontin), Zelloberflächenrezeptoren anderer Zellen oder Plasmaproteine (z.B. Fibrinogen). Somit sind Integrine, die spezifisch mit nur einem Liganden interagieren, die Ausnahme (wie z.B. das α6β4-Integrin an das ECM-Protein Laminin). In Tabelle 6-1 sind die Integrine und ihre natürlichen Liganden angegeben.

Weiterhin gibt es lösliche Integrinliganden. Zu diesen gehören Matrix-Metallproteinasen (MMPs), aber auch Xenogene, wie Bakterien, Viren und die gerinnungshemmenden Disintegrine aus Schlangengiften und dem Speichel von Blutegel und Zecke.^[299] Die Liganden können zum einen mit derselben Erkennungssequenz an verschiedene Integrine binden, jedoch mit unterschiedlicher Affinität. So interagiert z.B. das Vitronectin über die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) mit den Integrinen α8β1, αvβ1, αIIbβ3, αvβ3, αvβ5 und αvβ8. Zum anderen existieren aber auch Liganden, die mit unterschiedlichen Erkennungssequenzen an verschiedene Integrine binden, wie z.B. das Fibrinogen, welches über die Sequenz GPRP mit αβ2-Integrinen interagiert. Mit αIIbβ3 wechselwirkt es jedoch über das RGD-Motiv.^[305]

6 N-Methylierte Cyclopeptide als Liganden für Integrinrezeptoren

Tabelle 6-1: Integrine und ihre natürlichen Liganden. Die grau unterlegten Felder markieren Liganden, deren Wechselwirkungen mit RGD-Peptiden inhibierbar sind.^[271,276,306,307]

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, 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, Neph	$\alpha v\beta 6$	Fn, Fg, Tn
$\alpha 9\beta 1$	Col, Ln, Tn, VCAM-1, Opn	$\alpha v\beta 8$	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	$\alpha E\beta 1$	E-Cadherin

Verwendete Abkürzungen der Integrinliganden und Gegenrezeptoren (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.

Die RGD-Sequenz kommt in knapp der Hälfte aller Matrixproteine vor (in Tabelle 6-1 grau hinterlegt). Sie wurde 1984 von PIERSCHBACHER und RUOSLAHTI als die minimale, essentielle Zelladhäsionssequenz im Fibronectin, und als Bindungsepitop für Integrine entdeckt.^[276] Außerdem wurde die Sequenz in zahlreichen anderen ECM-Proteinen entdeckt. Dazu gehören Vitronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Kollagen, Laminin, Osteopontin, Tenascin, Thrombospondin und xenogene Integrinliganden.

Obwohl die verschiedenen ECM-Proteine die „universelle Erkennungssequenz“ RGD beherbergen, besitzen sie trotzdem eine hohe Selektivität zu den verschiedenen Integrintypen. Dies ist dem Vorhandensein zusätzlicher Erkennungssequenzen zuzuschreiben, welche die Spezifität durch Interaktionen mit anderen Bindungsstellen auf der Integrinoberfläche erhöhen.^[272,275] Eine

weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der ECM-Proteine zu den verschiedenen Integrintypen ist das Vorliegen der RGD-Sequenz in flexiblen *loops*, welche in bevorzugten Konformationen vorliegen und die dadurch die Selektivitäten beeinflussen.^[308]

Die Aminosäuresequenzen, anhand derer Integrine die Liganden erkennen, sind sehr unterschiedlich. Allen gemein ist jedoch das Vorhandensein einer Aminosäure mit einer sauren Seitenkette, wie z.B. Asparaginsäure. So binden die Sequenzen RGD, KQAGD, RTD, LDV und KGD an die meisten Integrine.^[309]

Weiterhin sind die Aminosäuren, die unmittelbar an die Erkennungssequenz anschließen und deren Konformation wichtig für die Integrin-Ligand-Wechselwirkungen, für die Ligandenaffinität und die Ligandenselektivität. Dies haben Untersuchungen mit konformationell eingeschränkten cyclischen Peptiden ergeben.^[7,310,311]

Liganden können die Bildung von Integrinclustern stimulieren. Dadurch werden die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Zelle verstärkt und die Signaltransduktion sowie die mechanischen Eigenschaften zwischen Integrin und intrazellulären Strukturen beeinflusst.^[312] Durch die Clusterbildung kommt es zu einer Umorientierung des Zytoskeletts, wodurch fokale Adhäsionspunkte geschaffen werden und die Zelladhäsion positiv beeinflusst wird.^[312,313]

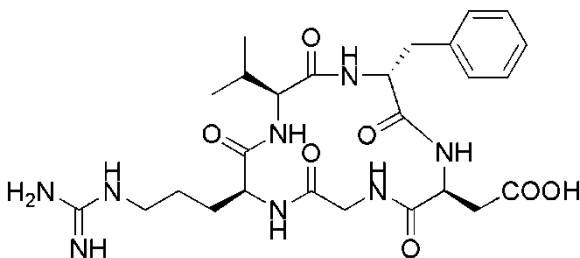
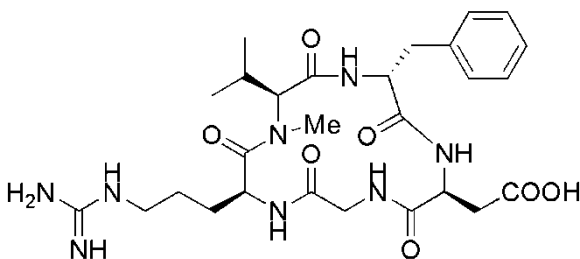
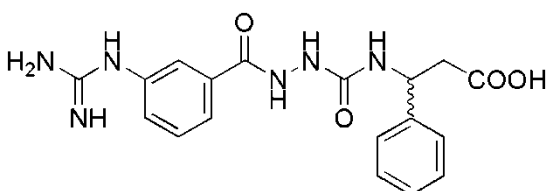
6.4.2. Synthetische Interginliganden

Die $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrine gelten als Indikatoren der Tumormetastasierung und spielen eine große Rolle bei der Tumorangio-genese und sind daher attraktive *targets* für die Krebstherapie. Bei einer Neubewertung der Bedeutung der Integrinrezeptoren wurde die besonders einzigartige Funktion des $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptors bei der Angiogenese entdeckt, wodurch $\alpha 5\beta 1$ in den Fokus der Forschung rückte.^[314] Bis dahin war er hauptsächlich auf die Entwicklung von Liganden für die Rezeptoren $\alpha 11\beta 3$ und $\alpha v\beta 3$ gerichtet. Die Inhibierung des $\alpha 11\beta 3$ -Rezeptors ist ein vielversprechender Weg für die Behandlung von Thrombose, weil dadurch die fibrinogenabhängige Thrombozytenaggregation unterdrückt werden kann. Das Haupt-*target* für die Krebstherapie über den angiogenetischen Weg war bis dato $\alpha v\beta 3$. Die Selektivität ist dabei eine entscheidende Voraussetzung für die therapeutische Anwendbarkeit der Wirkstoffe. Unselektive Integrinantagonisten würden durch Bindung an

6 N-Methylierte Cyclopeptide als Liganden für Integrinrezeptoren

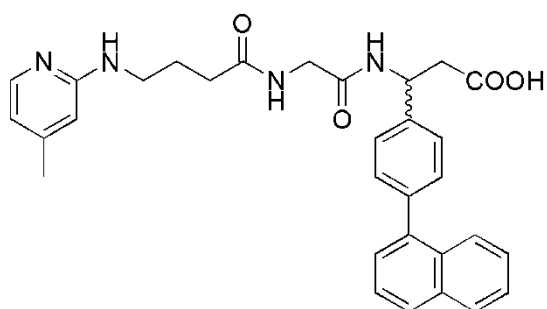
verschiedene Integrinsubtypen zu unerwünschten Nebenwirkungen führen. Das Abfangen durch andere Zellen und deren Integrine wäre einer guten Gewebeverteilung des Wirkstoffs abträglich. Durch Kristallstrukturen und Homologiemodelle für verschiedene Integrinsubtypen, wurde die Entwicklung hochaffiner und selektiver Liganden beschleunigt.

Tabelle 6-2: Strukturen und Selektivitäten ausgewählter Integrinliganden.^[315]

Nr.	Struktur/Verbindung	IC ₅₀ [nM]	Ref.
1	Vitronectin	$\alpha v\beta 3$: 25 $\alpha v\beta 5$: - $\alpha IIb\beta 3$: >900	[316]
2	c(RGDfV) 	$\alpha v\beta 3$: 2.5 $\alpha v\beta 5$: - $\alpha IIb\beta 3$: 1700	[302]
3	Cilengitide 	$\alpha v\beta 3$: 0.5 $\alpha v\beta 5$: 70 $\alpha IIb\beta 3$: 860	[38]
4		$\alpha v\beta 3$: 2.6 $\alpha v\beta 5$: 280 $\alpha IIb\beta 3$: 8300	[317]

6 N-Methylierte Cyclopeptide als Liganden für Integrinrezeptoren

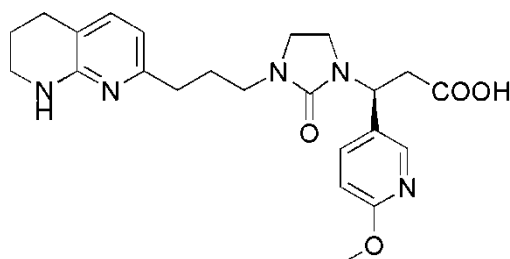
5



$\alpha\nu\beta 3$: 8
 $\alpha\nu\beta 5$: 5170
 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 4230

[318]

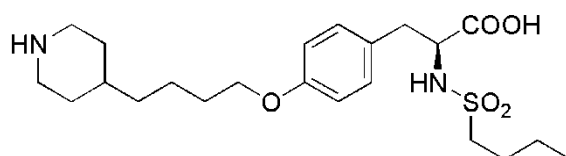
6



$\alpha\nu\beta 3$: 0.1
 $\alpha\nu\beta 5$: 10
 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: 35000

[319]

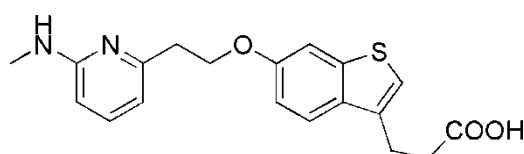
7 Tirofiban



$\alpha\text{IIb}\beta 3$: 36

[320]

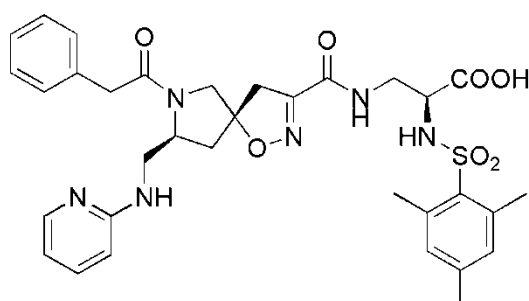
8



$\alpha\nu\beta 3$: 30
 $\alpha\nu\beta 5$: 140
 $\alpha 5\beta 1$: 7800
 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: > 20000

[316]

9 SJ749



$\alpha\nu\beta 3$: 49
 $\alpha 5\beta 1$: 0.2
 $\alpha\text{IIb}\beta 3$: > 100000

[321]

In Tabelle 6-2 sind einige potentielle und teilweise selektive synthetische Liganden abgebildet. Es lassen sich *ad-hoc* Gemeinsamkeiten in den Strukturen

der Liganden erkennen: die Guanidylfunktion der Argininseitenkette der RGD-Sequenz wird durch einen basischen Rest, und die Aspartatseitenkette durch eine Carboxylatfunktion imitiert. Beide Gruppen sind durch ein mehr oder weniger starres Gerüst miteinander verbunden, welches ihnen die richtige, für die Bindung nötige räumliche Orientierung verleiht. In vielen Beispielen aus Tabelle 6-2 findet man in der Nähe der Carboxylatfunktion aromatische Reste. Diese verbessern die Bindungseigenschaften der Liganden über π - π -Wechselwirkungen.

6.4.2.1. Das Peptid *cyclo*(RGDFV)

Wie in Kapitel 2 bereits erwähnt wurde, besitzen lineare Peptide ein flexibles Rückgrat, wodurch sie sehr viele verschiedene Konformationen einnehmen können. Dass die Konformationen der RGD-Sequenz und nicht zusätzliche Bindungssequenzen für die hohe Selektivität der Liganden zu verschiedenen Integrinsubtypen verantwortlich ist, konnte von der Arbeitsgruppe um H. KESSLER schon vor längerer Zeit durch die Entwicklung niedermolekularer, hochaktiver und $\alpha\beta$ 3-selektiver Integrinantagonisten bewiesen werden. Dazu wurde die RGD-Sequenz in cyclische Penta- und Hexapeptide eingebaut.^[6] Neben der Cyclisierung wird durch die Verwendung von D-Aminosäuren eine weitere Fixierung des Peptidrückgrats erreicht. Die D-Aminosäuren haben eine strukturinduzierende Wirkung, die darauf beruht, dass sie vornehmlich die (i+1)-Positionen von β II'- und γ -turns einnehmen.^[6,322] NMR-spektroskopische Untersuchungen des *cyclo*(RGDFV) ergaben für D-Phenylalanin und L-Valin die zentralen Positionen (i+1 und i+2) eines β II'-turns und für Glycin die i+1-Position eines γ -turns (siehe Abbildung 6-3).^[323] Durch diese Vorzugskonformation wird eine räumliche Anordnung der Seitenketten des Arginins und des Aspartats erreicht, die eine optimale Wechselwirkung mit dem $\alpha\beta$ 3-Integrin gewährleistet. Weiterhin zeigte sich, dass Valin nicht an diesen Wechselwirkungen beteiligt ist und somit durch andere Aminosäuren ersetzt werden kann.^[324]

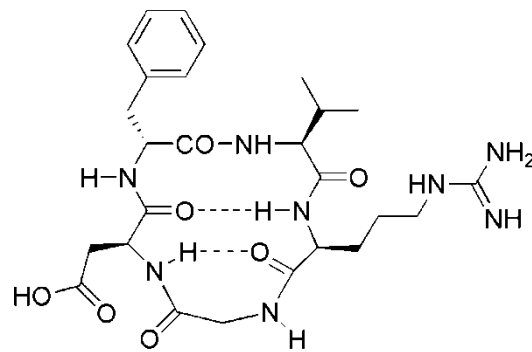


Abbildung 6-3: Das Peptid *cyclo*(RGDfV).

Über die funktionellen Gruppen der Seitenketten dieser Aminosäuren ist die Verknüpfung mit funktionalen Molekülen unter Erhalt der biologischen Aktivität möglich. Dadurch gelingt z.B. die Immobilisierung auf Oberflächen^[325] oder die Radiomarkierung^[326] für bildgebende Verfahren in der Tumordiagnostik.

6.4.2.2. Das Peptid *cyclo*(RGDf-N(Me)V-)

Aus inzwischen logischer Konsequenz wurde in weiteren Untersuchungen der Einfluss der Amidprotonen auf die Aktivität und Selektivität von *cyclo*(RGDfV) analysiert.^[38] Die Sequenz wurde dafür einem *N*-Methyl-*scan* unterworfen. Die dabei erhaltenen Peptide sind in

Tabelle 6-3 aufgelistet. Bei diesem *scan* hat sich das Peptid *cyclo*(RGDf-N(Me)V-) als $\alpha\beta 3$ -selektiver und im subnanomolarem Bereich aktiver Integrinligand ergeben (siehe Abbildung 6-4). Verglichen mit *cyclo*(RGDfV) ist er etwa viermal aktiver gegenüber $\alpha\beta 3$. Im Bezug auf $\alpha 11\beta 3$ ist seine Aktivität doppelt so hoch. Insgesamt steigt die $\alpha\beta 3$ -Selektivität. Alle anderen *N*-methylierten Cyclopeptide dieser Reihe zeigen eine geringere Aktivität gegenüber beiden Rezeptoren als *cyclo*(RGDfV).

Bei einem Vergleich der Strukturen von *cyclo*(RGDfV) mit *cyclo*(RGDf-N(Me)V-) (siehe Abbildung 6-5) wird deutlich, dass durch die Substitution des

Tabelle 6-3: Die durch Dechantsreiter et al. dargestellten und untersuchten Peptide. Q ist die normalisierte Aktivität mit $Q = IC_{50}[\text{Peptid}]/IC_{50}[\text{GRGDSPK}]$, um Ergebnisse innerhalb des Essays besser vergleichen zu können.^[38]

Peptid	$\alpha v\beta 3$		$\alpha IIb\beta 3$	
	IC_{50} [μm]	Q	IC_{50} [μm]	Q
GRGDSPK	0.21	1.0	1.7	1.0
c (RGDfV)	0.0025	0.012	1.7	1.0
c (-N(Me)R-GDfV)	0.0055	0.026	5.2	3.1
c (R-N(Me)G-DfV)	0.045	0.21	>10	>5.9
c (RG-N(Me)D-fV)	0.56	2.7	>10	>5.9
c (RGD-N(Me)f-V)	1.4	6.7	>10	>5.9
c (RGDf-N(Me)V-)	0.00058	0.0028	0.86	0.51

Amidprotonen durch die Methylgruppe die gesamte Struktur des Peptids beeinflusst wird. Damit geht auch eine Veränderung der Orientierung der pharmakophoren Gruppen einher.^[38] Anstatt mit einem $\beta II'$ - und einem γ -turn, lässt sich die Struktur nun durch zwei γ_i -turns mit Arginin und Asparaginsäure in den Positionen $i+1$, und durch einen γ -turn mit Glycin in der Position $i+1$ beschreiben. Die N-Methylgruppe des Valins blockiert die Wasserstoffbrücke zwischen dem Arginin und dem Aspartat, und durch sterische Abstoßung werden die Ebenen der Amidbindungen zwischen Aspartat und D-Phenylalanin zum Einen, und zwischen Valin und Arginin zum Anderen, in eine zur Ringebene senkrechtere Position gebracht.

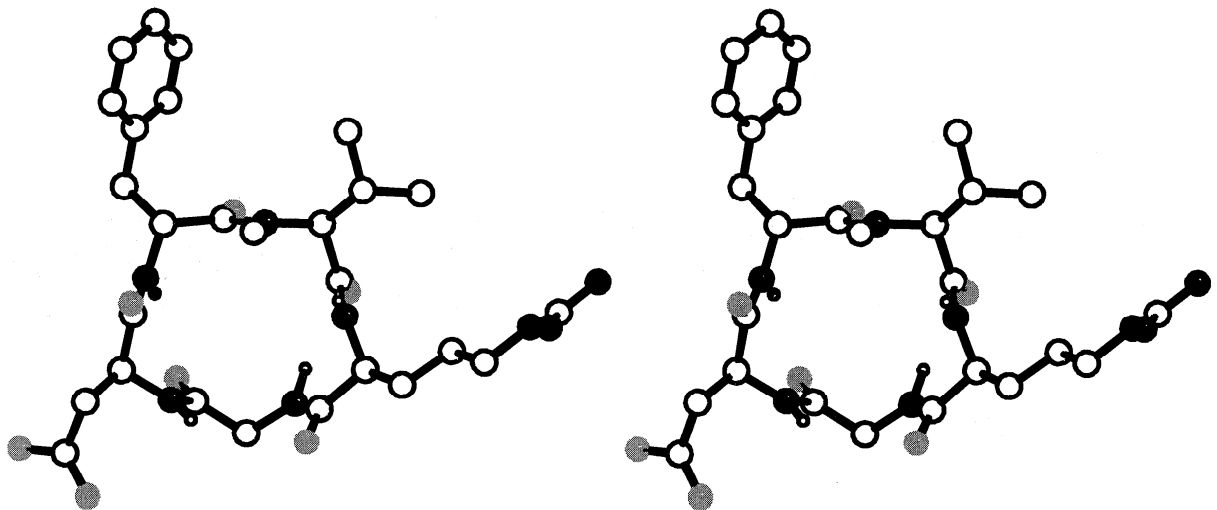


Abbildung 6-4: Stereobild von cyclo(RGDf-NMeV-) aus einer 100-ps restrained MD-Simulation.^[38]

Durch Allyl- und Vinylspannung geraten die Seitenketten von Aspartat und Arginin stärker in eine pseudo-äquatoriale Position, während sie bei c (RGDfV) eher pseudo-axial stehen.^[273] Eine weitere strukturelle Veränderung ist die Aufweitung des Knicks der RGD-Sequenz. Ursprünglich wurde angenommen, dass ein starker Knick essentiell für die $\alpha\beta_3$ -Selektivität der Antagonisten sei, da er sie von den eher linearen RGD-Strukturen der $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -selektiven Antagonisten unterscheidet.^[38,327] Jedoch scheint eine etwas weniger stark geknickte Form der $\alpha\beta_3$ -Selektivität entgegenzukommen.

