

Technische Universität München

Department Chemie

**Funktionalisierung künstlicher Oberflächen  
mit Integrinliganden zur Stimulierung  
integrinvermittelter Zelladhäsion**

Jörg Auernheimer

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. H. Kessler  
2. Univ.Prof. Dr. O. Nuyken, i. R.

Die Dissertation wurde am 16.08.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 22.09.2005 angenommen.



What we know is a drop. What we don't know is an ocean.

(Isaac Newton)



Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl II für Organische Chemie der Technischen Universität München in der Zeit von Mai 2002 bis April 2005 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kessler angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Kessler danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die Aufnahme in seinem Arbeitskreis als Grundlage für die Zulassung zur Promotion über das Sondereignungsverfahren für FH-Absolventen. Neben der Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen waren es vor allem die große wissenschaftliche Freiheit, die Schaffung eines exzellenten Arbeitsklimas sowie die aufgeschlossene und konstruktive Kritikultur, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Mein weiterer Dank gilt:

- meinen Laborkollegen Mona Wolff, Dr. Eric Biron und Dr. Martin Sukopp für das ausgezeichnete Laborklima und ihre stete Hilfsbereitschaft,
- Mona Wolff für die exzellente Durchführung zahlreicher Synthesen und die zahlreichen anderen Dinge wie abspülen, destillieren und das Labor sauber halten,
- Johanna Förster, Albert Schröder und meinen Praktikanten Irina Wasilewitsch, Anne Wolter, Veronika Kuscha, Hildegard Mack, Timm Haug und Stephan Huber für die tatkräftige Unterstützung bei der Synthese,
- Gabi Chmel für die Durchführung zahlreicher Zelladhäsionstests,
- meinen „Biomaterial“-kollegen Dr. Ulrich Hersel, Doris Kaufmann, Dr. Mónica López und Dr. Claudia Dahmen für die gute Zusammenarbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die kurzweiligen Fahrten und Aufenthalte im Rahmen von Tagungen und Projekttreffen,
- Prof. Dr. Thomas Herold, dass er mein Interesse an organischer Chemie geweckt hat und die Förderung während meiner Zeit in Nürnberg,
- Dr. Sonia Cesana und Andrea Baumer für die gute Zusammenarbeit auch außerhalb des SFB 563,
- Dr. Alexandra Schambony, Dr. Hartmut Gliemann und Sviatlana Kalinina für die gute Zusammenarbeit bei den PDIT-funktionalisieren Peptiden,
- Dr. Roland Haubner, Dr. Margret Schottelius und Wolfgang Linke von der Abteilung Nuklearmedizin des Klinikums r. d. Isar für die Unterstützung bei der Radiomarkierung,

- Dr. Martin Sukopp, Dr. Eric Biron, Timo Weide, Dominik Heckmann und Sebastian Knörr für den wissenschaftlichen Austausch und die stete Diskussionsbereitschaft,
- Dr. Daniel Zukowski und Dr. Anja Enderle von *Biomet Deutschland GmbH* für die gute Zusammenarbeit,
- Maria Kranawetter für die gute Zusammenarbeit im HPLC-Bereich, sowie die Durchführung zahlreicher HPLC-Trennungen,
- Dr. Rainer Haeßner und Alex Frenzel für die Hilfe bei allen Hardware- und Softwarefragen,
- Prof. Dr. Joachim Spatz und Marco Arnold (Universität Heidelberg) für die Beschichtung der mit Goldpunkten nanostrukturierten Oberflächen und die Durchführung von Zelladhäsionstests,
- Dr. Dirk Finsinger und Dr. Simon L. Goodman von *Merck KGaA*, Darmstadt für die Bestimmung vieler IC<sub>50</sub>-Werte in Rezeptorassays,
- Burghard Cordes für die Aufnahme der ESI-MS-Spektren, Helmut Krause und Dr. Peter Spiteller für die Aufnahme der EI-MS-Spektren,
- Evelyn Bruckmaier und Marianne Machule für die Unterstützung im Kampf gegen die Bürokratie,
- Axel Meyer, Dr. Armin Modlinger, Karin Auernheimer und Dominik Heckmann fürs Korrekturlesen,
- allen Mitgliedern des JCF München für viel Spaß während der letzten 3 Jahre,
- allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern für das hervorragende Arbeitsklima und die vielen Unternehmungen außerhalb der Universität: Kino- und Konzertbesuche, Spieleabende, die AK-Fahrten und verschiedenste (Geburtstags-) Feiern.