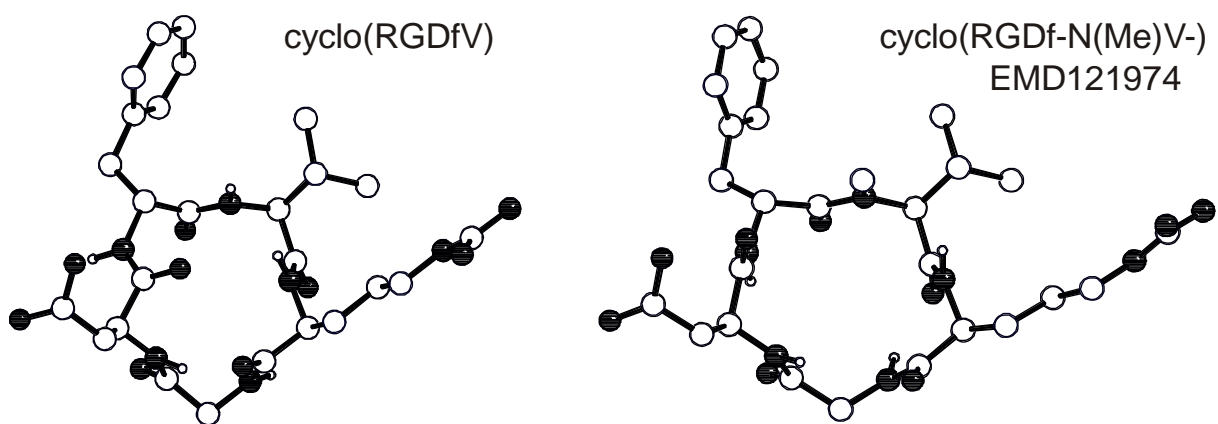


Abbildung 6-5: Ein Vergleich der Strukturen von cyclo(RGDfV) mit cyclo(-RGDf-N(Me)V-).

XIONG *et al.* haben kürzlich eine Kristallstruktur dieser Verbindung im Komplex mit dem $\alpha\beta3$ -Integrin veröffentlicht.^[328] Anhand dieser Struktur wird die Bindung der synthetischen Liganden an den Rezeptor deutlich. Die Guanidiniumgruppe des Arginins bindet über Wasserstoffbrücken an das Asp¹⁵⁰ und an das Asp²¹⁸ der α -Untereinheit (*side-on*-Koordination), wohingegen die Carboxylgruppe des Aspartats an ein zweiwertiges Metallion aus der MIDAS-Region der β -Untereinheit und an das Amin-Proton des Asn²¹⁵ koordiniert.^[328] Da die Bindungstasche für RGD-Liganden relativ flach ist, bleibt gerade genügend Platz für hydrophobe Wechselwirkungen der Methylengruppe des Glycins mit der Oberfläche des Rezeptors. Wie bereits erwähnt, interagiert Valin nicht.

6.5. Synthese zwei- und dreifach *N*-methylierter Derivate des Peptids c(RGDfV)

6.5.1. Syntheseziel

Die *synthetisierten* MT-II-Derivate aus Kapitel 5 liefern weitere Beispiele für hochgradig *N*-methylierte Cyclopeptide, die aktiv und selektiv sind, sowie verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften besitzen. Dieses Konzept fortsetzend, sollte die mehrfache *N*-Methylierung auch am Beispiel von c(RGDfV) durchgeführt werden. Der monomethyl-*Scan* am Cyclopentapeptid c(RGDfV) lieferte bereits 1992 c(RGDf-NMeV-), einen der aktivsten und selektivsten Antagonisten für $\alpha\beta_3$.^[6] Die Synthese der drei-, vier- und fünffach *N*-methylierten c(RGDfV)-Derivate wurde schon im Jahre 2004 versucht. Jedoch ergaben sich sowohl bei der Synthese der linearen Peptide, der Cyclisierung, bei der Entschützung der Seitenketten als auch bei der Reinigung mittels HPLC Probleme, die eine erfolgreiche Darstellung verhinderte.^[329] Daher lag bei den hier getätigten Synthesen der Fokus auf den zweifach und dreifach methylierten Verbindungen.

6.5.2. Synthesestrategie

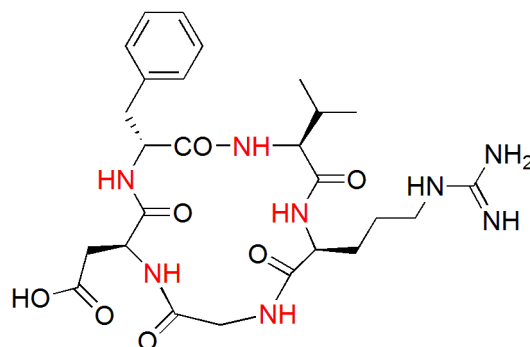


Abbildung 6-6: c(RGDfV) (Amidstickstoffatome rot markiert).

Für die *N*-Methylierung der Aminosäuren von c(RGDfV) stehen natürlich dieselben Methoden zur Verfügung, wie für die *N*-methylierten MT-II-Derivate

(siehe Abschnitt 3.3). Dabei bietet sich für die Methylierung von Valin und D-Phenylalanin die FREIDINGER-Methode an.^[67] Fmoc-NMe-Gly-OH (Fmoc-Sarcosin) ist relativ günstig kommerziell erhältlich. Für die zwei verbleibenden Aminosäuren Asparaginsäure und Arginin kommt die FREIDINGER-Methode nicht in Frage. Hierfür eignen sich die anderen in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 genannten Methoden besser. In diesem Fall soll die von BIRON *et al.* verbesserte Festphasenmethode nach MILLER und SCANLAN verwendet werden.^[78]

Für diese beiden Aminosäuren ist außerdem die Wahl geeigneter permanenter Seitenkettenschutzgruppen nötig. Trotz der bekannten Labilität von N-methylierten Peptiden bei sauren Bedingungen (TFA),^[256,330] sollen zunächst Fmoc-Asp(OtBu)-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH für die Synthese eingesetzt werden. Bei der ursprünglichen Synthese von Cilengitide fanden ebenfalls säurelabile Schutzgruppen (tBu und Mtr) erfolgreich Anwendung.^[38]

Die Festphasensynthese der linearen Peptidsequenz kann prinzipiell mit jeder Aminosäure aus der Sequenz R-G-D-f-V beginnen. Um die Cyclisierung zu vereinfachen ist es jedoch vorteilhaft, gewisse Punkte zu beachten. Ein Start mit Glycin ist zu bevorzugen, da hierdurch beim Cyclisierungsschritt Racemisierung vermieden wird. Außerdem wird durch die Bildung von stabilisierenden Wasserstoffbrücken die Cyclisierung erleichtert. Letzteres gilt auch für einen Start mit Valin. Weiterhin ist zu beachten, dass die Sequenz so aufgebaut wird, dass der N-Terminus nicht N-methyliert vorliegt, da hierdurch die Cyclisierungsreaktion sterisch stark erschwert wird. Bei allen Sequenzen, in denen dieser Fall auftritt, muß der Sequenzaufbau entsprechend mit anderen Aminosäuren begonnen werden.

6.5.3. Ergebnisse und Diskussion

6.5.3.1. Die Synthese der Cyclopeptide

Anmerkung: Teile der hier vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Carlos Mas-Moruno in unserer Gruppe erzielt.

Die Synthese der N-methylierten c(RGDfV)-Derivate erwies sich als schwierig. Bereits beim Aufbau der linearen Sequenzen kam es immer wieder zu

Problemen durch auftretende Nebenreaktionen. Am häufigsten war dabei die Bildung von Diketopiperazinen (DKP).

Besonders Dipeptide, die *N*-Methylaminosäuren enthalten, haben eine große Tendenz zur Bildung von DKPs.^[331] Die Anfälligkeit zum Entstehen dieser cyclischen Dipeptide wird dabei durch die Struktur der enthaltenen Aminosäuren bestimmt. Aminosäuren, welche in einer Amidbindung leicht eine *cis*-Konfiguration einnehmen, wie beispielsweise *N*-Alkylaminosäuren, begünstigen die Cyclisierungsreaktion, die zur Bildung von DKPs führt.^[256,332] Die Reaktion kann sowohl im basischen als auch im sauren Mileu stattfinden.^[333,334] Dabei wird die C-terminale Carbonylfunktion

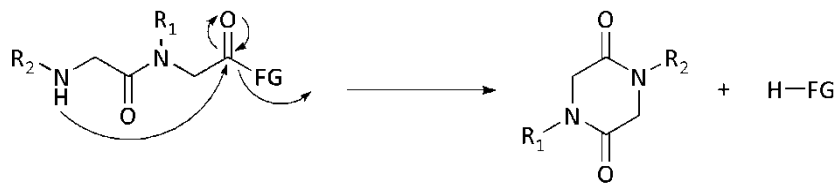


Abbildung 6-7: Die Cyclisierung eines Dipeptids durch einen nukleophilen Additions-Eliminierungsmechanismus zu einem Diketopiperazin (DKP). (FG = Fluchtgruppe)

durch die N-terminale Aminofunktion angegriffen und dabei eine Fluchtgruppe freigesetzt (siehe Abbildung 6-7). Folglich ist die DKP-Bildung von der Nukleophilie der angreifenden Aminogruppe und der Qualität der Fluchtgruppe abhängig. Nach neuesten Ergebnissen scheint aber v.a. die Qualität der Fluchtgruppe die DKP-Bildung maßgeblich zu beeinflussen.^[335]

Für die Synthese der Peptide **41**, **44** und **48** (siehe Tabelle 6-4) wurde in einem ersten Versuch die Synthese mit Fmoc-Sarcosin begonnen. Nach dem Abspalten der linearen Peptide konnte in keinem Fall das gewünschte Produkt erhalten werden. Auch nach dem Kuppeln der zweiten Aminosäure Fmoc-Arginin, konnte bei Testabspaltungen mittels ESI-MS überhaupt kein Produkt nachgewiesen werden, was für die Bildung von DKPs spricht. Durch die Wahl von *N*Me-Val für die Peptide **41** und **44**, sowie *D*Phe im Falle von Peptid **48**, konnten die oben genannten Probleme bei der Synthese dieser Verbindungen vermieden werden. Bei anderen Derivaten gelang eine erfolgreiche Synthese trotz des Starts mit *N*-methylierten Aminosäuren. Da es sich hierbei aber um Valin und Arginin handelt (siehe Tabelle 6-4), ist anzunehmen, dass hier die

Tabelle 6-4: In dieser Tabelle sind die zweifach methylierten Derivate des Cyclopeptids *c(RGDfV)* sowie die Sequenzen ihrer erfolgreichen Synthese schematisch aufgelistet. In zwei Fällen führte ein alternativer Sequenzaufbau ebenfalls zum fertigen, zweifach-N-methylierten Cyclopeptid. Grau unterlegte Felder = N-methylierte Aminosäuren.

Nummer	Peptidsequenz	erfolgreicher Aufbau	alternativer erfolgreicher Aufbau
39	R G D f V	R G D f V	D f V R G
40	R G D f V	R G D f V	G D f V R
41	R G D f V	R G D f V	
42	R G D f V	D f V R G	
43	R G D f V	R G D f V	
44	R G D f V	R G D f V	
45	R G D f V	D f V R G	
46	R G D f V	R G D f V	
47	R G D f V	G D f V R	
48	R G D f V	V R G D f	
49	R G D f V	R G D f V	

Bildung von DKPs durch die sterisch viel anspruchsvolleren Seitenketten weitgehend verhindert wird. Dadurch sollte auch die Tetraederübergangsstufe beim nukleophilen Angriff der Aminogruppe stärker benachteiligt sein.

Weiterhin stellten sich die Kupplungsreaktionen von N-methylierten Aminosäuren an N-methylierte Aminosäuren als problematisch heraus. Für eine vollständige Konversion waren oftmals Mehrfachkupplungen nötig. Im Falle von Peptid **42**, bei dem eine Kupplung von NMe-Val an NMe-Arg nötig ist, mußte dreimal mit HATU und HOBT als Kupplungsreagenzien nachgekuppelt werden.

Die Cyclisierungen der C-terminal Glycin enthaltenden linearen Peptide **39**, **42** und **45** verliefen problemlos mit DPPA als Cyclisierungsreagenz, ganz im Gegensatz zu den Peptiden **40**, **41** und **43**. Diese drei Peptide besitzen N-Methyl-Valin bzw. Valin als C-terminale Aminosäure. Dort ließ sich bei der Cyclisierung mit DPPA eine Nebenreaktion beobachten, die zu einem Neben-, teilweise sogar zu einem Hauptprodukt führte, welches in den ESI-MS-Spektren eine Produktmasse $m+15$ vorweist. Für Peptid **41** konnte trotz des

Nebenprodukts cyclisiertes Endprodukt isoliert werden. Für die beiden anderen Peptide **40** und **43** mußten HATU und HOBt als Cyclisierungsreagenzien verwendet werden. Damit konnten die entsprechenden Endprodukte problemlos und ohne Nebenreaktion isoliert werden. Interessanterweise konnten die Peptide **44** und **46**, obwohl sie Valin als C-terminale Aminosäure enthielten, aber auch die Peptide **47** und **48**, mit *N*-Methylarginin und *D*-Phenylalanin im C-Terminus, ohne Probleme mit DPPA cyclisiert werden. Anscheinend ist die beobachtete Nebenreaktion sequenzabhängig. Dabei scheint nicht nur die C-terminale Aminosäure ausschlaggebend zu sein, sondern auch das *N*-Methylierungsmuster.

Nicht unproblematisch war die anschließende Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen der cyclisierten Peptide. Im Allgemeinen war eine Reaktion für drei Stunden mit einer Mischung aus TFA/H₂O/TIPS/DCM (60:2.5:2.5:35 v/v/v/v) erfolgreich. Die Peptide **40**, **43** und **48** wurden unter diesen Bedingungen fragmentiert, so dass die linearen Derivate erhalten wurden. Für diese Fälle wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Für die Verbindungen **40** und **43** wurde eine Abspaltnischung verwendet, in welcher der TFA-Anteil auf Kosten des DCM-Anteils auf 47.5 % verringert wurde. Die Reaktionszeit wurde auf 2 h gesenkt. Durch den geringeren TFA-Anteil konnte die Fragmentierung zu den linearen Peptiden reduziert werden. Aber auch die Abspaltung der Pbf-Schutzgruppe erfolgt langsamer unter diesen Bedingungen, wodurch man weitere Ausbeuteverluste durch nicht vollständig entschütztes Produkt in Kauf nehmen muß. Bei Peptid **48** wurde das ursprüngliche Mischungsverhältnis der Abspatlösung verwendet. Hier wurde aber die Reaktionszeit deutlich auf 35 min. gesenkt. Aufgrund der kürzeren Reaktionszeit resultiert diese Strategie ebenso in weniger Fragmentierung, aber auch in Ausbeuteverlusten durch die weniger vollständig abgespaltene Pbf-Schutzgruppe.

Alle bis auf eines der dreifachmethylierten *c*(RGDFV)-Derivate scheiterten an der Synthese der linearen Peptide und/oder der anschließenden Cyclisierung. Es konnte nur ein dreifach methyliertes Derivat erfolgreich synthetisiert werden (Peptid **49**). Dies wiederum konnte ohne weiteres mit DPPA cyclisiert werden. Auch in der anschließenden Abspaltung der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen erwies es sich als relativ stabil. Es konnte mit der 60 %-igen TFA-Abspatlösung innerhalb von 30 min. ein Großteil des geschützten Cyclopeptids von der Pbf-Schutzgruppe befreit werden.

6.5.3.2. Die Ergebnisse der biologischen Tests

Die Ergebnisse der biologischen Tests sind in Tabelle 6-5 zusammengefaßt. Unter den zweifach methylierten Derivaten existieren sechs Derivate mit verbesserter Selektivität im Vergleich zu Cilengitide (Peptide **39-41, 43, 47, 48**). Alle diese Verbindungen binden an $\alpha\beta3$, wenn auch mit schlechteren IC_{50} -Werten, aber dennoch im unteren nanomolaren Bereich, abgesehen von **48**. Außer bei Peptid **41**, steigen bei allen anderen dieser Derivate die Selektivitäten für $\alpha\beta3$ gegenüber $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$. Die Affinitäten für $\alpha11\beta3$ erwiesen sich in den meisten Fällen als sehr gering bzw. als nicht vorhanden. Sie wurden daher nicht durchgängig bestimmt. Die $\alpha\beta3$ -selektivsten Verbindungen mit den höchsten Affinitäten für $\alpha\beta3$

6 N-Methylierte Cyclopeptide als Liganden für Integrinrezeptoren

Tabelle 6-5: Ergebnisse der Zellassays aller möglichen zweifach- und eines dreifach methylierten c(RGDfV)-Derivates (n.b. = nicht bestimmt; k.a. = keine Angabe, N-methylierte Aminosäuren sind grau hinterlegt)

#	Sequenz	IC ₅₀ [nM]				Selektivität		
		αvβ3	αvβ5	α5β1	αIIbβ3	αvβ5/αvβ3	α5β1/αvβ3	αIIbβ3/αvβ3
Cilengitide	c(RGDfV)	0.65 (± 0.07)	16.8 (± 2.8)	13.2 (± 0.9)	574 (± 0.9)	26	20	883
39	c(RGDfV)	36.2 (± 16.9)	29472 (± 6462)	2929 (± 367)	n.b.	814	81	k.A.
40	c(RGDfV)	5.9 (± 5.9)	4882 (± 1168)	270 (± 161)	> 1000	827	46	k.A.
41	c(RGDfV)	13.2 (± 3.4)	92.8 (± 20)	1358 (± 341)	> 1000	7	103	k.A.
42	c(RGDfV)	1.9 (± 0.5)	58.6 (± 13.5)	39.5 (± 2.0)	> 1000	31	21	k.A.
43	c(RGDfV)	173 (± 25)	>50,000	6653 (± 6335)	n.b.	> 250	38	k.A.
44	c(RGDfV)	>10,000	>10,000	>10,000	> 2000	k.A.	k.A.	k.A.
45	c(RGDfV)	>10,000	>10,000	>10,000	> 10,000	k.A.	k.A.	k.A.
46	c(RGDfV)	937 (± 173)	13217 (± 1617)	1164 (± 1174)	n.b.	14	1.2	k.A.
47	c(RGDfV)	138 (± 71)	21297 (± 4623)	3843 (± 1127)	n.b.	154	28	k.A.
48	c(RGDfV)	1620 (± 283)	>100,000	>200,000	> 1000	> 200	150	k.A.
49 ^{a)}	c(RGDfV)	120		>20000	183000	k.A.	>167	1525

^{a)} Die Verbindung wurde von der Firma Jerini AG, Berlin getestet.

sind die Peptide **40** und **39**. Die unselektivsten Derivate sind die Peptide **42** und **46**. Ersteres bindet nur unwesentlich schlechter an die Integrinsubtypen als Cilengitide. Die bisher noch nicht erwähnten Verbindungen (Peptide **44** und **45**) zeigen nur eine geringe Affinität für alle getesteten Integrine.

Das einzige dreifachmethylierte Derivat Peptid **49** wurde nicht auf $\alpha\beta 5$ getestet. Gegenüber $\alpha 5\beta 1$ ist es 167-fach selektiv bei einer 184-fach schwächeren Bindung an $\alpha\beta 3$ als Cilengitide. Zum Vergleich wurden die ursprünglich publizierten IC_{50} -Werte der monomethylierten Derivate in Tabelle 6-6 dargestellt.

Tabelle 6-6: Ergebnisse der biologischen Assays der monomethylierten Derivate, wie sie ursprünglich publiziert wurden.^[38]

#	Sequenz	IC_{50} [nM]	
		$\alpha\beta 3$	$\alpha II\beta 3$
A1	c(RGDfV)	2.5	1700
A2	c(RGDfV)	5.5	5200
A3	c(RGDfV)	45	>10000
A4	c(RGDfV)	560	>10000
A5	c(RGDfV)	1400	>10000
A6	c(RGDfV)	0.58	860

Weitere Tests wurden mit den hier dargestellten Verbindungen noch nicht durchgeführt. Interessant wäre beispielsweise eine Konformationsanalyse von Peptid **42**, welches ähnliche Bindungseigenschaften besitzt wie Cilengitide. Besitzt es auch eine ähnliche Konformation oder unterscheiden sie sich? Falls sie sich unterscheiden, bindet Peptid **42** auf eine unterschiedliche Art und Weise an die Rezeptoren? Welchen Einfluß hat die zusätzliche Methylgruppe auf die Bioverfügbarkeit von Peptid **42**? Dies sind Fragen, die in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden müssen.

6.5.4. Zusammenfassung

Im Gegensatz zur „N-methylierungsfreundlichen“ Sequenz von MT-II (siehe Abschnitt 5.9.5), ergeben sich bei der Darstellung der methylierten

cyclo(RGDFV)-Derivate Probleme, die teilweise schon bei der Synthese der linearen Peptide beginnen, und sich bei der Cyclisierung und der anschließenden Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen fortsetzen. Häufigstes Problem bei der Synthese der linearen Peptide war die Bildung von Diketopiperazinen. Durch die Wahl von C-terminalen Aminosäuren mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten, konnte dieses Problem umgangen werden. Weiterhin verliefen einige Kupplungsreaktion von *N*-methylierten Aminosäuren an *N*-methylierte Aminosäuren mit schlechten Ausbeuten, sodass diese bis zur vollständigen Umsetzung mehrfach wiederholt werden mußten.

Die Cyclisierungen von Derivaten mit sperrigen Seitenketten enthaltenden C-terminalen Aminosäuren führten oftmals zu Nebenreaktionen, die zu Nebenprodukten führten, welche teilweise durch die anschließende Reinigung mittels HPLC abgetrennt werden konnten. In einigen Fällen war deren Anteil sehr groß. Durch die Verwendung von HATU und HOBt bei der Cyclisierung konnten die Nebenreaktionen verhindert werden.

Bei der Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen zeigte sich die bekannte Labilität von *N*-methylierten Peptiden gegenüber sauren Bedingungen. Durch die Reduzierung der Reaktionszeit und des TFA-Anteils in der Abspaltlösung, konnte das Ausmaß der Fragmentierung der Cyclopeptide unter Ausbeuteverlusten durch nicht vollständig abgespaltene Seitenkettenschutzgruppen verringert werden.

All diese Probleme treten bei der Synthese der dreifach methylierten Derivate in einem viel größeren Umfang auf als bei den zweifach methylierten, wodurch bisher nur eine dreifach methylierte Verbindung mit den hier vorgestellten Methoden synthetisiert werden konnte.