Vor allem aber danke ich meiner Familie für die Freiheiten und die Unterstützung all meiner bisherigen Ziele und Unternehmungen. Schließlich danke ich Alex für sein entgegengebrachtes Vertrauen und Verständnis sowie seinem stetem Bemühen mich an andere schöne Dinge neben der Chemie zu erinnern.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Biologischer Hintergrund</b> .....	<b>5</b>
2.1 Aufbau der Integrinfamilie .....	6
2.2 Integrinliganden und Ligandenbindung .....	9
2.3 Integrinvermittelte Signaltransduktion .....	15
2.4 Zelladhäsion .....	16
2.5 Integrine im Knochenstoffwechsel .....	20
2.6 Immobilisierung von Integrinliganden auf künstlichen Oberflächen .....	21
2.6.1 Grundlagen Biomaterialien .....	21
2.6.2 Beschichtung von Oberflächen mit künstlichen Integrinliganden .....	23
2.7 Bestimmung der Zahl adhärenter Zellen .....	35
2.8 Prinzipien der Peptidsynthese .....	30
<b>3 Peptidische Integrinliganden: Design, Synthese und biol. Evaluierung</b> .....	<b>37</b>
3.1 Allgemeine Strategie .....	37
3.2 Zyklische RGD-Peptide mit Phosphonatanker .....	38
3.3 Zyklische RGD-Peptide mit Benzophenonanker .....	45
3.4 Zyklische RGD-Peptide mit photolabilem Anker .....	47
3.5 Zyklische RGD-Peptide mit photoschaltbarem <i>Linker</i> .....	50
3.6 Zyklische RGD-Peptide mit Biotinanker .....	54
3.7 RGD-Peptide mit Isothiocyanatanker .....	57
3.8 Multimere, cyclische RGD-Peptide .....	63
3.9 Andere Zelladhäsionssequenzen .....	66
3.9.1 Lineare Lamininsequenzen mit Acrylatanker .....	66
3.9.2 Zyklische LDT-Peptide mit Acrylatanker .....	67
3.9.3 Zyklische RGD-Peptide als Thrombocyten-Liganden .....	69
3.9.4 Selektivitätsvergleich der verschiedenen Adhäsionssequenzen .....	70
3.10 Bestimmung der Oberflächenbelegung .....	71
3.10.1 PMMA-Oberflächen .....	73
3.10.2 Siliziumoberflächen .....	74

## Inhaltsverzeichnis

---

3.10.3 Titanoberflächen .....	75
<b>4 Nichtpeptidische Integrinliganden: Synthese und biol. Evaluierung.....</b>	<b>77</b>
4.1 Allgemeine Strategie.....	78
4.2 Synthese substituierter <i>Spacer</i> bausteine.....	82
4.2.1 <i>Spacer</i> bausteine zum Anbinden an Oberflächen .....	82
4.2.2 <i>Spacer</i> bausteine zur Radiomarkierung .....	85
4.3 Oberflächenadhäsive Mimetika .....	86
4.4 Biologische Evaluierung.....	88
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>6 Experimenteller Teil.....</b>	<b>95</b>
6.1 Material und Methoden .....	95
6.2 Liste der synthetisierten Verbindungen .....	98
6.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	102
6.4 Arbeitsvorschriften Peptide .....	106
6.5 Arbeitsvorschriften RGD-Mimetika .....	136
6.6 Zelladhäsionstests .....	150
<b>7 Literatur .....</b>	<b>153</b>

### Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
ADP	Adenosindiphosphat
Ahx	$\epsilon$ -Aminohexansäure
Boc	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl
bs	breites Singulett
BSA	Rinderserum Albumin
c	zyklo, cyclo
CDI	<i>N,N'</i> -Carbonyldiimidazol
CVFF	<i>consistent valence force field</i>
d	Dublett
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DC	Dünnschichtchromatographie, Dünnschichtchromatogramm
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
ECM	extrazelluläre Matrix
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochlorid
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
eq.	Moläquivalent
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization</i> Massenspektroskopie
FA	fokaler Adhäsionskomplex
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FN	Fibronectin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat

## Abkürzungsverzeichnis

---

HBTU	O-Benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-uronium-hexafluorophosphat
Hegas	20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxaecosansäure
HFIP	Hexafluorisopropanol
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOObt	3-Hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i> )-one
HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ivDde	4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene
J	Kopplungskonstante
<i>m</i>	meta
m	Multipllett
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption ionisation</i>
MAPK	Mitogenaktivierte Protein Kinase
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MIDAS	<i>metal-ion-dependent adhesion site</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	Nucleare Magnet Resonanz
<i>o</i>	ortho
<i>p</i>	para
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-solfonyl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PDIT	<i>p</i> -Phenylendiisothiocyanat
Ph	Phenyl
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PPA	Phosphonopropionsäure
ppm	<i>parts per million</i>
PyBOP	1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluoro-phosphate
Rf	Retentionsfaktor (DC)

## Abkürzungsverzeichnis

---

RP	<i>reversed-phase</i>
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit (HPLC)
s	Singulett
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
t	Triplett
TBTU	O-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-tetrafluoroborat
<sup>t</sup> Bu	<i>tert.</i> -Butyl
TCP	Tritylchlorid-Polystyrol
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
TFFH	Fluoro- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylformamidinium-hexafluorophosphat
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMSBr	Trimethylsilylbromid
TOTU	O-(Cyano(ethoxycarbonyl)methylenamino)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborat
Trt	Trityl
TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett
Z	Benzoxycarbonyl
z	Ladung

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von *Chemical Abstracts* (Chemical Abstracts, 'Index Guide', 77, 210.) und der IUPAC-IUB-Kommission empfohlenen Richtlinien (*Eur. J. Biochem.* **1984**, 138, 9-37). Fachausdrücke, die aus anderen Sprachen übernommen wurden, sind kursiv geschrieben.

Die Nummerierung der Endverbindungen erfolgt nach einem kombinierten Buchstaben-Ziffern-System: C, C<sup>L</sup> und C<sup>G</sup> für Zyklopeptide, M für Mimetika, *Linker* werden nach Art des Ankers bezeichnet: P für Phosphonatgruppen im Anker, A olefinische Anker, B für Benzophenonanker, T für Thiolanker, I für Isothiocyanatanker, AZO für *Linker* mit Azobenzoleinheit und Acrylamidanker. Die Ziffer ist eine fortlaufende Nummer innerhalb einer *Linker*gruppe – beginnend mit 1. Ein Stern „\*“ kennzeichnet Peptide bzw. Mimetika mit Schutzgruppen.



## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

### Artikel

- U. Magdolen, J. Auernheimer, C. Dahmen, J. Schauwecker, J. Tübel, R. Gradinger, H. Kessler, M. Schmitt, P. Diehl. Growth promoting in vitro effect of synthetic cyclic RGD-peptides on human osteoblast-like cells attached to cancellous bone. *Thromb. Haemost.*, *submitted*.
- S. Cesana, J. Auernheimer, R. Jordan, H. Kessler, O. Nuyken. First Poly(2-oxazoline)s with Pendant Amino Groups. *Macromol. Chem. Phys.*, *accepted*.
- J. Auernheimer, H. Kessler. Benzylprotected aromatic phosphonic acids for anchoring peptides on titanium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, *in press*.
- E. A. Cavalcanti-Adam, A. Micoulet, J. Blümmel, J. Auernheimer, H. Kessler, J. P. Spatz. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *Eur. J. Cell Biol.*, *in press*.
- A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler. Targeting RGD Recognizing Integrins: Drug Development, Biomaterial Research, Tumor Imaging and Targeting. *Curr. Pharm. Design*, *in press*.
- J. Auernheimer, C. Dahmen, U. Hersel, A. Bausch, H. Kessler. Photo Switched Cell Adhesion on Surfaces with RGD Peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, *in press*.
- J. Auernheimer, D. Zukowski, C. Dahmen, M. Kantlehner, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler. Titanium Implant Materials with Improved Biocompatibility through Coating with Phosphonate-Anchored Cyclic RGD-Peptides. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2034-2040.
- C. Dahmen, J. Auernheimer, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler. Verbesserte Implantatmaterialien durch die Beschichtung mit hochspezifischen, nichtpeptidischen Integrinliganden. *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6818-6821.

### Patent

- B. Nies, A. Enderle, H. Kessler, J. Auernheimer, U. Hersel, C. Dahmen. Peptid- und Peptidmimetika-Derivate mit Integrin-Inhibitor-Eigenschaften III. (Merck Patent GmbH) DE 103 25 049.2, EP 154 80 29; CA Abstract Number 142:79911.

### Posterpräsentationen

- J. Auernheimer, C. Dahmen, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler. Non-peptidic RGD mimetics for stimulated cell adhesion on biomaterials. *2<sup>nd</sup> Summer School "Medicinal Chemistry"*, Regensburg, Okt. 5. - 7., **2004**.
- J. Auernheimer, C. Dahmen, U. Hersel, A. Enderle, H. Kessler. Cyclic RGD-Peptides with Aromatic Phosphonate-Anchors for Stimulated Cell Adhesion on Titanium. *3<sup>rd</sup> International and 28<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Parg, CZ, Sept. 5. - 10., **2004**.
- J. Auernheimer, C. Dahmen, M. Kantlehner, A. Bausch, H. Kessler. Photochemical Switching of Cellular Adhesion - Attachment and Detachment of Modified RGD Ligands. *GDCb-JCF Frühjahrssymposium*, Heidelberg, Mär. 31. - Apr. 03, **2004**.
- J. Auernheimer, U. Hersel, C. Dahmen, M. Kantlehner, B. Jeschke, A. Enderle, B. Nies, S. L. Goodman, H. Kessler. Cyclic RGD-Peptides with Acidic-Anchors for Stimulated Cell Adhesion on Biomaterials. *Peptides, Proceedings of the 18<sup>th</sup> American Peptide Symposium*, Boston, USA, Jul. 19. - 23., **2003**, 807-808.
- J. Auernheimer, U. Hersel, C. Dahmen, B. Jeschke, A. Enderle, B. Nies, S. L. Goodman, H. Kessler. Stimulation of cell adhesion on Hydroxyapatite with cyclic RGD-Peptides.  
D. Kaufmann, C. Dahmen, U. Hersel, J. Auernheimer, M. Kantlehner, D. Finsinger, P. Schaffner, J. Meyer, B. Nies, H. Kessler. Modular design for biofunctionalisation of different surfaces via  $\alpha v \beta 3$  integrin selective cyclic RGD-Peptides. *6<sup>th</sup> German Peptide Symposium*, Berlin, Mär. 23. - 26., **2003**.
- C. Dahmen, U. Hersel, M. Kantlehner, J. Auernheimer, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler. Ein Baukasten zur Biofunktionalisierung verschiedener Materialien mit  $\alpha v \beta 3$ -Integrin-selektiven zyklischen RGD-Peptiden. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (DGBM)*, Dresden, Dez. 15./16., **2002**.
- C. Dahmen, U. Hersel, M. Kantlehner, J. Auernheimer, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler. Biofunctionalization of different surface types via  $\alpha v \beta 3$  integrin selective RGD-peptides. *Peptides 2002, Proceedings of the 27<sup>th</sup> European Peptide Symposium*, Sorrento, Italien, Aug. 31. - Sept. 6., **2002**, 456-457.