Die Ergebnisse der biologischen Tests deuten auf sechs Verbindungen mit verbesserter Selektivität für $\alpha\beta3$ gegenüber $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$, wobei $\alpha\beta3$ schwächer gebunden wird als von Cilengitide. Ein zweifach methyliertes Peptid bindet jedoch mit ähnlichen IC_{50} -Werten an die getesteten Integrine.

7. Experimentalteil

7.1. Material und Methoden

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert. NMP wurde von der Firma *BASF* 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.

Das für die Festphasensynthese verwendete Tritylchlorid-Polystyrol-Harz wurde von *PepChem* (Tübingen), Rink-Amid-Harze von *NovaBiochem*, der *Iris Biotech GmbH* und Wang-Harz von *NovaBiochem* erworben. Die verwendeten Aminosäurederivate stammen, soweit nicht selbst hergestellt, von den Firmen *Iris Biotech GmbH*, *NovaBiochem*, *Merck*, *Bachem*, *Neosystem* & *Aldrich*. Alle anderen eingesetzten Reagenzien stammen von den Firmen *Aldrich*, *Fluka* und *Merck*.

Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle (DC-Kontrolle) und R_f -Wert-Bestimmung erfolgte auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichteten Aluminiumfolien der Firma *Merck* (Schichtdicke 0.25 mm) mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen. Die Detektion erfolgte anhand UV-Absorption bei 254 nm sowie durch Eintauchen in 5%-ige ethanolische Ninhydrin-Lösung oder Phosphormolybdänsäure-Reagenz (6.25 g Phosphormolybdänsäure, 2.5 g Cer(IV)-Sulfat, 15 mL konz. Schwefelsäure, 235 mL H₂O) und anschließender Wärmebehandlung.

Für die **Säulenchromatographie** wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh ASTM, Korngröße 0.040-0-063 mm) der Firma *Merck* mit 50-100-fachem Überschuss, bezogen auf die Masse des Rohprodukts, verwendet. Es wurde ein Druck von 1-1.2 bar angewendet.

Analytische und präparative RP-HPLC wurde an folgenden Geräten und Säulen (*Omniscrom YMC Europe GmbH*) durchgeführt:

Pharmacia Basic 10 F, Autosampler A 900, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn V3.00; Säulenmaterial: YMC-ODS-A 120 5-C₁₈ (120 Å, 5 µm, 250 mm × 4.6 mm), analytische HPLC

Pharmacia Basic 100 F, Pumpensystem P-900, Detektor UV-900, Steuerungssoftware Unicorn V3.00; Säulenmaterial: (a) YMC-ODS-A 120 10-C₁₈ (120 Å, 10 µm, 250 mm × 20 mm); semipräparative HPLC; (b) YMC-ODS 120 11-C₁₈ (120 Å, 11 µm, 250 mm × 30 mm); präparative HPLC

Waters System Breeze, Pumpensystem 1525, Detektor 2487 Dual, Steuerungssoftware Breeze V3.20; Säulenmaterial YMC-ODS-A 120 5-C₁₈ (120 Å, 5 µm, 250 mm × 20 mm); semipräparative HPLC

Beckman System Gold, Hochdruckpumpenmodul 125, UV-Detektor 166 Säulenmaterial: YMC-ODS-A 120 5-C₁₈ (120 Å, 5 µm, 250 mm × 20 mm) semipräparative HPLC

Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus H₂O (Laufmittel A) und Acetonitril (Laufmittel B) mit jeweils 0.1 % (v/v) TFA im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 30 min. verwendet. Die Flussraten betragen 1 mL/min (analytisch) und 8 mL/min (semipräparativ). Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

ESI-Massenspektren wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ in Kombination mit dem HPLC-System *Hewlett Packard HP 1100* (Säulenmaterial: *Omniscrom YMC ODS-A C18* (120 Å, 3 µm, 125 mm × 2 mm), Flußrate 0.2 mL/min) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus H₂O und Acetonitril mit jeweils 0.1 % (v/v) Ameisensäure im Gradientenbetrieb. Es wurden unterschiedliche lineare Gradientenprofile innerhalb von 15 min. verwendet.

NMR-Spektren der Aminosäurederivate wurden an den Geräten AC 250 und DMX 500 der Firma *Bruker* bei 298 K und 300 K aufgenommen. Die verwendeten Pulsprogramme stammen aus der *Bruker*-Bibliothek oder wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe geschrieben. Die Messungen wurden in Probenröhrchen mit 0.5 cm Durchmesser durchgeführt, wobei in der Regel 3.5

bis 5 mg Substanz in 0.6 mL DMSO-d₆ oder CDCl₃ gelöst wurden. Die Daten wurden mit den Programmen *XWIN-NMR*, *Topspin*, *MetreC* und *MestreNova* prozessiert und ausgewertet. Chemische Verschiebungen (δ) sind in *parts per million* (ppm) und Kopplungskonstanen (J) in Hertz (Hz) angegeben. Interner Standard für chemische Verschiebungen von ¹H und ¹³C waren die Lösungsmittelsignale (DMSO-d₅: δ = 2.49 ppm im ¹H-NMR, DMSO-d₆: δ = 39.5 ppm im ¹³C-NMR; CHCl₃: δ = 7.24 ppm im ¹H-NMR, CDCl₃ δ = 77.0 ppm im ¹³C-NMR. ¹³C-NMR-Spektren wurden mit ¹H-Breitbandentkopplung aufgenommen.

Die fertigen Produkte wurden mit einer **Gefriertrocknungsanlage** der Firma *Christ* (Osterode) lyophilisiert.

7.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

7.2.1. AAV1-T (Belegen von TCP-Harz)

1.00 g TCP-Harz (maximale Belegungsichte ca. 1.0 mmol/g Harz) wird in ein tariertes Schüttelgefäß eingewogen. Dieses Schüttelgefäß kann z.B. eine Spritze sein, versehen mit einer Polypropylen-Fritte und einer Kanüle. Dazu wird eine Lösung aus Aminosäurederivat (1.2 eq., 1.2 mmol) und 646 μ l DIPEA (6 eq., 6.0 mmol) in 10 mL trockenem DCM gegeben und zwei Stunden unter Schütteln gemischt. Dann wird 1.0 mL MeOH zugefügt (capping) und für weitere 30 min. geschüttelt, abfiltriert und nacheinander mit zweimal 10 mL DCM, dreimal 10 mL NMP und dreimal mit 20 mL MeOH (Ultraschall zur Auflösung von Klumpen) gewaschen. Anschließend wird das belegte Harz im HV getrocknet und der Belegungsgrad gravimetrisch nach folgender Formel bestimmt:

$$n = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 1000}{(MG_{Xaa} - m_{Sub}) \cdot m_2}$$

n = Mol Aminosäure am Harz

m₁ = Masse des unbelegten TCP-Harzes [g]

m₂ = Masse des belegten Harzes [g]

m_{Sub} = Masse der vom Harz substituierten Gruppe (hier: HCl = 36.461 g/mol)

MG_{Xaa} = Molgewicht der Aminosäure [g/mol]

Formel 7-1: Formel zur Berechnung von Belegungsdichten

7.2.2. AAV1-R (Belegen von Rink-Amid-Harz)

1.00 g Rink-Amid-Harz (maximale Belegungsdichte ca. 0.70 mmol/g) wird in ein geeignetes Schüttelgefäß (siehe **AAV1-T**) eingewogen und zunächst nach **AAV2** (siehe 7.2.3) Fmoc-entschützt. Zum entschützten Harz wird anschließend eine Lösung bestehend aus Aminosäurederivat (2.0 eq., 1.4 mmol), 270 mg TBTU (2.0 eq., 1.4 mmol), 113 mg HOBt (2.0 eq., 1.4 mmol) und 357 µL DIPEA (5.0 eq., 3.5 mmol) gegeben. Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wird 5 × 1 Minute mit je 10 mL NMP und darauf dreimal mit je 10 mL DCM gewaschen. Dann werden 10 mL einer Lösung aus DCM, Acetanhydrid und DIPEA (75:25:2.5 v/v/v) zum Harz gegeben. Nach 20 Minuten wird die Lösung verworfen und nochmals 5 × mit je 10 mL DCM gewaschen. Das Harz wird daraufhin im Exsikkator getrocknet und der Belegungsgrad gravimetrisch nach Formel 7-1 mit m_{Sub} = 240.25 g/mol bestimmt.

7.2.3. AAV2 (Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe an der festen Phase)

Das in NMP gewaschene Harz, wird mit einer 20%-igen Lösung aus Piperidin in NMP (v/v) versetzt und 5 min. geschüttelt. Nach einmaligem Waschen des Harzes in NMP wird dieser Vorgang für 10 min. wiederholt. Anschließend wird fünfmal mit NMP gewaschen.

7.2.4. AAV3-H (Festphasensynthese des linearen Peptids mit der HATU/HOAt-Methode)

Nach dem Fmoc-Entschützen mit Hilfe von **AAV2** wird zum in NMP gewaschenen Harz eine Lösung aus je 2.0 eq. Aminosäurederivat, HATU, HOAt und 5.0 eq. DIPEA (bezogen auf den freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß) in 10 mL NMP gegeben. Das Reaktionsgefäß wird für 1.5 h geschüttelt, danach wird abfiltriert und fünfmal mit NMP gewaschen. Bei Bedarf (HPLC-Kontrolle oder **AAV4** (Kaiser-Test)) wird die Kupplung wiederholt. Soll das Harz für längere Zeit aufbewahrt werden, so wird es dreimal mit DCM gewaschen und anschließend im HV getrocknet.

7.2.5. AAV3-T (Festphasensynthese des linearen Peptids mit Fmoc-Aminosäuren mit der TBTU/HOBt-Methode)

Nach dem Fmoc-Entschützen mit Hilfe von **AAV2** wird zum in NMP gewaschenen Harz eine Lösung aus je 2.0 eq. Aminosäurederivat, TBTU, HOBt und 5.0 eq. DIPEA (bezogen auf den freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß) in 10 mL NMP gegeben. Das Reaktionsgefäß wird für 1.5 h geschüttelt, danach wird abfiltriert und fünfmal mit NMP gewaschen. Bei Bedarf (HPLC-Kontrolle oder **AAV4** (Kaiser-Test)) wird die Kupplung wiederholt. Soll das Harz für längere Zeit aufbewahrt werden, so wird es dreimal mit DCM gewaschen und anschließend im HV getrocknet.

7.2.6. AAV4-H (Festphasensynthese des linearen Peptids mit NBS-NMe-Aminosäuren mit der HATU/HOAt-Methode)

Zum Kuppeln von α -NBS-geschützten Aminosäuren wird nach **AAV3-H** verfahren. Allerdings wird als Base Collidin anstatt DIPEA verwendet.

7.2.7. AAV4-T (Festphasensynthese des linearen Peptids mit NBS-NMe-Aminosäuren mit der TBTU/HOBt-Methode)

Zum Kuppeln von α -NBS-geschützten Aminosäuren wird nach **AAV3-T** verfahren. Allerdings wird als Base Collidin anstatt DIPEA verwendet.

7.2.8. AAV5 (Schützen des N-Terminus' mit der NBS-Schutzgruppe an der festen Phase)

Das nach **AAV2** entschützte lineare Peptid wird mit einer Lösung bestehend aus 10.0 eq. Collidin (bezogen auf den freien N-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß) und 5.0 eq. 2-NBSCI in 10 mL NMP pro Gramm Harz versetzt. Nach 15 min. wird die Reaktionslösung verworfen und das Harz gründlich mit NMP gewaschen (5×).

7.2.9. AAV6 (N-Methylieren des N-Terminus' an der festen Phase)

Nach Durchführung von **AAV5** wird das Harz dreimal mit THF gewaschen. Nun werden 10 eq. MeOH und 5.0 eq. Triphenylphosphin (bezogen auf den freien N-Terminus an der Festphase) in 5 mL THF pro Gramm Harz in das Schüttelgefäß gegeben. Im Anschluss werden langsam 5.0 eq. DIAD in 5 mL THF pro Gramm Harz hinzugefügt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min. wird fünfmal mit THF gewaschen.

7.2.10. AAV7 (Abspalten der NBS-Schutzgruppe)

Zunächst wird das in THF gewaschene und nach **AAV6** methylierte Peptid dreimal mit NMP gewaschen. Danach werden 5.0 eq DBU und 10 eq. β -Mercaptoethanol (bezogen auf den freien N-Terminus an der Festphase) in 10 mL NMP pro Gramm Harz zum Peptid gegeben und es wird für 5 min. geschüttelt. Die Reaktionslösung wird verworfen und der Vorgang ein weiteres

Mal wiederholt. Im Anschluss wird fünfmal mit NMP gewaschen. Soll anschließend ein weiteres Aminosäurederivat an den entschützten *N*-Terminus gekuppelt werden, wird nach **AAV3-H** vorgegangen.

7.2.11. AAV8 (Acetylierung von Aminofunktionen an der Festphase)

Zunächst wird das Harz dreimal mit DCM gewaschen. Dann werden pro Gramm Harz 10 mL einer Lösung aus DCM, Acetanhydrid und DIPEA (75:25:2.5 v/v/v) zum Harz gegeben. Nach 20 Minuten wird nochmals 5× mit DCM gewaschen.

7.2.12. AAV9 (Abspalten von Alloc/Allyl-Schutzgruppen an der festen Phase)

Das in NMP gewaschene Harz wird dreimal eine Minute mit trockenem DCM gewaschen. Danach wird pro Alloc/Allyl-Schutzgruppe eine Lösung aus 12 eq. Phenylsilan in 5.0 mL DCM pro Gramm Harz hinzugegeben und für 2 min. gerührt. Eine Mischung aus 0.12 eq. Pd(PPh₃)₄ pro Alloc/Allyl-Schutzgruppe in 5.0 mL DCM pro Gramm Harz wird rasch in das Schüttelgefäß gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 min. wird die Reaktionslösung verworfen und das Harz zunächst dreimal mit DCM gewaschen. Anschließend wird 1× eine Minute mit einer Lösung aus DIPEA (0.5 Vol.-%) in DMF und danach 1× vier Minuten mit einer Lösung aus Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat (DEDCT) (0.5 Massen-%) in DMF gewaschen. Der Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Zum Schluss wird das Harz nochmals 5× mit NMP gewaschen.

7.2.13. AAV10-D-a (Cyclisierung linearer, geschützter Peptide mit DPPA in Lösung)

Das abgespaltene lineare, geschützte Peptid wird in frisch destilliertem DMF gelöst, sodass die Konzentration des Peptids $\leq 10^{-3}$ mol/l beträgt. Anschließend werden 3.0 eq. DPPA und 5 eq. NaHCO₃ zugefügt. Diese Mischung wird für 48 h

bei RT gerührt. Danach wird die Lösung im Vakuum bis auf ein sehr geringes Volumen eingengt. Dieses wird in ca. 30 mL einer Mischung aus gesättigter NaCl-Lösung und H₂O (1:1) getropft. Der sich dabei bildende Niederschlag wird abzentrifugiert, dreimal mit H₂O gewaschen und anschließend im HV getrocknet.

7.2.14. AAV10-D-b (Cyclisierung linearer, entschützter Peptide mit DPPA in Lösung)

Die Cyclisierung wird gemäß **AAV10-D-a** durchgeführt. Allerdings wird nach der Reaktionszeit das DMF komplett im Vakuum entfernt, der Rückstand anschließend mit etwa 1 mL Acetonitril/H₂O (1:1 v/v) pro 100 mg Rohprodukt aufgenommen und das Cyclopeptid anschließend durch RP-HPLC von überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukten getrennt.

7.2.15. AAV10-H-a (Cyclisierung linearer Peptide mit HATU/HOAt an der Festphase)

Das mit NMP gewaschene Harz wird mit einer Lösung aus 2.0 eq. HATU und 5.0 eq. DIPEA in 10 mL NMP pro Gramm Harz versetzt. Besteht die Gefahr der Racemisierung durch basenkatalysierte Epimerisierung, werden außerdem 2.0 eq. HOAt zur Lösung gegeben. Nach zwei Stunden wird durch HPLC-Kontrolle oder **AAV4** (Kaisertest) auf Vollständigkeit der Reaktion getestet. Bei Unvollständigkeit wird nochmals eine Reaktionslösung mit identischer Zusammensetzung zum Harz gegeben. Man lässt so lange reagieren bzw. wiederholt den Vorgang so oft, bis die Reaktion vollständig ist. Im Anschluß wird gründlich mit NMP gewaschen (5 × 1 min).

7.2.16. AAV10-H-b (Cyclisierung linearer Peptide mit HATU/HOAt in Lösung)

Zu einer Lösung aus linearem Peptid in DMF wird unter kräftigem Rühren eine Lösung aus HATU (1.5 e.q.), HOAt (1.5 eq.) und Collidin (1.5 eq.) in DMF langsam zugetropft. Die finale Konzentration des linearen Peptids soll 5 mM betragen. Man läßt über Nacht rühren und verdampft anschließend das Lösungsmittel. Zum Rohprodukt wird gesättigte NaHCO_3 -Lösung gegeben. Darauf wird dreimal mit EtOAc extrahiert. Die organische Schicht wird mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Der Essigsäureethylester wird verdampft, sodass das cyclisierte Rohpeptid zurückbleibt.

7.2.17. AAV10-P (Cyclisierung linearer Peptide mit PyBOP)

Das lineare Peptid wird in frisch destilliertem DMF gelöst, sodass die Konzentration des Peptids $\leq 10^{-3}$ mol/l beträgt. Zu dieser Lösung werden unter Rühren 10 eq. Collidin gegeben. Im Anschluss wird im Stundenrhythmus je 1/3 von 1.0 eq. PyBOP zugefügt. Die Mischung wird für insgesamt 48 h gerührt. Daraufhin wird das Lösungsmittel bis auf ein kleines Volumen im Vakuum eingengt. Dieses wird in ca. 30 mL einer Mischung, bestehend aus gesättigter NaCl -Lösung und H_2O (1:1), getropft. Der dabei entstehende Niederschlag wird abzentrifugiert, dreimal mit H_2O gewaschen und im HV getrocknet.

7.2.18. AAV10-T (Cyclisierung linearer Peptide mit TBTU/HOBt an der Festphase)

Das mit NMP gewaschene Harz wird mit einer Lösung aus 2.0 eq. TBTU und 5.0 eq. DIPEA in 10 mL NMP pro Gramm Harz versetzt. Besteht die Gefahr der Racemisierung durch basenkatalysierte Epimerisierung, werden außerdem 2.0 eq. HOBt zur Lösung gegeben. Nach zwei Stunden wird durch HPLC-Kontrolle oder **AAV4** (Kaisertest) auf Vollständigkeit der Reaktion getestet. Bei Unvollständigkeit wird nochmals eine Reaktionslösung mit identischer

Zusammensetzung zum Harz gegeben. Man lässt so lange reagieren bzw. wiederholt den Vorgang so oft, bis die Reaktion vollständig ist. Im Anschluß wird gründlich mit NMP gewaschen (5 × 1 min).

7.2.19. AAV11-T-a (Abspalten von Peptiden vom TCP-Harz unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen mit HFIP)

Das in DCM gewaschene Harz wird mit einer Lösung, bestehend aus 20% HFIP in DCM (v/v), für 30 min. geschüttelt. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Die Lösungen werden vereinigt und bis zur Trockenheit eingedampft und anschließend im HV getrocknet.

7.2.20. AAV11-T-b (Abspalten von Peptiden vom TCP-Harz unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen mit AcOH)

Das in DCM gewaschene Harz wird mit einer Lösung, bestehend aus DCM, AcOH und TFE (6:3:1 v/v/v), für 60 min. geschüttelt. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Die Lösungen werden vereinigt und bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Toluol aufgenommen, welches zur Coevaporierung der Essigsäure im Vakuum wieder entfernt wird. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Danach wird der Rückstand im HV getrocknet.

7.2.21. AAV11-R (Abspalten und gleichzeitiges Entschützen von Peptiden vom Rink-Amid-Harz)

Das mit DCM gewaschene Harz wird mit 10 mL pro Gramm Harz einer Lösung bestehend aus TFA, TIPS und H₂O (95:2.5:2.5 v/v/v) versetzt und 2 h geschüttelt. Die Lösung wird darauf in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen, befüllt mit 30 mL eiskaltem Ether, gegeben. Danach wird das Schüttelgefäß noch zweimal für je 30 min. mit jeweils 5 mL frischer Abspalllösung behandelt. Die Lösungen werden ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Der

ausgefallene Niederschlag wird abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wird mit kaltem Ether gewaschen (3×). Der Niederschlag wird nach jedem Waschgang abzentrifugiert und die Waschlösungen verworfen. Danach wird der Niederschlag im HV getrocknet.

7.2.22. AAV12 (Die *N*-Methylierung von Fmoc-Aminosäuren in Lösung über Oxazolidinone)

20 mmol Fmoc-Aminosäure werden in 250 mL Toluol suspendiert. Zu dieser Mischung werden 4.0 g Paraformaldehyd und 0.20 g Paratoluolsulfonsäure (1.2 mmol) gegeben. Bei azeotroper Wasserabscheidung wird für 30 min. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen der nun klaren Lösung wird zweimal mit 100 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Anschließend wird über Na₂SO₄ getrocknet. Das Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum ergibt das Oxazolidinon der Fmoc-Aminosäure als klebrige Masse. Diese wird im Hochvakuum getrocknet und dann in 200 mL CHCl₃/TFA (1:1) gelöst. Es werden 9.9 mL Triethylsilan (60 mmol) zugetropft, und bei RT für 24 h gerührt. Die Lösung wird darauf im Vakuum bis zur Trockenheit eingedampft. Zum Entfernen der TFA wird das entstandene Öl dreimal mit DCM aufgenommen und wieder evaporiert. Nach der Umkristallisation in Ether/Hexan bleibt die *N*-Fmoc-*N*-methyl-aminosäure in Form eines Feststoffs.