# 1 Einleitung

Der weltweite Wandel in der Chemie, der sich durch die Verlagerung der Prioritäten – weg von der klassischen Chemie, hin zur Interdisziplinarität – äußert, steht außer Frage.<sup>[1]</sup> Stephen Lippard hat zur genaueren Analyse dieses Wandels und zum Aufzeigen neuer Perspektiven in der Chemie unter Mitwirkung zahlreicher Kollegen versucht, unter dem Titel „*New frontiers in basic chemistry*“ 22 Ziele zu formulieren.<sup>[2]</sup> Auch zum Anlass des 125-jährigen Bestehens der *American Chemical Society* erschienen Beiträge, die die Suche nach neuen Aufgabengebieten und Herausforderungen als Thema haben. Wissen, fachübergreifend angewandt, erzeugt Ergebnisse ganz anderer Art als isolierte Forschung. Schon W. Heisenberg hat diese Bedeutung erkannt: „Wahrscheinlich darf man ganz allgemein sagen, dass sich in der Geschichte des menschlichen Denkens oft die fruchtbarsten Entwicklungen dort ergeben haben, wo zwei verschiedene Arten des Denkens sich getroffen haben.“

Die Erhöhung der Biokompatibilität von Materialien, die im Kontakt mit Zellen und Geweben stehen, hat in den letzten Jahren zunehmend an Interesse gewonnen. Der Anreiz für die Erforschung bioaktiver Template besteht in der Anwendungsvielzahl und -vielfalt dieser Materialien, die nutzbringend in der Implantationsmedizin, dem *tissue engineering* oder zur Untersuchung von molekularbiologischen Zellphänomenen verwendet werden können. Dabei arbeiten Materialwissenschaftler, Chemiker und Physiker vornehmlich an den Substraten, die häufig anorganischen oder polymeren Ursprungs sind. Biologen und Medizinern bleibt das Studium der

Zellantwort vorbehalten. Um das Wechselspiel zwischen unbelebten Materialien und biologischen Systemen zu untersuchen und gezielter zu steuern, wurden in der jüngsten Vergangenheit im interdisziplinären Austausch zahlreiche intelligente Zwischenschichten entwickelt. Neben zellmembransimulierenden Lipiddoppelschichten<sup>[3-6]</sup> und natürlichen Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) (z.B. Fibronectin, Collagen, Laminin, *bone sialo protein*)<sup>[7-17]</sup> und deren Fragmenten<sup>[18-21]</sup> wurden auch synthetisch hergestellte und künstliche Proteine (z.B. RGD-*cellulose binding domain*, RGD-*silke-chimeric protein*),<sup>[22-25]</sup> Peptide<sup>[26-31]</sup> und selten Peptidmimetika<sup>[32]</sup> genutzt.

Eines der am häufigsten eingesetzten Leit motive zur Stimulierung der Zelladhäsivität von Oberflächen ist die Peptidsequenz RGD,<sup>[33, 34]</sup> die durch Interaktionen mit Integrinen wirkt.<sup>[35, 36]</sup> Diese spielen in mehrzelligen Organismen in Bezug auf Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen für die physiologische Funktion des Gewebes und dessen Entwicklung eine essentielle Rolle. Unter den Zelladhäsionsrezeptoren kommt der Klasse der Integrine eine besondere Bedeutung zu. Sie sind an einer Reihe pathologischer Prozesse wie z.B. der Tumormetastasierung, akutem Nierenversagen, Osteoporose, Restenose und Retinopathie beteiligt.<sup>[37-40]</sup>

Viele der Integrine besitzen als natürliche Liganden RGD-enthaltende Proteine der ECM wie Vitronectin oder Fibronectin.<sup>[40-43]</sup> Aufgrund weltweiter Forschung auf den Gebieten der Tumorthherapie und der Tumordiagnostik konnten diese, bei gleichzeitiger Erhöhung der Integrinaffinität und -selektivität, strukturell auf peptidische und nicht-peptidische Liganden reduziert werden.<sup>[44-48]</sup> Zumeist wurden lineare RGD-Peptide und vereinzelt durch Zyklisierung konformationell eingeschränkte Peptide auf Materialoberflächen immobilisiert, wobei die Anbindung kovalent, durch Adsorption oder elektrostatische Wechselwirkung erfolgte.<sup>[26-31, 34]</sup>

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Design, der Synthese und der Anwendung von peptidischen und nicht-peptidischen  $\alpha v \beta 3$ -Integrinliganden zur Stimulierung der Zelladhäsion auf unterschiedlichen Materialoberflächen. Basierend auf den Arbeiten von D. Finsinger, M. Kantlehner, U. Hersel und C. Dahmen sollten in Zusammenarbeit mit der Firma *Biomet Deutschland GmbH* (Darmstadt) für die medizinische Anwendung bekannte zelladhäsive Verbindungen etabliert und neue entwickelt werden. Für diese Anwendungen sollten außerdem Methoden gefunden werden, die eine Quantifizierung der Peptidmenge auf der Oberfläche zulassen.

Im Rahmen des SFB 563 „Bioorganische Funktionssysteme auf Festkörpern“ sollten Möglichkeiten der photochemisch induzierten Schaltbarkeit der Zelladhäsion auf Oberflächen entwickelt werden. Drei verschiedene Konzepte waren geplant.

## 1 Einleitung

---

Aufbauend auf den Arbeiten von M. Kantelehner und C. Dahmen sollte die Anbindung und die Abspaltung von RGD-Peptiden an bzw. von verschiedenen Materialoberflächen photochemisch reguliert erfolgen. Des Weiteren war der Einbau von photoinduziert isomerisierbaren Systemen in das oberflächenadhäsive Linkersystem der RGD-Peptide geplant, die einen unterschiedlich großen Abstand des Integrinliganden zur Oberfläche generieren, was in einer *spacer*längenabhängigen Zelladhäsion resultieren könnte.

Die von C. Gibson und G. Sulyok entwickelten  $\alpha v \beta 3$ -Integrin selektiven, nicht-peptidischen RGD-Mimetika sollten, in Kooperation mit C. Dahmen, in weiterführenden Arbeiten zur Immobilisierung auf Oberflächen befähigt werden, wobei die Integrinaffinität und -selektivität erhalten bleiben sollte.