7.2.23. AAV13 (Kaisertest)

Eine kleine Harzmenge wird mit DCM gewaschen und anschließend in ein Reagenzglas oder Eppendorf-*Cap* überführt. In das Reagenzglas werden jeweils zwei Tropfen von folgenden Lösungen gegeben:

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

Das Gemisch wird anschließend auf 60 °C erhitzt. Tritt nach zwei min. keine Blaufärbung ein, dann war die Kupplung vollständig.

7.2.24. AAV14-a (Abspalten von säurelabilen Schutzgruppen von Cyclopeptiden mit TFA Variante 1)

Das Rohpeptid wird in einer Lösung bestehend aus TFA/H₂O/TIPS/DCM (60:2.5:2.5:35 v/v/v/v) gelöst und für 3 h gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum bei 40 °C entfernt und der Rückstand in Ether gefällt.

7.2.25. AAV14-b (Abspalten von säurelabilen Schutzgruppen von Cyclopeptiden mit TFA Variante 2)

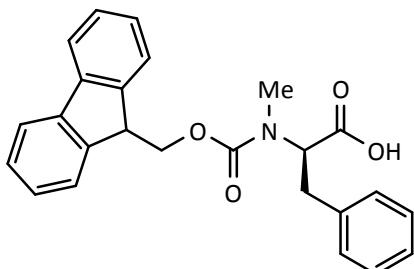
Analog zu **AAV14-a**, jedoch wird eine Lösung bestehend aus TFA/H₂O/TIPS/DCM (47.5:2.5:2.5:47.5 v/v/v/v) für 2 h zum geschützten Rohpeptid gegeben.

7.2.26. AAV14-c (Abspalten von säurelabilen Schutzgruppen von Cyclopeptiden mit TFA Variante 3)

Analog zu **AAV14-a**, jedoch wird die Abspalllösung für 35 min. zum geschützten Rohpeptid gegeben.

7.3. Synthese der Aminosäurederivate und analytische Daten

N-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*N*-methyl-*D*-phenylalanin



$C_{25}H_{23}NO_4$

Exact Mass: 401.16

Mol. Wt.: 401.45

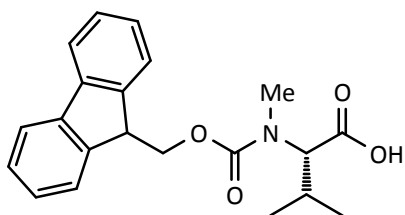
5.0 g *N*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*D*-phenylalanin (13 mmol) ergeben bei Umsetzung nach **AAV12** 4.2 g (11 mmol, 85 % d. Th.) der Titelverbindung als weißen Feststoff.

HPLC (10-100 %, 30 min): $R_t = 24.39$ min.

MS (ESI): $m/z = 402.1$ $[m+H]^+$; 421.4 $[(2m+Ca)/2]^{2+}$; 424.3 $[m+Na]^+$; 621.7 $[(3m+Ca)/2]^{2+}$; 803.1 $[2m+H]^+$; 825.1 $[2m+Na]^+$; 841.2 $[2m+K]^+$; 1226.1 $[3m+Na]^+$; 1242.9 $[3m+K]^+$.

1H -NMR (DMSO; 500 MHz): δ (ppm) = 12.90 (s, 1H, COOH); 7.86-7.03 (m, 13H, Aromaten); 4.85-4.59 (m, 1H, CH(α)); 4.38-4.12 (m, 3H, Fmoc-CH-CH₂); 3.20-3.00 (m, 2H, CH₂(β)); 2.68 (s, 3H, CH₃).

^{13}C -NMR (DMSO, 126 MHz): δ (ppm) = 172.1 (COOH); 156.0 (Fmoc-CO); 144.1; 144.0; 143.9; 141.0; 138.2; 138.0; 129.0; 128.9; 128.5; 127.9; 127.4; 126.6; 125.2; 67.0 (Fmoc-CH₂); 60.5; 59.9 (C(α)); 46.9; 46.8 (Fmoc-CH); 34.5; 34.2; 32.0 (CH₃); 31.6; 31.0.

N-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*N*-methyl-L-valinC₂₁H₂₃NO₄

Exact Mass: 353.16

Mol. Wt.: 353.41

6.8 g *N*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-L-valin (20 mmol) ergeben bei Umsetzung nach **AAV12** 6.8 g (19 mmol, 100 % d. Th.) der Titelverbindung.

HPLC (10-100 %, 30 min): R_t = 24.84 min.,

MS (ESI): m/z = 354.2 [m+H]⁺; 373.5 [(2m+Ca)/2]²⁺; 376.3 [m+Na]⁺; 392.3 [m+K]⁺; 550.0 [(3m+Ca)/2]²⁺; 729.3 [2m+Na]⁺; 745.3 [2m+K]⁺; 1082.1 [3m+Na]⁺; 1098.0 [3m+K]⁺.

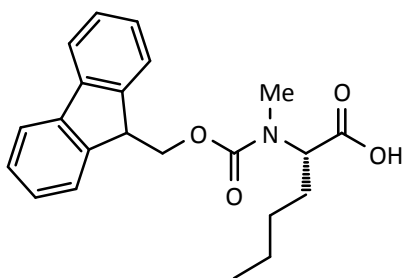
¹**H-NMR** (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 7.75 (m, 2H, H_{aromat.}), 7.57 (m, 2H, H_{aromat.}), 7.38 (m, 2H, H_{aromat.}), 7.29 (m, 2H, H_{aromat.}), 4.49 (m, 3H), 4.26 (m, 1H*, C_αH), 4.10 (d, ³J = 11.4 Hz, 1H**, C_αH), 2.88 (s, 1H, -CH_α-N(R)-CH₃), 2.25 (m, 1H*, -CH-(CH₃)₂), 2.05 (m, 1H**, -CH-(CH₃)₂), 1.03 (d, ³J = 6.5 Hz, 3H*, -CHCH₃), 0.93 (d, ³J = 6.5 Hz, 3H**, -CHCH₃), 0.88 (d, ³J = 6.5 Hz, 3H*, -CHCH₃), 0.75 (d, ³J = 6.5 Hz, 3H**, -CHCH₃)

¹³**C-NMR** (CDCl₃, 125 MHz): δ = 175.0, 157.1, 144.0, 141.6, 128.0, 127.3, 125.1, 120.2, (68.2*, 67.9**), 65.1, 47.5, 31.4, 27.7, 19.9, (19.3*, 19.1**)

*Fmoc-Rotamer mit größerer Population

**Fmoc-Rotamer mit geringerer Population

¹³C-Verschiebungen die mit beiden Rotameren in Verbindung stehen sind in Klammern angegeben

***N*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*N*-methyl-*L*-norleucin**C₂₂H₂₅NO₄

Exact Mass: 367.18

Mol. Wt.: 367.44

0.50 g *N*-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)-*L*-norleucin (1.41 mmol) ergeben bei Umsetzung nach **AAV12** 0.45 g (1.11 mmol, 79 % d. Th.) der Titelverbindung.

HPLC (10-100 %, 30 min.): R_t = 25.38 min.,

MS (ESI): m/z = 367.9 [m+H]⁺; 390.2 [m+Na]⁺; 1124 [3m+Na]⁺

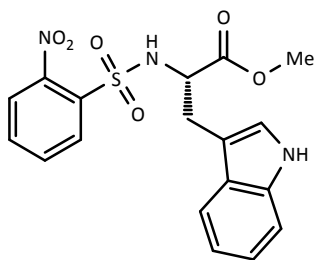
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ (ppm) = 8.54 (bs, 1H, CH(R)-COOH); 7.74 (m, 2H, H_{aromat.}); 7.57 (m, 2H, H_{aromat.}); 7.29 (m, 4H, H_{aromat.}); 4.77 (m, 1H, -CH(R)-COOH); 4.44 (m, 2H, -CH-CH₂-O-CO-); 4.20 (m, -CH-CH₂-O-CO-); 2.87 (s, 3H, Fmoc-N(R)-CH₃); 2.08-1.58 (m, 2H, -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 1.30 (m, 4H, -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 0.90 (s, 3H, -CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃).

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ (ppm) = 177.57, 140.87, 127.92, 126.90, 124.99, 124.23, 120.18, (68.03*, 67.80**), (58.72*, 58.56**), 47.37, 30.66, 28.59, (28.42*, 28.34**), (22.34*, 22.21**), 14.16.

*Fmoc-Rotamer mit größerer Population

**Fmoc-Rotamer mit geringerer Population

¹³C-Verschiebungen die mit beiden Rotameren in Verbindung stehen sind in Klammern angegeben

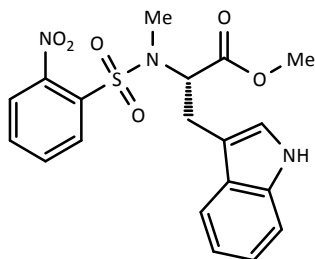
N_{α} -(*o*-Nitrobenzensulfonyl)-L-tryptophanmethylester $C_{18}H_{17}N_3O_6S$

Exact Mass: 403.08

Mol. Wt.: 403.41

10.0 g (1 eq., 39.3 mmol) Tryptophanmethylesterhydrochlorid und 8.97 g *o*-Nitrobenzensulfonylchlorid werden in 200 mL DCM suspendiert. Unter Rühren werden 16.4 mL (3 eq., 11.92 g, 118 mmol) Triethylamin dazugegeben. Nach 2.5 h wird die dann klare, orangefarbene Lösung mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung (3x) und gesättigter NaCl-Lösung (2x) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Na_2SO_4 , wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Produkt im HV getrocknet. Man erhält 15.8 g (39.3 mmol, 100 % d.Th.) eines klaren, orangefarbenen Öls.

DC (DCM): $R_f = 0.27$ **HPLC** (10-100 %, 15 min.): $R_f = 13.39$ min.; (10-100 %, 30 min.): $R_f = 22.00$ min.**MS** (ESI): $m/z = 404.3 [m+H]^+$, $807.1 [2m+H]^+$, $828.9 [2m+Na]^+$. **1H -NMR** (DMSO, 250 MHz): δ (ppm) = 10.80(s, 1H); 8.66 (bs, 1H); 7.83-7.77 (m, 1H); 7.73-7.58 (m, 2H); 7.54-7.46 (m, 1H); 7.39 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H); 7.09-6.90 (m, 2H); 4.23-4.12 (m, 1H); 3.48 (s, 3H); 3.18 (dd, $J = 5.8$ Hz, 14.5 Hz, 1H); 3.04 (dd, $J = 8.8$ Hz, 14.5 Hz, 1H).

N_{α} -(Methyl)- N_{α} -(*o*-Nitrobenzensulfonyl)-L-tryptophanmethylester
 $C_{19}H_{19}N_3O_6S$

Exact Mass: 417.1

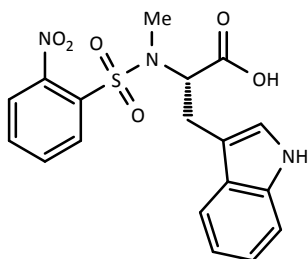
Mol. Wt.: 417.44

15.8 g N_{α} -(*o*-Nitrobenzensulfonyl)-L-tryptophanmethylester (1 eq., 39.3 mmol) und 11.7 mL (2 eq, 12.0 g, 78.6 mmol) DBU werden in 210 mL DMF gelöst. Bei 0 °C werden 14.9 mL (4 eq., 19.8 g, 157 mmol) Dimethylsulfat zugegeben. Nach 5 min. lässt man die Reaktionsmischung auf RT erwärmen und rührt eine Stunde. Anschließend wird das Lösungsmittel und das überschüssige Dimethylsulfat im Vakuum entfernt, der Rückstand mit DCM aufgenommen und anschließend mit NaHCO₃-Lösung (ges.) (3×) und H₂O (2×) gewaschen. Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV über Nacht getrocknet. Man erhält 15.9 g (38.1 mmol, 97 % d.Th.) eines gelblichen, transparenten Öls.

HPLC (10-100 %, 15 min.): $R_t = 13.89$ min.; (10-100%, 30 min.): $R_t = 23.06$ min.

MS (ESI): $m/s = 418.2$ [m+H]⁺, 834.9 [2m+H]⁺, 856.8 [2m+Na]⁺.

¹H-NMR (DMSO, 250 MHz): δ (ppm) = 10.87 (s, 1H); 7.85-7.69 (m, 2H); 7.55-7.47 (m, 3H); 7.35 (d, $J = 8$ Hz, 1H); 7.22-7.17 (m, 1H); 7.13-6.97 (m, 2H); 4.92-4.84 (m, 1H); 3.56 (s, 3H); 3.42-3.33 (m, 1H); 3.18 (dd, $J = 10$ Hz, 15 Hz, 1H); 3.00 (s, 3H).

N_{α} -(Methyl)- N_{α} -(*o*-Nitrobenzensulfonyl)-L-tryptophanC₁₈H₁₇N₃O₆S

Exact Mass: 403.08

Mol. Wt.: 403.41

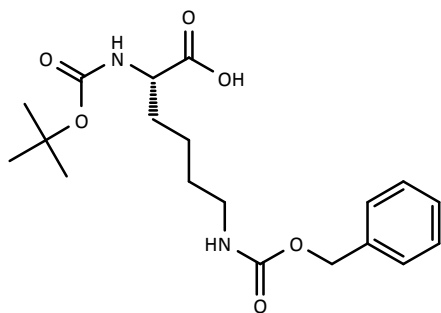
14.3 mg (1 eq., 34.3 mmol) N_{α} -(Methyl)- N_{α} -(*o*-Nitrobenzensulfonyl)-L-tryptophanmethylester und 18.3 g (4 eq., 137 mmol) Lithiumiodid und 2.77 mL (1 eq., 2.71 g, 34.2 mmol) Pyridin werden in 140 mL Essigsäureethylester gelöst. Die Lösung wird lichtgeschützt für 16 h refluxiert. Anschließend wird Wasser (140 mL) zugegeben und mit 0.1 M HCl angesäuert und darauf rasch mit Essigsäureethylester extrahiert. Die organische Phase wird mit H₂O und NaCl-Lösung (ges.) gewaschen und mit 0.1 M NaOH-Lösung (3×150 mL) extrahiert. Die wässrige Phase wiederum wird mit 1N HCl angesäuert und unverzüglich mit Essigester extrahiert (3×150 mL). Nach dem Trocknen über Na₂SO₄ und dem Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum bleibt ein blassgelbes Pulver (11.1 g, 27.4 mmol, 80 % d.Th.).

HPLC (10-100 %, 15 min.): R_t = 12.26 min.; (10-100 %, 30 min.): R_t = 20.15 min.

MS (ESI): m/z = 404.2 [m+H]⁺, 426.4 [m+Na]⁺, 807.0 [2m+H]⁺, 828.9 [2m+Na]⁺.

¹H-NMR (DMSO, 250 MHz): δ (ppm) = 13.04 (s, 1H, -COOH), 10.82 (s, 1H, N_{indol}H), 7.79 (m, 1H, H_{aromat.}), 7.70 (m, 1H, H_{aromat.}) 7.49 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H_{aromat.}), 7.42 (m, 2H, H_{aromat.}), 7.31 (d, ³J = 7.7 Hz, 1H, H_{aromat.}), 7.17 (bs, 1H, H_{aromat.}), 7.02 (m, 2H, H_{aromat.}), 4.78 (dd, ³J = 5.2 Hz, 10.0 Hz, 1H, C_αH), 3.44-3.25 (m, 1H, -CH_α-CH(H)-C_{indol}.(R₂)), 3.15 (dd, ³J = 10.0 Hz, 15.1 Hz, -CH_α-CH(H)-C_{indol}.(R₂)), 2.97 (s, 3H, -CH_α-N(R)CH₃).

¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz): δ (ppm) = 171.5, 147.2, 136.1, 133.9, 131.6, 131.2, 129.4, 126.7, 123.9, 123.7, 121.0 118.5, 117.8, 111.5, 108.9, 59.7, 30.1, 24.9.

***N*_α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*_ε-(benzyloxycarbonyl)-L-lysine (2)**C₁₉H₂₈N₂O₆

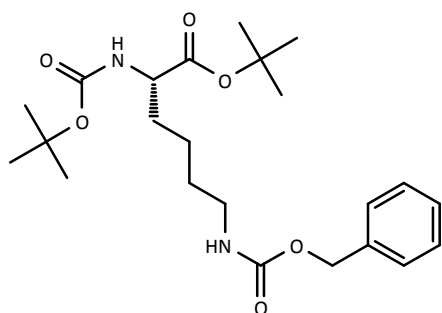
Exact Mass: 380.19

Mol. Wt.: 380.44

5.19 g Boc-Lys-OH (1 eq., 21.1 mmol) und 2.30 g (1.3 eq., 27.4 mmol) NaHCO₃ werden in 50 mL H₂O gelöst. Unter Rühren werden 5.78 g (1.1 eq., 23.2 mmol) Benzyloxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimid gelöst in 50 mL THF dazugetropft. Nach 24 h wird das THF im Vakuum verdampft und die verbleibende wässrige Phase mit Zitronensäure auf einen pH = 3-4 angesäuert. Danach wird die wässrige Phase mit Essigsäureethylester extrahiert (3×80 mL), die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet und danach das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es bleibt ein blassgelbes, transparentes Öl (7.95 g, 20.9 mmol, 99 % d.Th.).

HPLC (10-100%, 30 min): *t*_R = 11.5 min.

MS (ESI): *m/z* = 281.2 [m-Boc+H]⁺, 303.1 [m-Boc+Na]⁺, 325.2 [m-*t*Bu+H]⁺, 347.2 [m-*t*Bu+Na]⁺, 381.3 [m+H]⁺, 403.2 [m+Na]⁺, 561.2 [2m-2Boc+H]⁺, 583.2 [2m-2Boc+Na]⁺, 605.3 [2m-*t*Bu-Boc+H]⁺, 627.4 [2m-2*t*Bu-Boc+Na]⁺, 761.4 [2m-2Boc+H]⁺, 783.4 [2m-2Boc+Na]⁺.

N_{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N_{ϵ} -(benzyloxycarbonyl)-L-lysine-*tert*-butylester (3)C₂₃H₃₆N₂O₆

Exact Mass: 436.26

Mol. Wt.: 435.54

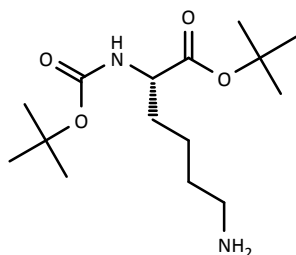
Zu einer Lösung bestehend aus 7.95 g (1.0 eq., 21.9 mmol) N^{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-lysine in 100 mL DMA werden 100 g (35 eq., 79.6 mL, 732 mmol) *tert*-Butylbromid, 72.2 g (26 eq., 523 mmol) Kaliumcarbonat und 4.76 g (1.0 eq., 21.9 mmol) Benzyltriethylammoniumchlorid gegeben. Man rührt für zwei Tage bei RT und verdünnt die Lösung anschließend mit 100 mL H₂O. Die resultierende Emulsion wird dreimal mit je 200 mL Diethylether extrahiert. Die kombinierten Etherfraktionen werden mit H₂O (1 × 200 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 × 200 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄, wird das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Man erhält 8.85 g (20.3 mmol, 97 % d.Th.) einer leicht gelblichen, transparenten klebrigen Masse.

HPLC (10-100%, 30 min): $t_R = 25.6$ min.

MS (ESI): $m/z = 281.1$ [m-Boc-*t*Bu+H]⁺, 303.1 [m-Cbz+H]⁺, 324.8 [m-2*t*Bu+H]⁺, 347.1 [m-2*t*Bu+Na]⁺, 380.8 [m-*t*Bu+H]⁺, 403.1 [m-*t*Bu+Na]⁺, 459.1 [m+Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.33$ (m, 5H, $H_{\text{aromat.}}$), 5.07 (s, 2H, -NH-CH₂-C₆H₅), 5.02 (bs, 1H, -CH₂NH-Cbz), 4.12 (m, 1H, C _{α} H), 3.16 (q, ³ $J = 6.4$ Hz, 2H, -CH₂CH₂NHCbz), 1.52 (m, 6H, CH _{α} CH₂CH₂CH₂-), 1.43 (s, 9H, *t*Bu), 1.41 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.1, 156.3, 136.8, 128.7, 82.1, 79.9, 66.8, 53.9, 41.0, 31.4, 29.6, 28.6, 28.2, 22.6$.

***N*_α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-lysine-*tert*-butylester (4)**C₁₅H₃₀N₂O₄

Exact Mass: 302.22

Mol. Wt.: 302.41

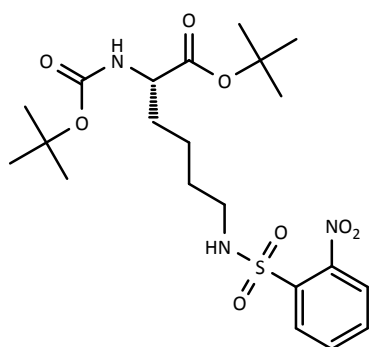
5.88 g (13.5 mmol) *N*^α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*^ε-(benzyloxycarbonyl)-L-lysine-*tert*-butylester werden in 150 mL Methanol gelöst. Dazu werden 0.588 mg Pd-Katalysator (5-10 % Pd auf Aktivkohle) gegeben. Nach 1 h Rühren unter Wasserstoffatmosphäre wird die Suspension über Kieselgel filtriert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum verdampft. Man erhält 3.71 g (12.3 mmol, 91 % d.Th.) eines transparenten und farblosen Öls.