# 2 Biologischer Hintergrund

Für das Überleben einzelner Zellen und von Zellverbänden sind adhäsive Zell-ECM- und Zell-Zell-Kontakte essentiell, die das Zellverhalten und die Zellentwicklung steuern (z.B. Adhäsion, Migration, Maturation, Differenzierung). In mehrzelligen Organismen spielen sie eine wichtige Rolle beim Erhalt und der Neubildung verschiedenster Gewebesstrukturen, bei Vorgängen wie z.B. Embryogenese, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort,<sup>[42, 49, 50]</sup> aber auch bei pathologischen Prozessen wie z.B. Tumormetastasierung, Thrombosen, Osteoporose, Retinopathie, Arthritis und akutem Nierenversagen.<sup>[38, 51-65]</sup>

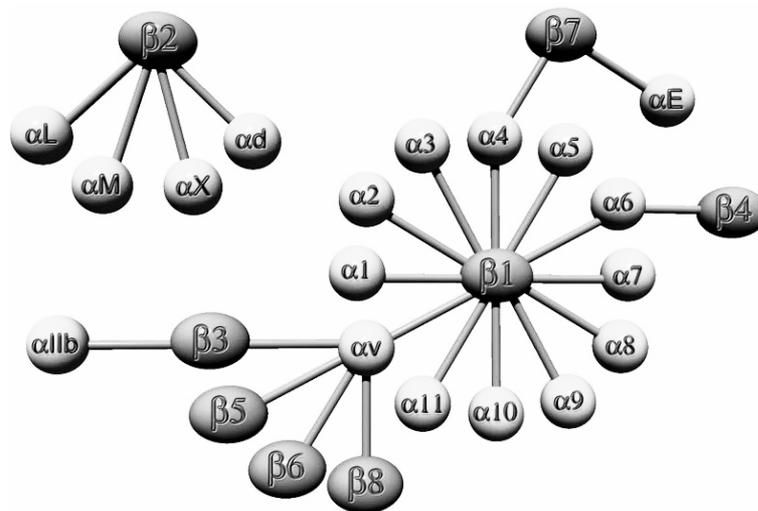
Zelloberflächenrezeptoren, die auf Grund ihrer Funktionalität auch als Zelladhäsionsrezeptoren bezeichnet werden, können in die vier großen Klassen der Integrine,<sup>[66, 67]</sup> Cadherine,<sup>[68, 69]</sup> Immunglobulin-Superfamilie<sup>[70, 71]</sup> und Selectine<sup>[72, 73]</sup> eingeteilt werden. Der physikalischen Verankerung von Zellen dienen vornehmlich die Integrine, welche auch zur bidirektionalen Signaltransduktion durch die Zellwand genutzt werden.<sup>[66, 74-79]</sup> Durch Bindung eines Liganden an das Integrin wird ein Signal in die Zelle übertragen, woraus eine Umorientierung des Cytoskeletts resultiert. Der als *outside-in signaling* bezeichnete Prozess kann die Veränderung der Zellform, die Migration oder die verankerungsabhängige Proliferation sowie die Gewebsorganisation steuern.<sup>[80, 81]</sup> Der umgekehrte Weg der Signaltransduktion vom Zellinneren nach außen wird als *inside-out signaling* bezeichnet, bei dem Faktoren innerhalb der

Zelle die Integrine aus einem passiven, schwach adhäsiven in einen aktiven, adhäsiven Zustand umschalten.<sup>[82]</sup>

Auf einer Zelle gibt es typischerweise etwa 100 000 Integrine.<sup>[83]</sup> Sie befinden sich in der Zellwand bevorzugt in cholesterin- und glycosphingolipidreichen Bereichen, den sogenannten *rafts*.<sup>[84, 85]</sup>

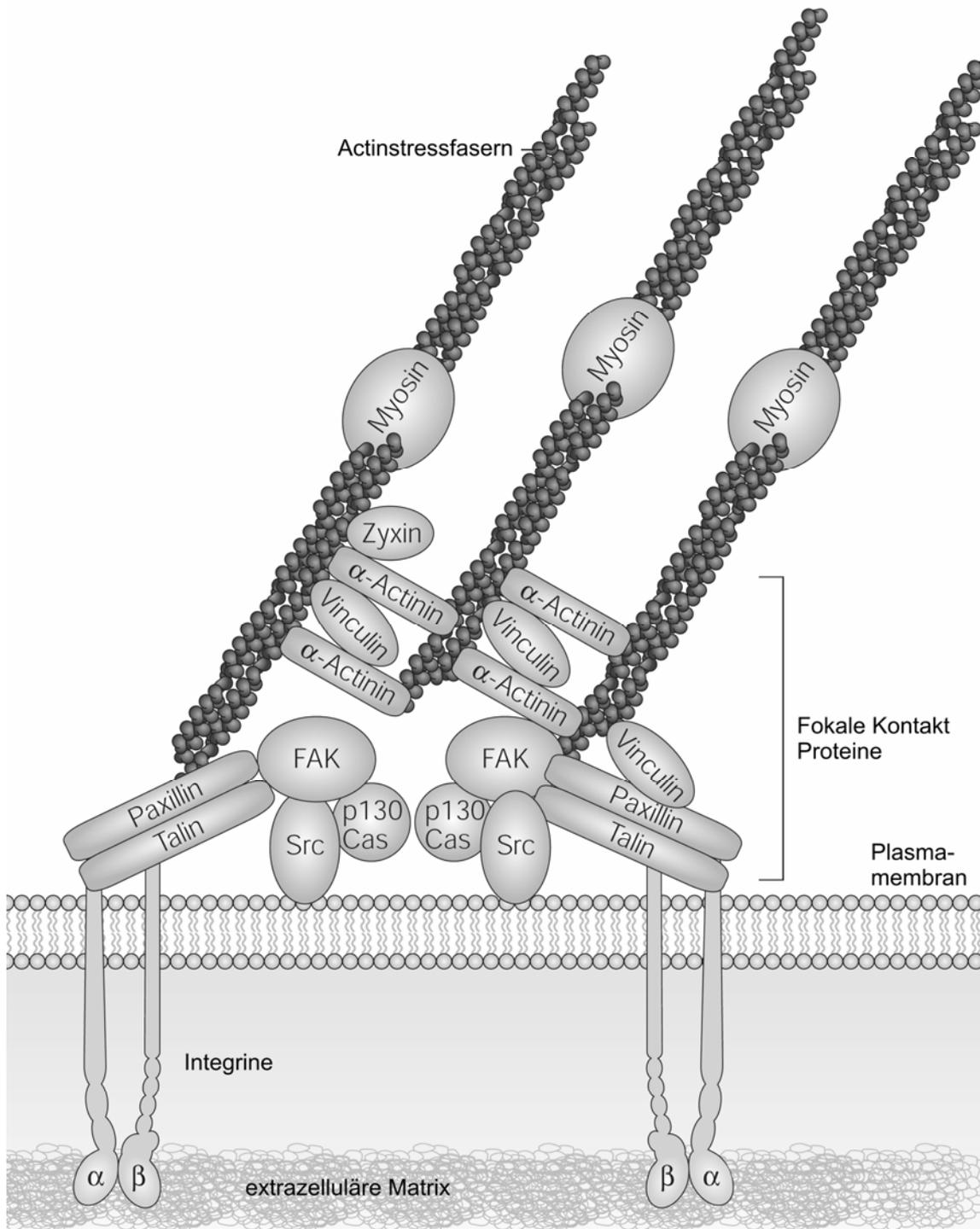
### 2.1 Aufbau der Integrinfamilie

Integrine sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine. Sie bestehen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit, welche nichtkovalent miteinander verknüpft sind. Derzeit sind 18  $\alpha$  und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Integrine bilden (Abbildung 2.1.1). Nach den Ergebnissen des Human-Genom-Projekts sind sechs neue  $\alpha$ -Untereinheiten und eine neue  $\beta$ -Untereinheit vorhergesagt,<sup>[86]</sup> allerdings steht der Beweis deren funktioneller Expression noch aus. Zur Diversität der Integrine tragen weiterhin verschiedene Splice- und Glycosylierungsvarianten bei.<sup>[87, 88]</sup>



**Abbildung 2.1.1** Die 24 bisher bekannten Integrine, die sich aus Kombinationen der verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammensetzen. Man kann verschiedene Integrin-Subfamilien unterscheiden, z. B. die  $\beta 1$ - oder die  $\beta 2$ -Integrine.<sup>[66]</sup>

Die extrazelluläre Domäne stellt den größten Teil von der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit dar. Sie besteht jeweils aus einer Kopfreion, aus der eine gestreckte Stelzenregion hervorgeht. Über die sich jeweils anschließende kurze Transmembranhelix und die cytoplasmatische Domäne kann das Integrin mit Proteinen

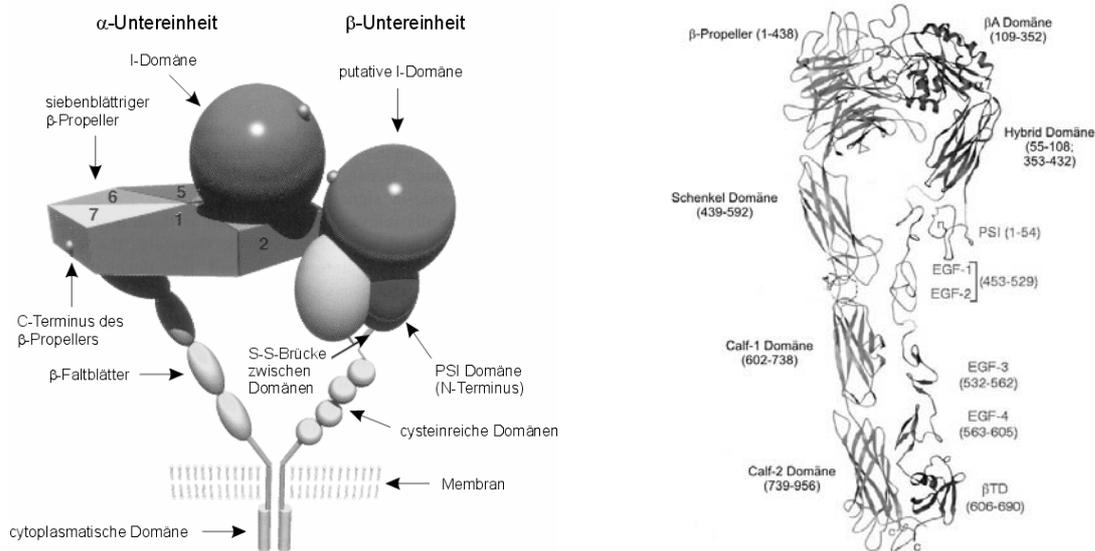


**Abbildung 2.1.2** In den fokalen Adhäsionskontakten wird das Cytoskelett der Zelle über die Integrine an die extrazelluläre Matrix gebunden. Die integrinbindenden Proteine Paxillin und Talin rekrutieren focal adhesionkinase (FAK) und Vinculin.  $\alpha$ -Actinin, ein Protein des Cytoskeletts, wird durch FAK phosphoryliert, bindet an Vinculin und verknüpft die Actomyosinstressfasern. Zyxin ist ein  $\alpha$ -Actinin- und stressfaserbindendes Protein, das in länger bestehenden Kontaktpunkten vorhanden ist. <sup>[90]</sup>