HPLC (10-100%, 30 min): *t*_R = 16.1 min.

MS (ESI): *m/z* = 147.0 [*m*-Boc-*t*Bu+H]⁺, 191.1 [*m*-2*t*Bu+H]⁺, 247.0 [*m*-*t*Bu+H]⁺, 303.1 [*m*+H]⁺, 325.1 [*m*+Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.38 (m, N_εH₂), 5.06 (d, ³*J* = 7.4 Hz, 1H, N_αH), 4.18 (m, 1H, C_αH), 2.71 (t, ³*J* = 6.84 Hz, 2H, -CH₂NH₂), 1.68 (m, 6H, -C_αHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂), 1.48 (s, 9H, *t*Bu), 1.46 (s, 9H, *t*Bu).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 172.2, 155.6, 82.0, 79.8, 54.1, 42.1, 33.4, 33.0, 28.6, 28.2, 22.7.

**N_{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)- N_{ϵ} -(*o*-nitrobenzensulfonyl)-L-lysin-*tert*-butylester
(5)** $C_{21}H_{33}N_3O_8S$

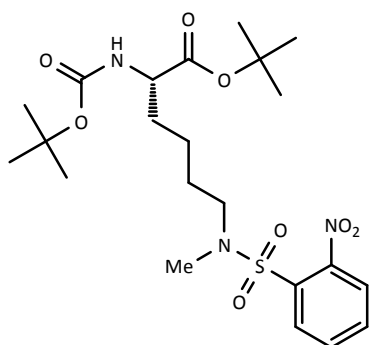
Exact Mass: 487.2

Mol. Wt.: 487.57

3.71 g (1.0 eq., 12.3 mmol) N_{α} -(*tert*-Butyloxycarbonyl)-L-lysin-*tert*-butylester werden in 80 mL DCM (abs.) gelöst. Unter Rühren werden 3.09 g (1.1 eq., 13.5 mmol) *o*-Nitrobenzensulfonylchlorid ($\geq 97\%$) und 3.42 mL (2 eq. 2.49 g, 24.6 mmol) Triethylamin hinzugegeben. Nach 6 h wird mit $3 \times$ NaHCO₃-Lösung (1N), $2 \times$ H₂O und $2 \times$ NaCl-Lösung (ges.) gewaschen. Das Lösungsmittel wird nach dem Trocknen der organischen Phase mit Na₂SO₄ im Vakuum entfernt. Es bleiben 5.33 g (10.9 mmol, 89 % d.Th.) eines gelblichen, transparenten Öls.

DC (DCM): $R_f = 0.73$ **HPLC** (10-100 %, 30 min.): $R_t = 24.7$ min.; (10-100 %, 15 min.): $R_t = 14.1$ min.**MS** (ESI): $m/z = 332.1$ [m-Boc-*t*Bu+H]⁺, 354.1 [m-Boc-*t*Bu+Na]⁺, 375.9 [m-2*t*Bu+H]⁺, 398.1 [m-2*t*Bu+Na]⁺, 454.0 [m-*t*Bu+Na]⁺, 487.9 [m+H]⁺, 510.1 [m+Na]⁺.

***N*_α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*_ε-methyl-*N*_ε-(*o*-nitrobenzensulfonyl)-*L*-lysin-*tert*-butylester (6)**



$C_{22}H_{35}N_3O_8S$

Exact Mass: 501.21

Mol. Wt.: 501.59

In eine Lösung bestehend aus 5.33 g (1.0 eq., 10.9 mmol) *N*_α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*_ε-(*o*-nitrobenzensulfonyl)-*L*-lysin-*tert*-butylester in 100 mL DMF werden unter Rühren zunächst 3.25 mL (2.0 eq., 3.32 g, 21.8 mmol) DBU und dann 4.13 mL (4.0 eq., 5.50 g, 43.6 mmol) Dimethylsulfat getropft. Um die nicht abreagierten Äquivalente Dimethylsulfat bei der Aufarbeitung einfacher entfernen zu können, werden nach 2.5 h 5.0 mL (8.0 eq., 5.25 g, 87.4 mmol) Eisessig und 11.6 mL (11.0 eq., 12.14 mg, 120 mmol) Triethylamin zur Reaktionsmischung gegeben. Nach weiteren 30 min. Reaktionszeit wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit DCM aufgenommen. Nach dem Waschen der organischen Phase mit 1N NaHCO₃-Lösung (3×) und H₂O (2×) wird das Lösungsmittel unter reduziertem Druck verdampft. Nach dem Reinigen des Rohproduktes mittels SC (Hex/EE 2:1 v/v) bleiben 3.8 g (7.6 mmol, 70 % d.Th.) Produkt. Dabei handelt es sich um ein blassgelbes, transparentes Öl.

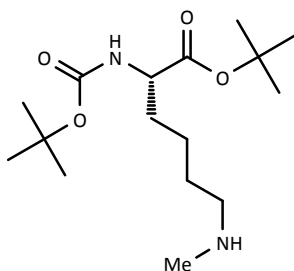
DC (Hex/EE 2:1 v/v): $R_f = 0.27$; (Hex/EE 1:1 v/v): $R_f = 0.61$.

HPLC (10-100 %, 30 min.): $R_t = 25.8$; (10-100 %, 15 min.): $R_t = 15.0$ min.

MS (ESI): $m/z = 346.1$ [m-Boc-*t*Bu+H]⁺, 390.1 [m-2*t*Bu+H]⁺, 412.1 [m-2*t*Bu+Na]⁺, 468.1 [m-*t*Bu+Na]⁺, 524.1 [m+Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.96$ (m, 1H, $H_{\text{aromat.}}$), 7.66 (m, 2H, $H_{\text{aromat.}}$), 7.58 (m, 1H, $H_{\text{aromat.}}$), 4.98 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1H, $N_{\alpha}H$), 4.11 (m, 1H, $C_{\alpha}H$), 3.20 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, -CH₂CH₂NMeNBS), 2.86 (s, 3H, NCH₃), 1.56 (m, 4H, 2×CH₂), 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.42 (s, 9H, *t*Bu), 1.34 (m, 2H, CH₂).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 171.9, 155.5, 148.4, 133.5, 131.6, 131.0, 124.2, 82.1, 79.8, 53.8, 50.0, 34.4, 32.6, 29.8, 28.1, 27.3, 22.0$.

***N*_α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*_ε-methyl-L-lysine-*tert*-butylester (7)** $C_{16}H_{32}N_2O_4$

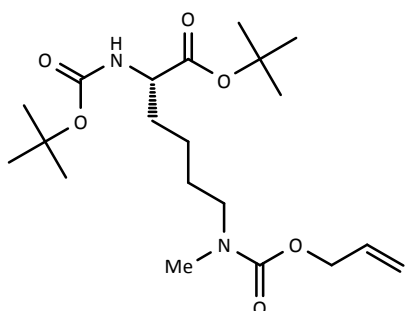
Exact Mass: 316.24

Mol. Wt.: 316.44

Zu einer Lösung bestehend aus 2.40 g (1.0 eq., 4.79 mmol) *N*_α-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-*N*_ε-methyl-*N*_ε-(*o*-nitrobenzensulfonyl)-L-lysine-*tert*-butylester in 20 mL DMF werden 2.01 g (10.0 eq., 47.9 mmol) LiOH·H₂O gegeben. Die Lösung wird auf 0 °C abgekühlt und unter Rühren werden 1.67 mL (5.0 eq., 1.87 g, 24.0 mmol) β-Mercaptoethanol zugetropft. Man lässt 30 min. bei 0 °C reagieren. Anschließend wird auf RT erwärmt und gibt 100 mL 0.1 N NaOH-Lösung zu. Danach wird dreimal mit Essigsäureethylester extrahiert. Die Extrakte werden kombiniert und mit 0.1 N NaOH-Lösung (2 ×) reextrahiert sowie mit NaCl-Lösung (ges.) gewaschen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand im HV getrocknet. Es ein blassgelbes, transparentes Öl zurück mit einer Masse von 2.56 g. Dieses wird ohne weitere Reinigung im folgenden Reaktionsschritt eingesetzt.

DC (Hex/EE 1:1 v/v): $R_f = 0.32$.**HPLC** (10-100 %, 15 min.): $R_t = 8.18$ min.**MS** (ESI): $m/z = 161.1$ [m-Boc-*t*Bu+H]⁺, 205.1 [m-2*t*Bu+H]⁺, 261.0 [m-*t*Bu+H]⁺, 317.1 [m+H]⁺, 339.1 [m+Na]⁺.

N_ϵ -(Allyloxycarbonyl)- N_α -(*tert*-butyloxycarbonyl)- N_ϵ -methyl-L-lysin-*tert*-butylester (8)



$C_{20}H_{36}N_2O_6$

Exact Mass: 400.26

Mol. Wt.: 400.51

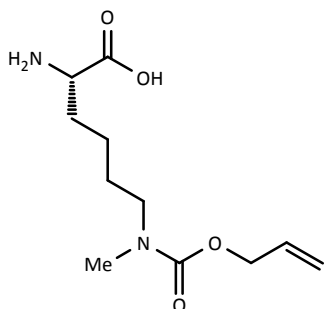
2.56 g des Rohprodukts aus der vorangehenden Reaktion (enthält 4.79 mmol des Lysinderivats) werden in 20 mL DMF (abs.) gelöst. Unter Rühren werden 604 mg (3.0 eq., 14.4 mmol) LiOH·H₂O und 662 µl (1.3 eq., 6.23 mmol) Allylchloroformat hinzugegeben. Nach dem Erhitzen für 1 h auf 50 °C werden weitere 356 µl Allylchloroformat zugetropft. Zwei Stunden später wird die Mischung auf RT abgekühlt und mit 1N NaHCO₃-Lösung auf ein Volumen von ca. 200 mL verdünnt. Es wird dreimal mit je 200 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die EE-Extrakte werden vereinigt, mit NaCl-Lösung (ges.) gewaschen und der EE im Vakuum verdampft. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch (Hex/EE 3:1 v/v) gereinigt. Es bleiben 1.59 g (3.97 mmol, 83 % d.Th.) eines hellgelben Öls.

DC (Hex/EE 1:1): $R_f = 0.71$; (Hex/EE 3:1): $R_f = 0.34$.

HPLC (10-100 %, 15 min.): $R_t = 14.87$ min.

MS (ESI): $m/z = 245.1$ [m-Boc-*t*Bu+H]⁺, 301.1 [m-Boc+H]⁺, 311.0 [m-2*t*Bu+Na]⁺, 367.1 [m-*t*Bu+Na]⁺, 423.1 [m+Na]⁺.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.91$ (ddt, ³ $J = 5.4$ Hz, ³ $J = 10.6$ Hz, ³ $J = 16.1$ Hz, 1H, Allyl-CH), 5.27 (m, 1H, Allyl-CH), 5.17 (ddt, ² $J = 2.6$ Hz, ³ $J = 10.6$ Hz, ⁴ $J = 1.2$ Hz, 1H, Allyl-CH), 4.55 (m, 2H, -COOCH₂CHCH₂), 4.10 (m, 1H, CH_α), 3.29 (m, 2H, -CH₂CH₂NMeAlloc), 2.87 (s, 3H, -RNCH₃Alloc), 1.82-1.45 (m, 4H, 2×CH₂), 1.43 (m, 18H, 2×*t*Bu), 1.33 (m, 2H, CH₂).

N_ϵ -(Allyloxycarbonyl)- N_ϵ -methyl-L-lysin (9) $C_{11}H_{20}N_2O_4$

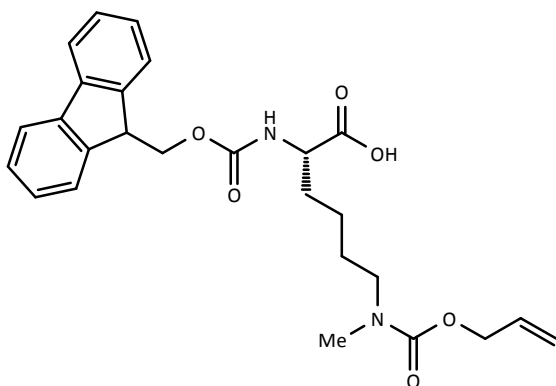
Exact Mass: 244.14

Mol. Wt.: 244.29

Zu 1.41 g (3.52 mmol) N_ϵ -(Allyloxycarbonyl)- N_α -(*tert*-butyloxycarbonyl)- N_ϵ -methyl-L-lysin-*tert*-butylester werden unter Rühren 12 mL einer Lösung, bestehend aus TFA, TIPS und H₂O (22:1:1 v/v/v) hinzugefügt. Nach drei Tagen werden die flüssigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Zum Entfernen der TFA durch Coevaporierung wird der Rückstand mit Toluol aufgenommen und das Lösungsmittel sogleich im Vakuum entfernt. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Das Rohprodukt (m = 1.48 g), mit der als TFA-Salz vorliegenden Titelverbindung, wird ohne Reinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet.

HPLC (10-100 %, 15 min.): $R_t = 5.62$ min.**MS** (ESI): $m/z = 245.1 [m+H]^+$, $267.1 [m+Na]^+$, $511.1 [2m+Na]^+$, $527.2 [2m+K]^+$.

**N_ϵ -(Allyloxycarbonyl)- N_α -(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)- N_ϵ -methyl-L-lysine
(10)**



$C_{26}H_{30}N_2O_6$

Exact Mass: 466.21

Mol. Wt.: 466.53

Zu 1.48 g des TFA-Salzes von N_ϵ -(Allyloxycarbonyl)- N_ϵ -methyl-L-lysine werden 20 mL NaHCO_3 -Lösung (ges.) gegeben. Unter Rühren werden langsam 1.31 g (1.1 eq., 3.87 mmol) Fmoc-ONSu, gelöst in 20 mL THF, getropft. Nach 24 h wird das THF im Vakuum entfernt und die wässrige Lösung mit HCl auf einen pH = 3-4 angesäuert. Die resultierende weiße Emulsion wird mit Essigsäureethylester dreimal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Sollten Verunreinigungen vorhanden sein, wird das Produkt säulenchromatographisch (Toluol/AcOH 4:1 v/v oder EE/Hex/AcOH 5:25:3 v/v/v) gereinigt. Es bleiben 1.54 g (3.31 mmol, 94 % d.Th.) der Titelverbindung.

DC (Hex/EE/AcOH 5:25:3 v/v/v): $R_f = 0.15$; (Tol/AcOH 4:1 v/v): $R_f = 0.21$.

HPLC (10-100 %, 30 min.): $R_t = 23.18$ min.

MS (ESI): $m/z = 467.1$ $[m+H]^+$, 489.2 $[m+Na]^+$, 505.2 $[m+K]^+$, 955.2 $[2m+Na]^+$, 971.2 $[2m+K]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 8.85$ (br, 1H, COOH), 7.73 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, $H_{\text{aromat.}}$), 7.58 (m, 2H, $H_{\text{aromat.}}$), 7.37 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $H_{\text{aromat.}}$), 7.28 (t, $^3J = 7.3$ Hz, 2H, $H_{\text{aromat.}}$), 5.88 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OCONMeR}$), 5.24 (d, $^3J = 17.1$ Hz, 1H, Allyl-CH), 5.16 (d, $^3J = 10.4$ Hz, 1H, Allyl-CH), 4.56 (d, $^3J = 4.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{OCONMeR}$), 4.36 (m, 3H, Fmoc- CH_2 , $\text{CH}\alpha$), 4.19 (t, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.26 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMeAlloc}$), 2.87 (s, 3H, NCH_3), 1.96-1.16 (m, 6H, $-\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 175.4$, 156.3, 143.7, 141.3, 132.9, 127.7, 127.0, 125.1, 120.0, 117.3, 67.1, 66.2, 53.7, 48.2, 47.1, 34.6, 33.8, 31.3, 27.3, 26.7, 21.8.

7.4. Synthese der *N*-methylierten MTII-Derivate

7.4.1. Liste der synthetisierten MTII-Derivate

Erläuterung:

Nachfolgend sind alle synthetisierten Derivate von MTII aufgelistet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Verbindungen in der folgenden Tabelle schematisch dargestellt, d.h. die Positionen der MTII-Sequenz (Ac-Nle⁴-cyclo(5β→10ε)(Asp⁵-His⁶-D-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Lys¹⁰)-NH₂), an denen die α-Aminosäuren durch α-NMe-Aminosäuren substituiert wurden, sind grau unterlegt. Weiterhin wurde im Falle des Lysins die Position der *N*-Methylierung durch ein tiefgestelltes „α“ und / oder „ε“ gekennzeichnet.

Tabelle 7-1: Synthetisierte MTII-Derivate. Die methylierten Positionen sind grau unterlegt sowie, im Falle des Lysins durch ein tiefgestelltes „α“ und / oder „ε“ gekennzeichnet. Siehe auch den obenstehenden Text für nähere Erläuterungen.

Verbindungsnummer	Sequenz
1 (MT-II)	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
52	Ac-Nle - Asp His D-Phe Arg Trp Lys - NH ₂
einfach-<i>N</i>-methylierte MTII-Derivate	
2	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys _α) NH ₂
33	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys _ε) NH ₂
3	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
4	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
5	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
6	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
49	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
50	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys) NH ₂
zweifach-<i>N</i>-methylierte MTII-Derivate	
34	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys _{α/ε}) NH ₂
35	Ac-Nle (Asp His D-Phe Arg Trp Lys _ε) NH ₂

36	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε) NH ₂
37	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε) NH ₂
38	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε) NH ₂
7	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
8	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
9	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
10	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
11	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys) NH ₂
12	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys) NH ₂
13	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys) NH ₂
14	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys) NH ₂
15	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys) NH ₂
16	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys) NH ₂

dreifach-*N*-methylierte Verbindungen

17	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
18	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
19	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
20	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
21	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
22	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
23	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
24	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
25	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
26	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂

vierfach-*N*-methylierte Verbindungen

27	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
28	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
29	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
30	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
31	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂

fünffach-*N*-methylierte Verbindungen

32	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α) NH ₂
----	--------	-------	-----	-------	-----	-----	------------------	-------------------

7.4.2. Darstellung der *N*-methylierten MTII-Derivate durch *N*-Methylierungen der Aminosäuren Nle⁴, Asp⁵, His⁶, D-Phe⁷, Arg⁸, Trp⁹ und Lys¹⁰ an der Festphase

Die Synthesen der MTII-Derivate mit *N*^α-Methylierungen am His⁶, D-Phe⁷, Arg⁸, Trp⁹ und Lys¹⁰ sind in Tabelle 7-2 schematisch zusammengefaßt. Sollen die Derivate zusätzlich α-*N*-methyliertes Nle⁴ oder Asp⁵ enthalten, wird nach Tabelle 7-3, und für die Synthese von Varianten mit *N*^ε-methyliertem Lysin, wird nach Tabelle 7-4 vorgegangen.

Tabelle 7-2: Operationsschema für die Synthese His⁶-, D-Phe⁷-, Arg⁸-, Trp⁹- und Lys¹⁰-*N*^α-methylierter MTII-Derivate

	Operation	AAV	Reagenzien
1	Belegen des Rink-Amid-Harzes mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH	1-R	PIP (20 Vol.-% in NMP) TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Lys(Alloc)-OH
2	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder			
3a	Kuppeln von Fmoc-Trp(Boc)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Trp(Boc)-OH
oder			
3b	<i>N</i> -Methylierung des N-Terminus'	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	H ₂ N-Lys(Alloc)-RINK	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
		7	β-ME, DBU, NMP
3c	Kuppeln von Fmoc-Trp(Boc)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Trp(Boc)-OH
4	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)

entweder

	Operation	AAV	Reagenzien
5a	Kuppeln von Fmoc-Arg(Pbf)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Arg(Pbf)-OH
	oder		
5b	<i>N</i> -Methylierung des N-Terminus' H ₂ N-Trp(Boc)-R	5 6 7	2-NBSCI, Collidin (NMP) MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF) β-ME, DBU, NMP
5c	Kuppeln von Fmoc-Arg(Pbf)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Arg(Pbf)-OH
6	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
	entweder		
7a	Kuppeln von Fmoc-D-Phe-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-D-Phe-OH
	oder		
7b	<i>N</i> -Methylierung des N-Terminus' H ₂ N-Arg(Pbf)-R	5 6 7	2-NBSCI, Collidin (NMP) MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF) β-ME, DBU, NMP
7c	Kuppeln von Fmoc-D-Phe-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-D-Phe-OH
8	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
	entweder		
9a	Kuppeln von Fmoc-His(Trt)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-His(Trt)-OH
	oder		
9b	<i>N</i> -Methylierung des N-Terminus' H ₂ N-D-Phe -R	5 6 7	2-NBSCI, Collidin (NMP) MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF) β-ME, DBU, NMP
9c	Kuppeln von Fmoc-His(Trt)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-His(Trt)-OH

7 Experimentalteil

	Operation	AAV	Reagenzien
10	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder			
11a	Kuppeln von Fmoc-Asp(OAllyl)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Asp(OAllyl)-OH
oder			
11b	N-Methylierung des N-Terminus'	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	H ₂ N-His(Trt)-R	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
		7	β-ME, DBU, NMP
11c	Kuppeln von Fmoc-Asp(OAllyl)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Asp(OAllyl)-OH

Soll Nle⁴ oder Asp⁵ N-methyliert werden, so wird mit Punkt 1 in Tabelle 7-3 fortgefahren.