## 2 Biologischer Hintergrund

des Cytosols verknüpft werden (Abbildung 2.1.2). Die größere  $\alpha$ -Untereinheit besitzt ca. 1100 Aminosäuren und ist häufig aus zwei unterschiedlich langen Aminosäureketten aufgebaut, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Der *N*-terminale Bereich ist durch mehrere ionenbindende Abschnitte gekennzeichnet.<sup>[89]</sup> Die  $\beta$ -Untereinheit besteht aus ca. 800 Aminosäuren (Ausnahme  $\beta 4$ , ca. 1750 Aminosäuren) und enthält u. a. vier hochkonservierte cysteinreiche Domänen nahe der transmembranen Region.

Xiong *et al.* haben 2001 die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des  $\alpha v \beta 3$ -Integrins aufgeklärt (Abbildung 2.1.3).<sup>[91]</sup> In Übereinstimmung mit früher erhaltenen elektronen-mikroskopischen (EM) Bildern<sup>[92]</sup> wurde der ovale Kopf (Maße etwa  $90 \times 60 \times 45 \text{ \AA}$ ) und zwei Stelzenregionen („*stalk*“-Regionen) gefunden. Im Unterschied zu den EM-Untersuchungen sind die Stelzen-Regionen jedoch nicht linear, sondern geknickt. Dabei wird diskutiert, ob der Knick ein Kristallisationsartefakt ist oder ein konstitutives Element der integrinvermittelten Signaltransduktion darstellt. Neueste EM-Untersuchungen haben gezeigt, dass die extracellulären Domänen FN auch im geknickten Zustand binden.<sup>[93]</sup> Die Kopfgruppe der  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller, die sich anschließende Stelzen-Region aus drei linear angeordneten  $\beta$ -Faltblättern. Die Kopfgruppe der



**Abbildung 2.1.3** links: Schematische Darstellung des Aufbaus der Integrine.<sup>[94]</sup> Die Kopfgruppe der  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einem siebenblättrigen  $\beta$ -Propeller. Einige  $\alpha$ -Untereinheiten weisen zwischen dem zweiten und dritten Propellerblatt eine zusätzliche, eingeschobene Domäne ( $\alpha I$ -Domäne) auf. rechts: Korrigierte Röntgenkristallstruktur des extrazellulären Teils des  $\alpha v \beta 3$ -Integrins mit vier Domänen der  $\alpha$ -Untereinheit und acht Domänen der  $\beta$ -Untereinheit.<sup>[91]</sup>

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

Die Kopfgruppen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit werden u. a. durch einen Kationen- $\pi$ -Kontakt zusammengehalten. Dabei ragt die Aminogruppe eines Lysins der  $\beta$ I-Domäne in den von aromatischen Resten umgebenen zentralen Hohlraum des Propellers der  $\alpha$ -Untereinheit. Die Integrin- $\alpha$ -Untereinheiten  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ D,  $\alpha$ E,  $\alpha$ L,  $\alpha$ M und  $\alpha$ X besitzen in der Kopfgruppe eine zusätzliche eingeschobene sogenannte  $\alpha$ I-Domäne (*inserted domain*, auch A-Domäne). Die Liganden-Bindungsstelle dieser Integrine ist auf der  $\alpha$ I-Domäne lokalisiert.<sup>[95]</sup> Die  $\alpha$ I-Domäne - frei und im Komplex mit einem synthetischen Collagen-Liganden - war das erste röntgenkristallographisch charakterisierte Integrinfragment.<sup>[89]</sup> Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit sind mehrfach N-glycosyliert.<sup>[96, 97]</sup> Durch Veränderung im Glycosylierungsmuster kann die integrinvermittelte Adhäsionsaktivität der Zellen gesteigert oder vermindert werden. Dies kann bis zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit führen.<sup>[98-100]</sup> Einige Tumorzelllinien weisen abweichende Glycosylierungsmuster auf.<sup>[97, 101-103]</sup>

## 2.2 Integrinliganden und Ligandenbindung

Durch Kombination der verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten entstehen Integrine mit bestimmter Ligandenspezifität. Während einige Integrine mit hoher Selektivität nur einen Liganden binden, z. B.  $\alpha$ v $\beta$ 6 an das ECM-Protein Laminin, sind andere Integrine in ihrem Ligandenbindungsverhalten eher promisk, wie z. B.  $\alpha$ v $\beta$ 3, welches zwar bevorzugt an Osteopontin und Vitronectin, aber noch mindestens an sieben weitere ECM-Proteine bindet. Die natürlichen Liganden der jeweiligen Integrine aus der ECM und auf Zelloberflächen sind in Tabelle 2.1 angegeben. Weiterhin gibt es lösliche Integrinliganden, u. a. die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), aber auch Xenogene wie z. B. Bakterien, Viren (zur Adhäsion an die Wirtszellen)

## 2 Biologischer Hintergrund

und die gerinnungshemmenden Disintegrine aus Schlangengiften und dem Speichel von Blutegel und Zecke.<sup>[86]</sup>