12	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
13	Kuppeln von Fmoc-Nle-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Nle-OH
14	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
15	Acetylierung des N-Terminus'	8	DCM/Ac ₂ O/DIPEA (75:25:2.5 v/v/v)
16	Abspalten der Alloc- und Allyl-Schutzgruppen	9	Pd(PPh ₃) ₄ , PhSiH ₃
17	Cyclisierung	10-T	TBTU/HOBt/DIPEA
18	Abspaltung	11-R	TFA/TIPS/H ₂ O (95:2.5:2.5 v/v/v)

Um MTII-Derivate mit α-N-methyliertem Nle⁴ oder Asp⁵ zu synthetisieren, wird zunächst das Peptid mit dem gewünschten N-Methylierungsgrad bis zum Asp⁶

aufgebaut (Tabelle 7-1 bis Punkt 11a bzw. 11b/c). Danach verfährt man nach Tabelle 7-3, um Nle⁴ und Asp⁵ an der Festphase zu *N*-methylieren.

Tabelle 7-3: Operationsschema zur Synthese von an der Festphase *N*-methyliertem Nle- oder Asp-enhaltenen MTII-Derivaten.

Operation	AAV	Reagenzien
<i>Synthese von Fmoc-Asp(OAllyl)-NHR-His(Trt)-NHR-D-Phe-NHR-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Lys(Alloc)-RINK laut Tabelle 7-2 bis Schritt 11a bzw. 11b/c (mit R = H oder Me)</i>		
1	Abspalten der Alloc- und Allyl-Schutzgruppen	9 Pd(PPh ₃) ₄ , PhSiH ₃
2	Cyclisierung	10-T TBTU/HOBt/DIPEA
3	Entschützen des N-Terminus'	2 PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder		
4a	Kuppeln von Fmoc-Nle-OH	3-T TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Nle-OH
oder		
4b	<i>N</i> -Methylierung des N-Terminus'	5 2-NBSCI, Collidin (NMP)
	H ₂ N-Asp(OAllyl)-R	6 MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
		7 β-ME, DBU, NMP
4c	Kuppeln von Fmoc-Nle-OH	3-H HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Nle-OH
5	Entschützen des N-Terminus'	2 PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder		
6a	Acetylierung des N-Terminus'	8 DCM/Ac ₂ O/DIPEA (75:25:2.5 v/v/v)
oder		
6b	<i>N</i> -Methylierung des N-Terminus'	5 2-NBSCI, Collidin (NMP)
	H ₂ N-Asp(OAllyl)-R	6 MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
		7 β-ME, DBU, NMP

7 Experimentalteil

6c	Acetylierung des N-Terminus'	8	DCM/Ac ₂ O/DIPEA (75:25:2.5 v/v/v)
7	Abspaltung	11-R	TFA/TIPS/H ₂ O (95:2.5:2.5 v/v/v)

Für die Synthese von MTII-Derivaten mit N^ε-methylertem Lys¹⁰ wird Fmoc-Asp(*t*Bu)-OH verwendet und in Lösung cyclisiert (siehe Tabelle 7-4).

Tabelle 7-4: Operationsschema zur Festphasensynthese von N^ε-methylertem Lys-enthaltenen MTII-Derivaten.

	Operation	AAV	Reagenzien
1	Belegen des Rink-Amid-Harzes mit Fmoc-Lys(Alloc)-OH	1-R	PIP (20 Vol.-% in NMP) TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Lys(Alloc)-OH
2	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder			
3a	Kuppeln von Fmoc-Trp(Boc)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Trp(Boc)-OH
oder			
3b	N-Methylierung des N-Terminus'	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	H ₂ N-Lys(Alloc)-RINK	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
		7	β-ME, DBU, NMP
3c	Kuppeln von Fmoc-Trp(Boc)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Trp(Boc)-OH
4	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder			
5a	Kuppeln von Fmoc-Arg(Pbf)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Arg(Pbf)-OH
oder			

	Operation	AAV	Reagenzien
5b	<i>N</i> -Methylierung des	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	N-Terminus'	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
	H ₂ N-Trp(Boc)-R	7	β-ME, DBU, NMP
5c	Kuppeln von Fmoc-Arg(Pbf)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Arg(Pbf)-OH
6	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder			
7a	Kuppeln von	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA
	Fmoc-D-Phe-OH		Fmoc-D-Phe-OH
oder			
7b	<i>N</i> -Methylierung des	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	N-Terminus'	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
	H ₂ N-Arg(Pbf)-R	7	β-ME, DBU, NMP
7c	Kuppeln von Fmoc-D-Phe-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-D-Phe-OH
8	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
entweder			
9a	Kuppeln von	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA
	Fmoc-His(Trt)-OH		Fmoc-His(Trt)-OH
oder			
9b	<i>N</i> -Methylierung des	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	N-Terminus'	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
	H ₂ N-D-Phe -R	7	β-ME, DBU, NMP
9c	Kuppeln von Fmoc-His(Trt)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-His(Trt)-OH
10	Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)

7 Experimentalteil

Operation	AAV	Reagenzien
entweder		
11a Kuppeln von Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH
oder		
11b <i>N</i> -Methylierung des N-Terminus'	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
H ₂ N-His(Trt)-R	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
	7	β-ME, DBU, NMP
11c Kuppeln von Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH	3-H	HATU/HOAt/DIPEA Fmoc-Asp(<i>t</i> Bu)-OH
12 Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
13 Kuppeln von Fmoc-Nle-OH	3-T	TBTU/HOBt/DIPEA Fmoc-Nle-OH
14 Entschützen des N-Terminus'	2	PIP (20 Vol.-% in NMP)
15 Acetylierung des N- Terminus'	8	DCM/Ac ₂ O/DIPEA (75:25:2.5 v/v/v)
16 Abspalten der Lys-Alloc- Schutzgruppe	9	Pd(PPh ₃) ₄ , PhSiH ₃
17 <i>N</i> -Methylierung der Lys- Seitenkette	5	2-NBSCI, Collidin (NMP)
	6	MeOH, PPh ₃ , DIAD (THF)
	7	β-ME, DBU, NMP
18 Abspaltung	11-R	TFA/TIPS/H ₂ O (95:2.5:2.5 v/v/v)
19 Cyclisierung	10-D-b	DPPA/NaHCO ₃ in DMF

Nach der Cyclisierung der linearen Peptide werden die Rohprodukte in einer Lösung aus Acetonitril und H₂O (1:1 v/v) gelöst und anschließend mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt.

7.4.3. Darstellung der *N*-methylierten MT-II-Derivate unter Verwendung von Fmoc-NMe-Nle-OH, Fmoc-NMe-D-Phe-OH, *o*NBS-NMe-Trp-OH und Fmoc-Lys(NMeAlloc)-OH

Die Synthese der MTII-Derivate mit in Lösung vorsynthetisiertem, *N*^α-methyliertem D-Phe⁷ und Trp⁹ erfolgt wie in Tabelle 7-2 angegeben, jedoch mit folgenden Unterschieden:

- Fmoc-NMe-D-Phe-OH wird nach dem Kuppeln nach **AAV3-H** oder **AAV3-T**, je nachdem, ob der N-Terminus methyliert vorliegt oder nicht, nach **AAV2** Fmoc-entschützt. Das darauf folgende His⁶ wird nach **AAV3-H** gekuppelt
- *o*NBS-NMe-Trp-OH wird nach dem Kuppeln mit **AAV3-H** oder **AAV3-T**, je nachdem, ob der N-Terminus methyliert vorliegt oder nicht, nach **AAV7** *o*NBS-entschützt. Das darauf folgende Arg⁸ wird nach **AAV3-H** gekuppelt

MT-II-Derivate mit *N*^α-methyliertem Nle⁴ werden wie in Tabelle 7-3 dargestellt, jedoch wird in den Punkten 4a und 4c Fmoc-NMe-Nle-OH verwendet.

MT-II-Derivate mit *N*^ε-methyliertem Lys¹⁰ werden wie in Tabelle 7-2 dargestellt. Für die Cyclisierung des linearen Peptids (Punkt 17) wird **AAV10-H-a** verwendet.

Nach der Cyclisierung der linearen Peptide werden die Rohprodukte in einer Lösung aus Acetonitril und H₂O (1:1 v/v) gelöst und anschließend mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt.

7.4.4. Analytische Daten

Tabelle 7-5: Analytische Daten der synthetisierten MT-II-Derivate.

#	Sequenz									HPLC ^a t _R [min]	ESI-MS ^c [m+H] ⁺	
1	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	13.88	1024.5440
52	Ac-Nle	-	Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys	-	NH ₂	17.25 ^b	1042.9 ^d
2	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	14.39	1038.5593
33	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε)	NH ₂	22.16 ^b	1038.5593
3	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	13.29	1038.5592
4	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	12.64	1038.5592
5	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	12.45	1038.5593
6	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	14.15	1038.5592
49	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	24.04 ^b	1038.9 ^d
50	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	25.04 ^b	1038.9 ^d
34	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _{α/ε})	NH ₂	22.64	1052.9 ^d
35	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε)	NH ₂	21.40	1052.9 ^d
36	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε)	NH ₂	20.73	1052.9 ^d
37	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε)	NH ₂	21.04	1052.9 ^d
38	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _ε)	NH ₂	23.40	1052.9 ^d
7	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	14.44	1052.5751
8	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.76	1052.5750
9	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	13.02	1052.5750
10	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	14.19	1052.5749
11	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	12.06	1052.5750
12	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	12.24	1052.5749
13	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	13.79	1052.5749
14	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	12.54	1052.5749
15	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	12.26	1052.5749
16	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys)	NH ₂	13.51	1052.5749
17	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.03	1066.5904
18	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	13.38	1066.5905
19	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	14.22	1066.5905
20	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.61	1066.5906
21	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.74	1066.5908
22	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.97	1066.5905
23	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.78	1066.5903
24	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.20	1066.5905
25	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	13.77	1066.5906
26	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.49	1066.5905
27	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	13.11	1080.6061
28	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	11.89	1080.6062
29	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	13.92	1080.6060
30	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.90	1080.6060
31	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.47	1080.6059
32	Ac-Nle	(Asp	His	D-Phe	Arg	Trp	Lys _α)	NH ₂	12.98	1094.6210

^a RP-HPLC mit C18-Säule, Gradient Acetonitril 10% bis 100% in 30 min.^b RP-HPLC mit C18-Säule, Gradient Acetonitril 10% bis 50% in 30 min.^c Ergebnisse ermittelt durch HR-ESI-MS

^d Ergebnisse ermittelt durch ESI-MS

Die Ausbeuten der in dieser Arbeit synthetisierten MT-II-Derivate lagen zwischen 3.1 % und 42.7 % bezogen auf die theoretische Belegung der Festphase. Weitere analytische Daten finden sich in den *supporting information* von DOEDENS *et al.* ^[267]

7.5. Synthese der *N*-methylierten *cyclo*(RGDfV)-Derivate

Für den Aufbau der linearen Peptide wurde Fmoc-Val-OH, Fmoc-dPhe-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH verwendet. Fmoc-NMe-dPhe-OH und Fmoc-NMe-Val-OH wurden nach **AAV12** in Lösung synthetisiert. Fmoc-NMe-Gly-OH wurde kommerziell erworben. Fmoc-NMe-Asp(OtBu)-OH und Fmoc-Arg(Pbf)-OH wurden nach **AAV5-7** an der Festphase methyliert. Die weiteren verwendeten Operationen sind in Tabelle 7-6 zusammengefasst. Nach der Cyclisierung der linearen Peptide werden die Rohprodukte in einer Lösung aus Acetonitril und H₂O (1:1 v/v) gelöst und anschließend mittels präparativer HPLC von Verunreinigungen getrennt. Die Ausbeuten der in dieser Arbeit synthetisierten *cyclo*(RGDfV)-Derivate lagen zwischen 1.0 % und 7.0 % bezogen auf die theoretische Belegung der Festphase.

7 Experimentaltteil

Tabelle 7-6: Zusammenfassung der verwendeten Operationen für den Aufbau der verschiedenen *cyclo(RGDfV)*-Derivate

Verbindungsnummer	Peptidsequenz	Erfolgreicher Aufbau	Verwendete Kupplungsreaktionen	Abspaltung von der Festphase	Cyclisierung	Abspaltung der Seitenskettschutzgruppen	HPLC ^a t _R [min]	ESI-MS [m+H] ⁺
39	R G D f V	R G D f V		AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	17.63	603.4
40	R G D f V	R G D f V	Für Kupplungen	AAV11-T-a	AAV10-H-b	AAV14-b	18.80	603.4
41	R G D f V	R G D f V	an	AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	19.55	603.4
42	R G D f V	D f V R G	nichtmethylierte	AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	18.86	603.5
43	R G D f V	R G D f V	Aminosäuren:	AAV11-T-a	AAV10-H-b	AAV14-b	17.88	603.6
44	R G D f V	R G D f V	AAV3-T	AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	18.97	603.6
45	R G D f V	D f V R G		AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	20.34	603.4
46	R G D f V	R G D f V	Für Kupplungen	AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	17.42	603.4
47	R G D f V	G D f V R	an methylierte	AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	18.55	603.5
48	R G D f V	V R G D f	Aminosäuren:	AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-c	7.69 ^b	603.4
			AAV3					
49	R G D f V	R G D f V		AAV11-T-a	AAV10-D-a	AAV14-a	19.39	617.4

^a RP-HPLC mit C18-Säule, Gradient Acetonitril 10% bis 50% in 30 min.

^b RP-HPLC mit C18-Säule, Gradient Acetonitril 10% bis 100% in 15 min.

7.6. Durchführung der Tests der enzymatischen Stabilität von MT-II-Derivaten in menschlichem Blutserum

Es wird jeweils 1.0 mg der zu untersuchenden Substanz in 1.0 mL menschliches Blutserum gegeben. Die Lösung wird unter sanftem Schütteln bei 37.0 °C inkubiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten werden 0.1 mL Lösung zu 0.5 mL wässriger EDTA-Lösung gegeben und die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Falls keine sofortige Aufarbeitung möglich ist, wird sie bei -80 °C gelagert. Zu der wieder aufgetauten Probenlösung werden 0.5 mL Acetonitril gegeben. Die ausfallenden Niederschläge werden durch Filtration von der Lösung getrennt, welche direkt in ein Probengläschen gegeben wird. Die Lösung wird mittels HPLC untersucht und die Integrale der Substanzpeaks mit denen von reinen Substanzlösungen gleicher Konzentration verglichen, die nicht mit menschlichem Blutserum kontaminiert wurden.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Arkin, M. R.; Wells, J. A. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 301-17.
- (2) Gadek, T. R.; McDowell, R. S. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1.
- (3) Toogood, P. L. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543-58.
- (4) Gante, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *33*, 1699.
- (5) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 512.
- (6) Gurrath, M.; Müller, G.; Kessler, H.; Aumailley, M.; Timpl, R. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 911-21.
- (7) Aumailley, M.; Gurrath, M.; Müller, G.; Calvete, J.; Timpl, R.; Kessler, H. *FEBS Lett.* **1991**, *291*, 50-4.
- (8) Weide, T.; Modlinger, A.; Kessler, H. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *1*.
- (9) Kessler, H.; Kutscher, B. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *5*, 993.
- (10) Kessler, H.; Kutscher, B. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *5*, 914.
- (11) Kessler, H.; Gratias, R.; Hessler, G.; Gurrath, M.; Müller, G. *Pure & Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1201.
- (12) Haubner, R.; Finsinger, D.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1374.
- (13) Shemyakin, M. M.; Ovchinnikov, Y. A.; Ivanov, V. T. *Angew Chem Int Ed Engl* **1969**, *8*, 492-9.
- (14) Wermuth, J.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1328.
- (15) Kessler, H.; Diefenbach, B.; Finsinger, D.; Geyer, A.; Gurrath, M.; Goodman, S. L.; Hölzemann, G.; Haubner, R.; Jonczyk, A.; Müller, G.; vonRoedern, E. G.; Wermuth, J. *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 155.

- (16) Turker, R. K.; Hall, M. M.; Yamamoto, M.; Sweet, C. S.; Bumpus, F. M. *Science* **1972**, *177*, 1203-5.
- (17) Hansch, C.; Maloney, P. P.; Fujita, T. *Nature* **1962**, *194*, 178.
- (18) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- (19) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3.
- (20) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55-68.
- (21) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H. Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-23.
- (22) Böhm, H. J. *Nachr. Chem. Tech. Lab* **1993**, *41*, 711.
- (23) Fusetani, N.; Matsunaga, S. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1793-1806.
- (24) Davidson, B. S. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1771-1791.
- (25) Wipf, P. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2115-2134.
- (26) Ruegger, A.; Kuhn, M.; Lichti, H.; Loosli, H. R.; Huguenin, R.; Quiquerez, C.; von Wartburg, A. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075-92.
- (27) Matthews, D. M.; Gandy, R. H.; Taylor, E.; Burston, D. *Clin. Sci. (Lond)* **1979**, *56*, 15-23.
- (28) Wright, J. J.; Blatner, G.; Cheson, B. D. *Oncology (Williston Park)* **1999**, *13*, 68-70, 75.
- (29) Sterner, O.; Etzel, W.; Mayer, A.; Anke, H. *Natural Product Letters* **1997**, *10*, 33-38.
- (30) Cruz, L. J.; Insua, M. M.; Baz, J. P.; Trujillo, M.; Rodriguez-Mias, R. A.; Oliveira, E.; Giralt, E.; Albericio, F.; Canedo, L. M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3335-8.

- (31) Haviv, F.; Fitzpatrick, T. D.; Swenson, R. E.; Nichols, C. J.; Mort, N. A.; Bush, E. N.; Diaz, G.; Bammert, G.; Nguyen, A.; Rhutasel, N. S.; et al. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 363-9.
- (32) Cody, W. L.; He, J. X.; Reily, M. D.; Haleen, S. J.; Walker, D. M.; Reyner, E. L.; Stewart, B. H.; Doherty, A. M. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2228-40.
- (33) Bach, A. C.; Espina, J. R.; Jackson, S. A.; Stouten, P. F. W.; Duke, J. L.; Mousa, S. A.; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293-294.
- (34) Pierson, M. E.; Comstock, J. M.; Simmons, R. D.; Kaiser, F.; Julien, R.; Zongrone, J.; Rosamond, J. D. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4302-7.
- (35) Rajeswaran, W. G.; Hocart, S. J.; Murphy, W. A.; Taylor, J. E.; Coy, D. H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1305-11.
- (36) Laufer, R.; Wormser, U.; Friedman, Z. Y.; Gilon, C.; Chorev, M.; Selinger, Z. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1985**, *82*, 7444-8.
- (37) Samanen, J.; Ali, F.; Romoff, T.; Calvo, R.; Sorenson, E.; Vasko, J.; Storer, B.; Berry, D.; Bennett, D.; Strohsacker, M.; et al. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3114-25.
- (38) Dechantsreiter, M. A.; Planker, E.; Mathä, B.; Lohof, E.; Holzemann, G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033-40.
- (39) Barker, P. L.; Bullens, S.; Bunting, S.; Burdick, D. J.; Chan, K. S.; Deisher, T.; Eigenbrot, C.; Gadek, T. R.; Gantzios, R.; Lipari, M. T.; et al. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2040-8.
- (40) Chatterjee, J.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1331-42.
- (41) Biron, E.; Chatterjee, J.; Ovadia, O.; Langenegger, D.; Brueggen, J.; Hoyer, D.; Schmid, H. A.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 2595-9.
- (42) Smith, J. M.; Hows, J. M.; Gordon-Smith, E. C. *J. Clin. Pathol.* **1983**, *36*, 41-3.

- (43) Sangalli, L.; Bortolotti, A.; Jiritano, L.; Bonati, M. *Drug. Metab. Dispos.* **1988**, *16*, 749-53.
- (44) Sugano, H.; Higaki, K.; Miyoshi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1973**, *46*, 226-230.
- (45) Dechantsreiter, M. A.; Mathä, B.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Kessler, H. In *Peptides 1996*; Ramage, R., Epton, R., Eds.; Mayflower Scientific: Kingswinford, 1996, p 329.
- (46) Piriou, F.; Lintner, K.; Femandjian, S.; Fromageot, P.; Khosla, M. C.; Smeby, R. R.; Bumpus, F. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1980**, *77*, 82-6.
- (47) Gordon, D. J.; Tappe, R.; Meredith, S. C. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*, 37-55.
- (48) Hess, S.; Ovadia, O.; Shalev, D. E.; Senderovich, H.; Qadri, B.; Yehezkel, T.; Salitra, Y.; Sheynis, T.; Jelinek, R.; Gilon, C.; Hoffman, A. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6201-11.
- (49) Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 219-&.
- (50) Fischer, E.; Bergmann, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1913**, *398*, 96-124.
- (51) Fischer, E.; Lipschitz, W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1915**, *48*, 360-378.
- (52) Coggins, J. R.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1971**, *49*, 1968.
- (53) McDermott, J. R.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 1915, 2555, 2562.
- (54) Benoiton, N. L.; Kuroda, K.; Cheung, S. T.; Chen, F. M. F. *Can. J. Biochem.* **1979**, *57*, 776.
- (55) Hlaváček, J.; Poduska, K.; Sorm, F.; Slama, K. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1976**, *41*, 2079.
- (56) Hlaváček, J.; Fric, I.; Budesinsky, M.; Blaha, K. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1988**, *53*, 2473.
- (57) Olsen, R. K. *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1912-5.

- (58) Okamoto, K.; Abe, H.; Kuromizu, K.; Izumiya, N. *Mem. Fac. Sci. Kyushu Univ. Ser. C* **1974**, *9*, 131.
- (59) O'Donnell, M. J.; Bruder, W. A.; Daugherty, B. W.; Liu, D.; Wojciechowski, K. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3651.
- (60) O'Donnell, M. J.; Polt, R. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2663.
- (61) Peter, H.; Brugger, M.; Schreiber, J.; Eschenmoser, A. *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 577.
- (62) Brockmann, H.; Lackner, H. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 353.
- (63) Quitt, P.; Hellerbach, J.; Vogel, K. *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 327.
- (64) Chruma, J. J.; Sames, D.; Polt, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5085.
- (65) Ramanjulu, J. M.; Joullié, M. M. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1379.
- (66) Ohfuné, Y.; Kurokawa, N.; Higuchi, N.; Saito, M.; Hashimoto, M.; Tanaka, T. *Chemistry Letters* **1984**, 441-444.
- (67) Freidinger, R. M.; Hinkle, J. S.; Perlow, D. S.; Arison, B. H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77-81.
- (68) Ben-Ishai, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5736.
- (69) Itoh, M. *Chem. Pharm. Bull* **1969**, *17*, 1679.
- (70) Reddy, K. L.; Dress, K. R.; Sharples, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3667-3670.
- (71) Williams, R. M.; Yuan, C. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6190-6193.
- (72) Grieco, P. A.; Bahsas, A. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5746.
- (73) Effenberger, F.; Burkhard, U.; Willfahrt, J. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 314.
- (74) Oppolzer, W.; Cintas-Moreno, P.; Tamura, O.; Cardinaux, F. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 187-196.

- (75) Aurelio, L.; Brownlee, R. T. C.; Hughes, A. B.; Sleebs, B. E. *Aust. J. Chem.* **2000**, *53*, 425.
- (76) Zhang, S.; Govender, T.; Norstrom, T.; Arvidsson, P. I. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6918-20.
- (77) Govender, T.; Arvidsson, P. I. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 1691-1694.
- (78) Biron, E.; Kessler, H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5183-9.
- (79) Milne, H. B.; Peng, C. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 639-644.
- (80) Cheung, S. T.; Benoiton, N. L. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 916-921.
- (81) Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301-2302.
- (82) Miller, S. C.; Scanlan, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2690-2691.
- (83) Yang, L.; Chiu, K. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7307-7310.
- (84) Fukuyama, T.; Jow, C.-K.; Cheung, M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 6373-6374.
- (85) Chatterjee, J. Dissertation, Technische Universität, 2008.
- (86) Gilon, C.; Dechantsreiter, M. A.; Burkhart, F.; Fiedler, A.; Kessler, H. *Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry*; Georg Thieme: Stuttgart, 2002.
- (87) García-Echeverría, C. *THL* **1997**, *38*, 8933-8934.
- (88) Barany, G.; Kneib-Cordonier, N.; Mullen, D. G. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*, 705-39.
- (89) Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
- (90) Carpino, L. A.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2279 - 2282.
- (91) Klose, J.; El-Faham, A.; Henklein, P.; Carpino, L. A.; Bienert, M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2045-2048.

- (92) Solé, N. A.; Barany, G. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5399-5403.
- (93) Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. A. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2739-2742.
- (94) Bollhagen, R.; Schmiedeberger, M.; Barlos, K.; Grell, E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, *22*, 2559-2560.
- (95) Bicknell, A. B. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 692-9.
- (96) Smith, A. I.; Funder, J. W. *Endocr. Rev.* **1988**, *9*, 159-79.
- (97) Lacaze-Masmonteil, T.; de Keyzer, Y.; Luton, J. P.; Kahn, A.; Bertagna, X. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1987**, *84*, 7261-5.
- (98) Smyth, D. G.; Zakarian, S. *Nature* **1980**, *288*, 613-5.
- (99) Mains, R. E.; Eipper, B. A. *Ciba Found. Symp.* **1981**, *81*, 32-54.
- (100) Boileau, G.; Lariviere, N.; Hsi, K. L.; Seidah, N. G.; Chretien, M. *Biochemistry* **1982**, *21*, 5341-6.
- (101) Hadley, M. E.; Haskell-Luevano, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *885*, 1-21.
- (102) Castrucci, A. M.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1984**, *55*, 104-11.
- (103) Hruby, V. J.; Wilkes, B. C.; Hadley, M. E.; Al-Obeidi, F.; Sawyer, T. K.; Staples, D. J.; de Vaux, A. E.; Dym, O.; Castrucci, A. M.; Hintz, M. F.; et al. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2126-30.
- (104) Crine, P.; Gianoulakis, C.; Seidah, N. G.; Gossard, F.; Pezalla, P. D.; Lis, M.; Chretien, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1978**, *75*, 4719-23.
- (105) Guillemin, R.; Schally, A. V.; Lipscomb, H. S.; Andersen, R. N.; Long, J. M. *Endocrinology* **1962**, *70*, 471-7.
- (106) Turner, J. D.; Keith, A. B.; Smith, A. I.; McDermott, J. R.; Biggins, J. A.; Edwardson, J. A. *Regul. Pept.* **1983**, *5*, 283-93.

(107) Schauer, E.; Trautinger, F.; Kock, A.; Schwarz, A.; Bhardwaj, R.; Simon, M.; Ansel, J. C.; Schwarz, T.; Luger, T. A. *J. Clin. Invest.* **1994**, *93*, 2258-62.

(108) Scholzen, T. E.; Kalden, D. H.; Brzoska, T.; Fisbeck, T.; Fastrich, M.; Schiller, M.; Bohm, M.; Schwarz, T.; Armstrong, C. A.; Ansel, J. C.; Luger, T. A. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 1021-8.

(109) Wintzen, M.; Yaar, M.; Burbach, J. P.; Gilcrest, B. A. *J. Invest. Dermatol.* **1996**, *106*, 673-8.

(110) Grigorakis, S. I.; Anastasiou, E.; Dai, K.; Souvatzoglou, A.; Alevizaki, M. *Eur. J. Endocrinol.* **2000**, *142*, 533-6.

(111) Raffin-Sanson, M. L.; Massias, J. F.; Ankotche, A.; Coste, J.; de Keyzer, Y.; Oliver, C.; Dumont, C.; Cabrol, D.; Ferre, F.; Bertagna, X. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1999**, *50*, 85-94.

(112) Smith, A. I.; Cheng, M. C.; Funder, J. W. *FEBS Lett.* **1985**, *185*, 109-11.

(113) Smyth, D. G.; Darby, N. J.; Maruthainar, K. *Neuroendocrinology* **1988**, *47*, 317-22.

(114) Lyons, P. D.; Blalock, J. E. *J. Neuroimmunol.* **1997**, *78*, 47-56.

(115) Wilczynski, A. M.; Joseph, C. G.; Haskell-Luevano, C. *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 545-56.

(116) Ollmann, M. M.; Wilson, B. D.; Yang, Y. K.; Kerns, J. A.; Chen, Y.; Gantz, I.; Barsh, G. S. *Science* **1997**, *278*, 135-8.

(117) Shutter, J. R.; Graham, M.; Kinsey, A. C.; Scully, S.; Luthy, R.; Stark, K. L. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 593-602.

(118) Wilson, B. D.; Ollmann, M. M.; Barsh, G. S. *Mol. Med. Today* **1999**, *5*, 250-6.

(119) Chai, B. X.; Neubig, R. R.; Millhauser, G. L.; Thompson, D. A.; Jackson, P. J.; Barsh, G. S.; Dickinson, C. J.; Li, J. Y.; Lai, Y. M.; Gantz, I. *Peptides* **2003**, *24*, 603-9.

(120) Haskell-Luevano, C.; Monck, E. K. *Regul. Pept.* **2001**, *99*, 1-7.

- (121) Nijenhuis, W. A.; Oosterom, J.; Adan, R. A. *Mol. Endocrinol.* **2001**, *15*, 164-71.
- (122) Wilson, B. D.; Ollmann, M. M.; Kang, L.; Stoffel, M.; Bell, G. I.; Barsh, G. S. *Hum. Mol. Genet.* **1995**, *4*, 223-30.
- (123) Chhajlani, V.; Wikberg, J. E. *FEBS Lett.* **1992**, *309*, 417-20.
- (124) Mountjoy, K. G.; Robbins, L. S.; Mortrud, M. T.; Cone, R. D. *Science* **1992**, *257*, 1248-51.
- (125) Gether, U. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 90-113.
- (126) Holst, B.; Schwartz, T. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *994*, 1-11.
- (127) Miserey-Lenkei, S.; Parnot, C.; Bardin, S.; Corvol, P.; Clauser, E. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5891-901.
- (128) Strader, C. D.; Fong, T. M.; Tota, M. R.; Underwood, D.; Dixon, R. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 101-32.
- (129) Schioth, H. B.; Phillips, S. R.; Rudzish, R.; Birch-Machin, M. A.; Wikberg, J. E.; Rees, J. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *260*, 488-91.
- (130) Haskell-Luevano, C.; Sawyer, T. K.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Bikker, J. A.; Humblet, C.; Gantz, I.; Hruby, V. J. *Drug. Des. Discov.* **1996**, *14*, 197-211.
- (131) Prusis, P.; Frandberg, P. A.; Muceniece, R.; Kalvinsh, I.; Wikberg, J. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *210*, 205-10.
- (132) Prusis, P.; Schioth, H. B.; Muceniece, R.; Herzyk, P.; Afshar, M.; Hubbard, R. E.; Wikberg, J. E. *J. Mol. Graph. Model.* **1997**, *15*, 307-17, 334.
- (133) Yang, Y. K.; Dickinson, C.; HaskellLuevano, C.; Gantz, I. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23000-23010.
- (134) Qanbar, R.; Bouvier, M. *Pharmacol. Ther.* **2003**, *97*, 1-33.
- (135) Schulein, R.; Hermosilla, R.; Oksche, A.; Dehe, M.; Wiesner, B.; Krause, G.; Rosenthal, W. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 525-35.

- (136) Luttrell, L. M.; Lefkowitz, R. J. *J. Cell. Sci.* **2002**, *115*, 455-65.
- (137) Pitcher, J. A.; Freedman, N. J.; Lefkowitz, R. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 653-92.
- (138) Lerner, A. B.; McGuire, J. S. *Nature* **1961**, *189*, 176-9.
- (139) Chhajlani, V. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 73-80.
- (140) Star, R. A.; Rajora, N.; Huang, J.; Stock, R. C.; Catania, A.; Lipton, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, *92*, 8016-20.
- (141) Neumann Andersen, G.; Nagaeva, O.; Mandrika, I.; Petrovska, R.; Muceniece, R.; Mincheva-Nilsson, L.; Wikberg, J. E. *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, *126*, 441-6.
- (142) Catania, A.; Rajora, N.; Capsoni, F.; Minonzio, F.; Star, R. A.; Lipton, J. M. *Peptides* **1996**, *17*, 675-9.
- (143) Becher, E.; Mahnke, K.; Brzoska, T.; Kalden, D. H.; Grabbe, S.; Luger, T. A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *885*, 188-95.
- (144) Salazar-Onfray, F.; Lopez, M.; Lundqvist, A.; Aguirre, A.; Escobar, A.; Serrano, A.; Korenblit, C.; Petersson, M.; Chhajlani, V.; Larsson, O.; Kiessling, R. *Br. J. Cancer* **2002**, *87*, 414-22.
- (145) Luger, T. A.; Scholzen, T.; Brzoska, T.; Becher, E.; Slominski, A.; Paus, R. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1998**, *840*, 381-94.
- (146) Manna, S. K.; Aggarwal, B. B. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 2873-80.
- (147) Schiöth, H. B.; Chhajlani, V.; Muceniece, R.; Klusa, V.; Wikberg, J. E. *Life Sci.* **1996**, *59*, 797-801.
- (148) Boston, B. A.; Cone, R. D. *Endocrinology* **1996**, *137*, 2043-50.
- (149) Kiwaki, K.; Levine, J. A. *J. Comp. Physiol. [B]* **2003**, *173*, 675-8.
- (150) Buckley, D. I.; Ramachandran, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1981**, *78*, 7431-5.

- (151) Xia, Y.; Wikberg, J. E. *Cell Tissue Res.* **1996**, *286*, 63-8.
- (152) Gantz, I.; Konda, Y.; Tashiro, T.; Shimoto, Y.; Miwa, H.; Munzert, G.; Watson, S. J.; DelValle, J.; Yamada, T. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 8246-50.
- (153) Roselli-Rehfuss, L.; Mountjoy, K. G.; Robbins, L. S.; Mortrud, M. T.; Low, M. J.; Tatro, J. B.; Entwistle, M. L.; Simerly, R. B.; Cone, R. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1993**, *90*, 8856-60.
- (154) Mountjoy, K. G.; Mortrud, M. T.; Low, M. J.; Simerly, R. B.; Cone, R. D. *Mol. Endocrinol.* **1994**, *8*, 1298-308.
- (155) Getting, S. J. *Trends Pharmacol. Sci.* **2002**, *23*, 447-9.
- (156) Low, M. J. *J. Endocrinol. Invest.* **2004**, *27*, 95-100.
- (157) Van der Ploeg, L. H.; Martin, W. J.; Howard, A. D.; Nargund, R. P.; Austin, C. P.; Guan, X.; Drisko, J.; Cashen, D.; Sebhat, I.; Patchett, A. A.; Figueroa, D. J.; DiLella, A. G.; Connolly, B. M.; Weinberg, D. H.; Tan, C. P.; Palyha, O. C.; Pong, S. S.; MacNeil, T.; Rosenblum, C.; Vongs, A.; Tang, R.; Yu, H.; Sailer, A. W.; Fong, T. M.; Huang, C.; Tota, M. R.; Chang, R. S.; Stearns, R.; Tamvakopoulos, C.; Christ, G.; Drazen, D. L.; Spar, B. D.; Nelson, R. J.; MacIntyre, D. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2002**, *99*, 11381-6.
- (158) Gantz, I.; Miwa, H.; Konda, Y.; Shimoto, Y.; Tashiro, T.; Watson, S. J.; DelValle, J.; Yamada, T. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 15174-9.
- (159) Butler, A. A.; Cone, R. D. *Neuropeptides* **2002**, *36*, 77-84.
- (160) Chen, W.; Kelly, M. A.; Opitz-Araya, X.; Thomas, R. E.; Low, M. J.; Cone, R. D. *Cell* **1997**, *91*, 789-98.
- (161) Cone, R. D. *The Melanocortin Receptors* New Jersey, 2000.
- (162) Martin, W. J.; MacIntyre, D. E. *Eur. Urol.* **2004**, *45*, 706-13.
- (163) Wikberg, J. E. S. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2001**, *11*, 61-76.
- (164) Lu, D.; Willard, D.; Patel, I. R.; Kadwell, S.; Overton, L.; Kost, T.; Luther, M.; Chen, W.; Woychik, R. P.; Wilkison, W. O.; et al. *Nature* **1994**, *371*, 799-802.

- (165) Thody, A. J. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *885*, 217-29.
- (166) Caldwell, H. K.; Lepri, J. J. *Chem. Senses* **2002**, *27*, 91-4.
- (167) Morgan, C.; Cone, R. D. *Behav. Genet.* **2006**, *36*, 291-300.
- (168) Thiboutot, D.; Sivarajah, A.; Gilliland, K.; Cong, Z.; Clawson, G. *J. Invest. Dermatol.* **2000**, *115*, 614-9.
- (169) van der Kraan, M.; Adan, R. A.; Entwistle, M. L.; Gispen, W. H.; Burbach, J. P.; Tatro, J. B. *Endocrinology* **1998**, *139*, 2348-55.
- (170) Zhang, L.; Li, W. H.; Anthonavage, M.; Eisinger, M. *Peptides* **2006**, *27*, 413-20.
- (171) Slominski, A.; Pawelek, J. *Clinics in Dermatology* **1998**, *16*, 503-515.
- (172) Chakraborty, A. K.; Funasaka, Y.; Slominski, A.; Ermak, G.; Hwang, J.; Pawelek, J. M.; Ichihashi, M. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **1996**, *1313*, 130-138.
- (173) Corre, S.; Primot, A.; Sviderskaya, E.; Bennett, D. C.; Vaulont, S.; Goding, C. R.; Galibert, M. D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51226-51233.
- (174) Scott, M. C.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Kadekaro, A. L.; Kobayashi, N.; Groden, J.; Kavanagh, R.; Takakuwa, T.; Virador, V.; Hearing, V. J.; Abdel-Malek, Z. A. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 2349-2355.
- (175) Funasaka, Y.; Chakraborty, A. K.; Hayashi, Y.; Komoto, M.; Ohashi, A.; Nagahama, M.; Inoue, Y.; Pawelek, J.; Ichihashi, M. *Br. J. Dermatol.* **1998**, *139*, 216-224.
- (176) Martinez-Esparza, M.; Jimenez-Cervantes, C.; Beermann, F.; Aparicio, P.; Lozano, J. A.; Garcia-Borron, J. C. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3967-72.
- (177) Martinez-Esparza, M.; Jimenez-Cervantes, C.; Solano, F.; Lozano, J. A.; Garcia-Borron, J. C. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *255*, 139-46.
- (178) Jimenez-Cervantes, C.; Martinez-Esparza, M.; Perez, C.; Daum, N.; Solano, F.; Garcia-Borron, J. C. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 2335-2344.

- (179) Nishigori, C.; Hattori, Y.; Toyokuni, S. *Antioxid. Redox. Signal* **2004**, *6*, 561-70.
- (180) Sanchez Mas, J.; Olivares Sanchez, C.; Ghanem, G.; Haycock, J.; Lozano Teruel, J. A.; Garcia-Borron, J. C.; Jimenez-Cervantes, C. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 6133-41.
- (181) Frandberg, P. A.; Doufexis, M.; Kapas, S.; Chhajlani, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *281*, 851-7.
- (182) Sanchez-Mas, J.; Sanchez-Laorden, B. L.; Guillo, L. A.; Jimenez-Cervantes, C.; Garcia-Borron, J. C. *Peptides* **2005**, *26*, 1848-57.
- (183) Holst, B.; Elling, C. E.; Schwartz, T. W. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47662-70.
- (184) Sanchez-Laorden, B. L.; Sanchez-Mas, J.; Martinez-Alonso, E.; Martinez-Menarguez, J. A.; Garcia-Borron, J. C.; Jimenez-Cervantes, C. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 172-81.
- (185) Beaumont, K. A.; Newton, R. A.; Smit, D. J.; Leonard, J. H.; Stow, J. L.; Sturm, R. A. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 2145-54.
- (186) Angers, S.; Salahpour, A.; Bouvier, M. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 409-35.
- (187) Kroeger, K. M.; Pflieger, K. D.; Eidne, K. A. *Front. Neuroendocrinol.* **2003**, *24*, 254-78.
- (188) Milligan, G. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1-7.
- (189) Mandrika, I.; Petrovska, R.; Wikberg, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 349-54.
- (190) Biebermann, H.; Krude, H.; Elsner, A.; Chubanov, V.; Gudermann, T.; Gruters, A. *Diabetes* **2003**, *52*, 2984-8.
- (191) Zanna, P. T.; Sanchez-Laorden, B. L.; Perez-Oliva, A. B.; Turpin, M. C.; Herraiz, C.; Jimenez-Cervantes, C.; Garcia-Borron, J. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 211-6.

- (192) Holder, J. R.; Haskell-Luevano, C. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 325-56.
- (193) Haskell-Luevano, C.; Cone, R. D.; Monck, E. K.; Wan, Y. P. *Biochemistry* **2001**, *40*, 6164-79.
- (194) Wilczynski, A.; Wang, X. S.; Joseph, C. G.; Xiang, Z.; Bauzo, R. M.; Scott, J. W.; Sorensen, N. B.; Shaw, A. M.; Millard, W. J.; Richards, N. G.; Haskell-Luevano, C. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2194-207.
- (195) Lu, D.; Vage, D. I.; Cone, R. D. *Mol. Endocrinol.* **1998**, *12*, 592-604.
- (196) Kim, C. S.; Lee, S. H.; Kim, R. Y.; Kim, B. J.; Li, S. Z.; Lee, I. H.; Lee, E. J.; Lim, S. K.; Bae, Y. S.; Lee, W.; Baik, J. H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 31310-7.
- (197) Konda, Y.; Gantz, I.; DelValle, J.; Shimoto, Y.; Miwa, H.; Yamada, T. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 13162-6.
- (198) Wachira, S. J.; Hughes-Darden, C. A.; Taylor, C. V.; Ochillo, R.; Robinson, T. J. *Neuropeptides* **2003**, *37*, 201-10.
- (199) Hoogduijn, M. J.; McGurk, S.; Smit, N. P.; Nibbering, P. H.; Ancans, J.; van der Laarse, A.; Thody, A. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *290*, 844-50.
- (200) Elliott, R. J.; Szabo, M.; Wagner, M. J.; Kemp, E. H.; MacNeil, S.; Haycock, J. W. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *122*, 1010-9.
- (201) Eves, P.; Haycock, J.; Layton, C.; Wagner, M.; Kemp, H.; Szabo, M.; Morandini, R.; Ghanem, G.; Garcia-Borron, J. C.; Jimenez-Cervantes, C.; Mac Neil, S. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 2004-15.
- (202) Mountjoy, K. G.; Kong, P. L.; Taylor, J. A.; Willard, D. H.; Wilkison, W. O. *Physiol. Genomics* **2001**, *5*, 11-9.
- (203) Shinyama, H.; Masuzaki, H.; Fang, H.; Flier, J. S. *Endocrinology* **2003**, *144*, 1301-14.
- (204) Baig, A. H.; Swords, F. M.; Noon, L. A.; King, P. J.; Hunyady, L.; Clark, A. J. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 44792-7.
- (205) Varga, J. M.; Moellmann, G.; Fritsch, P.; Godawska, E.; Lerner, A. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1976**, *73*, 559-62.

- (206) Adams, G.; Olivier, G. W.; Branch, S. K.; Moss, S. H.; Notarianni, L. J.; Pouton, C. W. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *680*, 440-1.
- (207) Siegrist, W.; Eberle, A. N. *J. Recept. Res.* **1993**, *13*, 263-81.
- (208) Wong, W.; Minchin, R. F. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28*, 1223-32.
- (209) Slominski, A.; Wortsman, J.; Luger, T.; Paus, R.; Solomon, S. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 979-1020.
- (210) Böhm, M.; Luger, T. A.; Tobin, D. J.; Garcia-Borrón, J. C. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126*, 1966-1975.
- (211) Garcia-Borrón, J. C.; Sanchez-Laorden, B. L.; Jimenez-Cervantes, C. *Pigment Cell. Res.* **2005**, *18*, 393-410.
- (212) Castrucci, A. M.; Hadley, M. E.; Sawyer, T. K.; Wilkes, B. C.; al-Obeidi, F.; Staples, D. J.; de Vaux, A. E.; Dym, O.; Hintz, M. F.; Riehm, J. P.; et al. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1989**, *73*, 157-63.
- (213) Haskell-Luevano, C.; Sawyer, T. K.; Hendrata, S.; North, C.; Panahinia, L.; Stum, M.; Staples, D. J.; Castrucci, A. M.; Hadley, M. F.; Hruby, V. J. *Peptides* **1996**, *17*, 995-1002.
- (214) Holder, J. R.; Bauzo, R. M.; Xiang, Z.; Haskell-Luevano, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2801-10.
- (215) Holder, J. R.; Bauzo, R. M.; Xiang, Z.; Haskell-Luevano, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3073-81.
- (216) Holder, J. R.; Xiang, Z.; Bauzo, R. M.; Haskell-Luevano, C. *Peptides* **2003**, *24*, 73-82.
- (217) Holder, J. R.; Xiang, Z.; Bauzo, R. M.; Haskell-Luevano, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5736-44.
- (218) Grieco, P.; Balse, P. M.; Weinberg, D.; MacNeil, T.; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4998-5002.

(219) Sawyer, T. K.; Sanfilippo, P. J.; Hruby, V. J.; Engel, M. H.; Heward, C. B.; Burnett, J. B.; Hadley, M. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1980**, *77*, 5754-8.

(220) Hadley, M. E.; Dorr, R. T. *Peptides* **2006**, *27*, 921-30.

(221) Al-Obeidi, F.; Castrucci, A. M.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2555-61.

(222) Al-Obeidi, F.; Hadley, M. E.; Pettitt, B. M.; Hruby, V. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3413-3416.

(223) Dorr, R. T.; Lines, R.; Levine, N.; Brooks, C.; Xiang, L.; Hruby, V. J.; Hadley, M. E. *Life Sci.* **1996**, *58*, 1777-84.

(224) Diamond, L. E.; Earle, D. C.; Rosen, R. C.; Willett, M. S.; Molinoff, P. B. *Int. J. Impot. Res.* **2004**, *16*, 51-9.

(225) Rosen, R. C.; Diamond, L. E.; Earle, D. C.; Shadiack, A. M.; Molinoff, P. B. *Int. J. Impot. Res.* **2004**, *16*, 135-42.

(226) Diamond, L. E.; Earle, D. C.; Garcia, W. D.; Spana, C. *Urology* **2005**, *65*, 755-9.

(227) Diamond, L. E.; Earle, D. C.; Heiman, J. R.; Rosen, R. C.; Perelman, M. A.; Harning, R. *J. Sex. Med.* **2006**, *3*, 628-38.

(228) Hruby, V. J.; Lu, D.; Sharma, S. D.; Castrucci, A. L.; Kesterson, R. A.; Al-Obeidi, F. A.; Hadley, M. E.; Cone, R. D. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3454-61.

(229) Yan, L. Z.; Flora, D.; Edwards, P.; Smiley, D. L.; Emmerson, P. J.; Hsiung, H. M.; Galski, R.; Hertel, J.; Heiman, M. L.; Husain, S.; O'Brien, T. P.; Kahl, S. D.; Zhang, L. S.; DiMarchi, R. D.; Mayer, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4611-4614.

(230) Cheung, A. W.; Qi, L.; Gore, V.; Chu, X. J.; Bartkovitz, D.; Kurylko, G.; Swistok, J.; Danho, W.; Chen, L.; Yagaloff, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5504-8.

(231) Sebat, I. K.; Martin, W. J.; Ye, Z.; Barakat, K.; Mosley, R. T.; Johnston, D. B.; Bakshi, R.; Palucki, B.; Weinberg, D. H.; MacNeil, T.; Kalyani, R. N.; Tang, R.; Stearns, R. A.; Miller, R. R.; Tamvakopoulos, C.; Strack, A. M.; McGowan, E.;

Cashen, D. E.; Drisko, J. E.; Hom, G. J.; Howard, A. D.; MacIntyre, D. E.; van der Ploeg, L. H.; Patchett, A. A.; Nargund, R. P. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4589-93.

(232) Cepoi, D.; Phillips, T.; Cismowski, M.; Goodfellow, V. S.; Ling, N.; Cone, R. D.; Fan, W. *Brain Res.* **2004**, *1000*, 64-71.

(233) Nordheim, U.; Nicholson, J. R.; Dokladny, K.; Dunant, P.; Hofbauer, K. G. *Peptides* **2006**, *27*, 438-43.

(234) Ye, Z.; Guo, L.; Barakat, K. J.; Pollard, P. G.; Palucki, B. L.; Sebat, I. K.; Bakshi, R. K.; Tang, R.; Kalyani, R. N.; Vongs, A.; Chen, A. S.; Chen, H. Y.; Rosenblum, C. I.; MacNeil, T.; Weinberg, D. H.; Peng, Q.; Tamvakopoulos, C.; Miller, R. R.; Stearns, R. A.; Cashen, D. E.; Martin, W. J.; Metzger, J. M.; Strack, A. M.; MacIntyre, D. E.; Van der Ploeg, L. H.; Patchett, A. A.; Wyvratt, M. J.; Nargund, R. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3501-5.

(235) Tian, X.; Mishra, R. K.; Switzer, A. G.; Hu, X. E.; Kim, N.; Mazur, A. W.; Ebetino, F. H.; Wos, J. A.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Sheldon, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4668-73.

(236) Nakazato, A.; Ishii, T.; Nozawa, H. 2005; Vol. JP 2005035983.

(237) Pontillo, J.; Tran, J. A.; Markison, S.; Joppa, M.; Fleck, B. A.; Marinkovic, D.; Arellano, M.; Tucci, F. C.; Lanier, M.; Nelson, J.; Saunders, J.; Hoare, S. R.; Foster, A. C.; Chen, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2541-6.

(238) Tucci, F. C.; White, N. S.; Markison, S.; Joppa, M.; Tran, J. A.; Fleck, B. A.; Madan, A.; Dyck, B. P.; Parker, J.; Pontillo, J.; Arellano, L. M.; Marinkovic, D.; Jiang, W.; Chen, C. W.; Gogas, K. R.; Goodfellow, V. S.; Saunders, J.; Foster, A. C.; Chen, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4389-95.

(239) Pontillo, J.; Marinkovic, D.; Tran, J. A.; Arellano, M.; Fleck, B. A.; Wen, J.; Tucci, F. C.; Nelson, J.; Saunders, J.; Foster, A. C.; Chen, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4615-8.

(240) Chen, C. W.; Tran, J. A.; Jiang, W.; Tucci, F. C.; Arellano, M.; Wen, J.; Fleck, B. A.; Marinkovic, D.; White, N. S.; Pontillo, J.; Saunders, J.; Madan, A.; Foster, A. C.; Chen, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4800-3.

(241) Doss, G. A.; Miller, R. R.; Zhang, Z.; Teffera, Y.; Nargund, R. P.; Palucki, B.; Park, M. K.; Tang, Y. S.; Evans, D. C.; Baillie, T. A.; Stearns, R. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18*, 271-6.

(242) Cain, J. P.; Mayorov, A. V.; Cai, M.; Wang, H.; Tan, B.; Chandler, K.; Lee, Y.; Petrov, R. R.; Trivedi, D.; Hruby, V. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5462-7.

(243) Conde-Frieboes, K. W.; Ankersen, M.; Sensfuss, U.; Wulff, B. S.; Thogersen, H.; Wieland, H.; Arndt, K. 2004; Vol. WO 2004048345 A2.

(244) Nozawa, D.; Okubo, T.; Ishii, T.; Kakinuma, H.; Chaki, S.; Okuyama, S.; Nakazato, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1989-2005.

(245) Poitout, L.; Brault, V.; Sackur, C.; Bernetiere, S.; Camara, J.; Plas, P.; Roubert, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4464-70.

(246) Sharma, S.; Shi, Y.-Q.; Wu, Z.; Rajpurohit, R. 2004; Vol. 2004/0152134 A1.

(247) Tian, X.; Chen, X.; Gan, L.; Hayes, J. C.; Switzer, A. G.; Solinsky, M. G.; Ebetino, F. H.; Wos, J. A.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Crossdoersen, D.; Sheldon, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1721-5.

(248) Tian, X.; Field, T.; Mazur, A. W.; Ebetino, F. H.; Wos, J. A.; Crossdoersen, D.; Pinney, B. B.; Sheldon, R. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2819-23.

(249) Tian, X.; Field, T. B.; Switzer, A. G.; Mazur, A. W.; Ebetino, F. H.; Wos, J. A.; Berberich, S. M.; Jayasinghe, L. R.; Obringer, C. M.; Dowty, M. E.; Pinney, B. B.; Farmer, J. A.; Crossdoersen, D.; Sheldon, R. J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4745-61.

(250) Ujjainwalla, F.; Warner, D.; Walsh, T. F.; Wyvratt, M. J.; Zhou, C.; Yang, L.; Kalyani, R. N.; MacNeil, T.; Van der Ploeg, L. H.; Rosenblum, C. I.; Tang, R.; Vongs, A.; Weinberg, D. H.; Goulet, M. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4431-5.

(251) Vos, T.; Patane, M.; Solomon, M.; Blackburn, C.; Danca, M. 2004; Vol. WO2004050610 A2.

(252) Vos, T. J.; Balani, S.; Blackburn, C.; Chau, R. W.; Danca, M. D.; Drabic, S. V.; Farrer, C. A.; Patane, M. A.; Stroud, S. G.; Yowe, D. L.; Claiborne, C. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2302-5.

(253) Vos, T. J.; Caracoti, A.; Che, J. L.; Dai, M.; Farrer, C. A.; Forsyth, N. E.; Drabic, S. V.; Horlick, R. A.; Lamppu, D.; Yowe, D. L.; Balani, S.; Li, P.; Zeng, H.; Joseph, I. B.; Rodriguez, L. E.; Maguire, M. P.; Patane, M. A.; Claiborne, C. F. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1602-4.

(254) Grieco, P.; Gitu, P. M.; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* **2001**, *57*, 250-6.

(255) Chevallet, P.; Garrouste, P.; Malawska, B.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7409-7412.

(256) Teixido, M.; Albericio, F.; Giralt, E. *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 153-66.

(257) Cai, M.; Mayorov, A. V.; Ying, J.; Stankova, M.; Trivedi, D.; Cabello, C.; Hruby, V. J. *Peptides* **2005**, *26*, 1481-5.

(258) Cai, M.; Mayorov, A. V.; Cabello, C.; Stankova, M.; Trivedi, D.; Hruby, V. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1839-48.

(259) Cai, M.; Cai, C.; Mayorov, A. V.; Xiong, C.; Cabello, C. M.; Soloshonok, V. A.; Swift, J. R.; Trivedi, D.; Hruby, V. J. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 116-31.

(260) Haskell-Luevano, C.; Miwa, H.; Dickinson, C.; Hruby, V. J.; Yamada, T.; Gantz, I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 1137-42.

(261) Laufer, R.; Gilon, C.; Chorev, M.; Selinger, Z. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 10257-63.

(262) Chen, M.; Cai, M.; Aprahamian, C. J.; Georgeson, K. E.; Hruby, V.; Harmon, C. M.; Yang, Y. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21712-9.

(263) Grieco, P.; Cai, M.; Han, G.; Trivedi, D.; Campiglia, P.; Novellino, E.; Hruby, V. J. *Peptides* **2007**, *28*, 1191-6.

(264) Kessler, H.; Griesinger, C.; Lautz, J.; Müller, A.; van Gusteren, W. F.; Berendsen, H. J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3393-3396.

- (265) Heller, M.; Sukopp, M.; Tsomaia, N.; John, M.; Mierke, D. F.; Reif, B.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13806-14.
- (266) Snyder, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2393-2400.
- (267) Doedens, L.; Opperer, F.; Cai, M.; Beck, J. G.; Dedek, M.; Palmer, E.; Hruby, V. J.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8115-28.
- (268) Venkatachalam, C. M. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1425-36.
- (269) Ying, J.; Kover, K. E.; Gu, X.; Han, G.; Trivedi, D. B.; Kavarana, M. J.; Hruby, V. J. *Biopolymers* **2003**, *71*, 696-716.
- (270) Frandberg, P. A.; Xu, X.; Chhajlani, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *236*, 489-92.
- (271) Alghisi, G. C.; Ruegg, C. *Endothelium* **2006**, *13*, 113-35.
- (272) Isacke, C. M.; Horton, M. A. *The Adhesion Molecules Fact Book (2nd ed)* London, 2000.
- (273) Tamkun, J. W.; DeSimone, D. W.; Fonda, D.; Patel, R. S.; Buck, C.; Horwitz, A. F.; Hynes, R. O. *Cell* **1986**, *46*, 271-82.
- (274) Hynes, R. O. *Cell* **1987**, *48*, 549-54.
- (275) Suzuki, S.; Argraves, W. S.; Pytela, R.; Arai, H.; Krusius, T.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1986**, *83*, 8614-8.
- (276) Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Nature* **1984**, *309*, 30-3.
- (277) Plow, E. F.; Haas, T. A.; Zhang, L.; Loftus, J.; Smith, J. W. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785-8.
- (278) Hynes, R. O. *Cell* **1992**, *69*, 11-25.
- (279) Eble, J. A.; Eble, J. A., Ed.; Springer-Verlag: Heidelberg, 1997, p 1-40.
- (280) Takeichi, M. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 237-52.
- (281) Takeichi, M. *Science* **1991**, *251*, 1451-5.

- (282) Hunkapiller, T.; Hood, L. *Adv. Immunol.* **1989**, *44*, 1-63.
- (283) Bevilacqua, M.; Butcher, E.; Furie, B.; Gallatin, M.; Gimbrone, M.; Harlan, J.; Kishimoto, K.; Lasky, L.; McEver, R.; et al. *Cell* **1991**, *67*, 233.
- (284) Köpper, S. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1995**, *43*, 421.
- (285) Travis, J. *Science* **1993**, *260*, 906-908.
- (286) Albelda, S. M.; Buck, C. A. *Faseb J.* **1990**, *4*, 2868-80.
- (287) Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M. D. *Science* **1987**, *238*, 491-7.
- (288) Weller, T.; Alig, L.; Beresini, M.; Blackburn, B.; Bunting, S.; Hadvary, P.; Muller, M. H.; Knopp, D.; Levet-Trafit, B.; Lipari, M. T.; Modi, N. B.; Muller, M.; Refino, C. J.; Schmitt, M.; Schonholzer, P.; Weiss, S.; Steiner, B. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 3139-47.
- (289) Storgard, C. M.; Stupack, D. G.; Jonczyk, A.; Goodman, S. L.; Fox, R. I.; Cheresch, D. A. *J. Clin. Invest.* **1999**, *103*, 47-54.
- (290) Hammes, H. P.; Brownlee, M.; Jonczyk, A.; Sutter, A.; Preissner, K. T. *Nat. Med.* **1996**, *2*, 529-33.
- (291) Denhardt, D. T.; Guo, X. *Faseb J.* **1993**, *7*, 1475-82.
- (292) Grano, M.; Zigrino, P.; Colucci, S.; Zambonin, G.; Trusolino, L.; Serra, M.; Baldini, N.; Teti, A.; Marchisio, P. C.; Zallone, A. Z. *Exp. Cell. Res.* **1994**, *212*, 209-18.
- (293) Noiri, E.; Gailit, J.; Sheth, D.; Magazine, H.; Gurrath, M.; Muller, G.; Kessler, H.; Goligorsky, M. S. *Kidney Int.* **1994**, *46*, 1050-8.
- (294) Horton, M. A. *Exp. Nephrol.* **1999**, *7*, 178-84.
- (295) Kilger, G.; Holzmann, B. *J. Mol. Med.* **1995**, *73*, 347-54.
- (296) Springer, T. A. *Cell* **1994**, *76*, 301-14.
- (297) D'Amore, P. A.; Thompson, R. W. *Annu. Rev. Physiol.* **1987**, *49*, 453-64.

- (298) Folkman, J. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27-31.
- (299) van der Flier, A.; Sonnenberg, A. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*, 285-98.
- (300) Arnaout, M. A.; Goodman, S. L.; Xiong, J. P. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2002**, *14*, 641-51.
- (301) Samanen, J.; Jonak, Z.; Rieman, D.; Yue, T. L. *Curr. Pharm. Des.* **1997**, *3*, 545-584.
- (302) Humphries, M. J. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 311-39.
- (303) Heckmann, D., Technische Universität München, 2007.
- (304) Muller, G.; Gurrath, M.; Kessler, H. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 709-30.
- (305) Cox, D.; Aoki, T.; Seki, J.; Motoyama, Y.; Yoshida, K. *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 195-228.
- (306) Burke, R. D. *Int. Rev. Cytol.* **1999**, *191*, 257-84.
- (307) Pytela, R.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E. *Cell* **1985**, *40*, 191-8.
- (308) Schneider, G.; Fechner, U. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 649-63.
- (309) Ruoslahti, E. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12*, 697-715.
- (310) Kantlehner, M. Dissertation, TU München, 2000.
- (311) Verrier, S.; Pallu, S.; Bareille, R.; Jonczyk, A.; Meyer, J.; Dard, M.; Amedee, J. *Biomaterials* **2002**, *23*, 585-96.
- (312) Irvine, D. J.; Hue, K. A.; Mayes, A. M.; Griffith, L. G. *Biophys J* **2002**, *82*, 120-32.
- (313) Arnold, M.; Cavalcanti-Adam, E. A.; Glass, R.; Blummel, J.; Eck, W.; Kantlehner, M.; Kessler, H.; Spatz, J. P. *Chemphyschem* **2004**, *5*, 383-8.
- (314) Pankov, R.; Yamada, K. M. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3861-3.

- (315) Pfaff, M. *Integrin-Ligand Interaction*; (ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, 1997.
- (316) Marugan, J. J.; Manthey, C.; Anaclerio, B.; Lafrance, L.; Lu, T.; Markotan, T.; Leonard, K. A.; Crysler, C.; Eisennagel, S.; Dasgupta, M.; Tomczuk, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 926-34.
- (317) Gibson, C.; Sulyok, G. A.; Hahn, D.; Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Kessler, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 165-169.
- (318) Goodman, S. L.; Holzemann, G.; Sulyok, G. A.; Kessler, H. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045-51.
- (319) Hutchinson, J. H.; Halczenko, W.; Brashear, K. M.; Breslin, M. J.; Coleman, P. J.; Duong le, T.; Fernandez-Metzler, C.; Gentile, M. A.; Fisher, J. E.; Hartman, G. D.; Huff, J. R.; Kimmel, D. B.; Leu, C. T.; Meissner, R. S.; Merkle, K.; Nagy, R.; Pennypacker, B.; Perkins, J. J.; Prueksaritanont, T.; Rodan, G. A.; Varga, S. L.; Wesolowski, G. A.; Zartman, A. E.; Rodan, S. B.; Duggan, M. E. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4790-8.
- (320) Hartman, G. D.; Egbertson, M. S.; Halczenko, W.; Laswell, W. L.; Duggan, M. E.; Smith, R. L.; Naylor, A. M.; Manno, P. D.; Lynch, R. J.; Zhang, G.; et al. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4640-2.
- (321) Smallheer, J. M.; Weigelt, C. A.; Woerner, F. J.; Wells, J. S.; Daneker, W. F.; Mousa, S. A.; Wexler, R. R.; Jadhav, P. K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 383-7.
- (322) Kessler, H. In *Trends in Drug Research*; Classen, V., Ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1990, p 73 -84.
- (323) Haubner, R.; Gartias, R.; Diefenbach, B.; Goodman, S. L.; Jonczyk, A.; Kessler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461.
- (324) Haubner, R. Dissertation, Technische Universität, 1995.
- (325) Finsinger, D. Dissertation, Technische Universität, 1997.
- (326) Thumshirn, G. Dissertation, TU München, 2003.

- (327) Humphrey, J. M.; Chamberlin, A. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2243-2266.
- (328) Xiong, J. P.; Stehle, T.; Zhang, R.; Joachimiak, A.; Frech, M.; Goodman, S. L.; Arnaout, M. A. *Science* **2002**, *296*, 151-5.
- (329) Doedens, L. Diplomarbeit, Technische Universität München, 2004.
- (330) Urban, J.; Vaisar, T.; Shen, R.; Lee, M. S. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1996**, *47*, 182-9.
- (331) Capasso, S.; Vergara, A.; Mazzarella, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1990-1995.
- (332) Lloyd-Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E.; CRC: Boca Raton, FL, 1997.
- (333) Gisin, B. F.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 3102-6.
- (334) Khosla, M. C.; Smeby, R. R.; Bumpus, F. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4721-4.
- (335) Mas-Moruno, C.; Cruz, L. J.; Mora, P.; Francesch, A.; Messeguer, A.; Perez-Paya, E.; Albericio, F. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2443-9.