**Tabelle 2.1** *Natürliche Liganden der verschiedenen Integrine aus ECM und Zell-oberflächen.<sup>[40, 67, 104-109]</sup> Grau unterlegte Felder bezeichnen Wechsehwirkungen, die mit RGD-Peptiden inhibierbar sind.<sup>[43]</sup>*

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, Ln5, 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

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

Das Tripeptid RGD wurde 1984 von Pierschbacher und Ruoslahti als minimale essenzielle Zelladhäsionssequenz in Fibronectin entdeckt und als Bindungsepitop für Integrine identifiziert.<sup>[35, 110]</sup> Es konnte gezeigt werden, dass immobilisierte RGD-Peptide ähnlich wie ECM-Proteine integrinvermittelte Zelladhäsion bewirken, während lösliche RGD-Peptide antagonistisch zur ECM adhärenzte Zellen ablösen.<sup>[35]</sup> Die RGD-Sequenz wurde seitdem in vielen anderen ECM-Proteinen nachgewiesen, z. B. in Vitronectin, Fibrinogen, von Willebrand Faktor, Collagen, Lami-

nin, Osteopontin, Tenascin und Thrombospondin, aber auch in den oben erwähnten xenogenen Integrinliganden. Die verschiedenen Proteine können trotz des gemeinsamen RGD-Motivs eine hohe Integrinselektivität aufweisen. Diese kann mehrere Ursachen haben: Zum einen besitzen ECM-Proteine weitere spezifitäts- (und affinitäts-) steigernde Adhäsionssequenzen für den Kontakt mit anderen Bindungsregionen auf den jeweiligen Integrinen, wie z. B. Fibronectin mit der  $\alpha 5\beta 1$ -bindenden PHSRN- und wahrscheinlich zusätzlich mit der kürzlich entdeckten KNEED-Sequenz.<sup>[111, 112]</sup> Weiterhin nimmt man an, dass die jeweiligen RGD-Sequenzen, obwohl sie üblicherweise in flexiblen Schleifen (*loops*) präsentiert werden, in einer bevorzugten Konformation vorliegen und so unterschiedliche Affinitäten zu den verschiedenen Integrinsubtypen aufweisen.<sup>[43]</sup> Die Abhängigkeit zwischen Konformation und Integrinselektivität konnte mit konformativ eingeschränkten cyclischen RGD-Penta- und -Hexapeptiden bewiesen werden.<sup>[44, 45, 113-115]</sup> Weiterhin tragen die Seitenketten der benachbarten Aminosäuren zur Integrinselektivität bei, z. B. weist das Peptid GRGDS keine Selektivität unter den Integrinen  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$  und  $\alpha v\beta 3$  auf, während die verlängerte Sequenz GRGDSP eine erhöhte Affinität für  $\alpha 5\beta 1$  besitzt.<sup>[34]</sup> Dieser Effekt ist allerdings nur schwer vom konformativen Beitrag zu trennen. Ungefähr die Hälfte der bekannten Integrine binden ECM-Proteine in einer mit RGD-Peptiden inhibierbaren Weise (grau unterlegte Felder in Tabelle 2.1).<sup>[43]</sup> Dabei haben Integrine wie  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  primär andere Adhäsionssequenzen. Im letzteren Fall ist die RGD-Sequenz des natürlichen Liganden Collagen für das Integrin nicht erreichbar und nur nach Denaturierung oder Proteolyse des Collagens zugänglich. Die Fokussierung auf RGD-abhängige Integrinbindung vor einigen Jahren beruhte auf der Hoffnung, neben ihrer tatsächlichen zentralen Rolle, mit der RGD-Sequenz ein „universelles Zellerkennungsmotiv“ gefunden zu haben.<sup>[43]</sup> Neben der RGD-Sequenz wurden jedoch viele andere integrinbindende Peptidsequenzen gefunden (Tabelle 2.2).

Auf der Basis der natürlichen Ligandenbindungssequenzen wurde eine Vielzahl künstlicher Integrinliganden entwickelt, die in Affinität, Selektivität und ADMET-Parametern (*absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity*) den natürlichen Peptiden überlegen sind. Zunächst lassen sich durch Cyclisierung und den wechselnden Einbau von D-Aminosäuren (*spatial screening*)<sup>[136]</sup> selektive, superaktive und metabolisch stabile Peptide erzeugen.<sup>[44]</sup> Das aus diesem Prozess hervorgegangene  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ -biselektive und hochaffine *cyclo*[-RGDf(NMe)V-]<sup>[137]</sup> (Cilengitide, EMD 121974) wird derzeit von *Merck KGaA* in der Tumorthherapie in der Klinischenphase II getestet und ist im Januar 2004 von der *European Medicines Agency (EMA)* als

## 2 Biologischer Hintergrund

*orphan drug* für die Behandlung von Glioblastomen zugelassen worden. Verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften und weitere Affinitätssteigerungen lassen sich mit den peptidomimetischen bzw. nichtpeptidischen RGD-Analoga erreichen.<sup>[138, 139]</sup>

**Tabelle 2.2** Die bekannten Adhäsionssequenzen der verschiedenen Integrine.<sup>[36, 92, 116, 117]</sup>

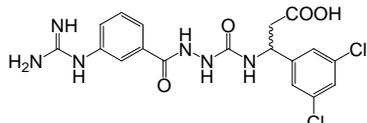
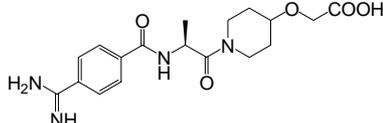
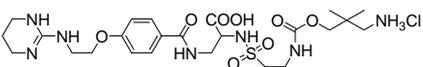
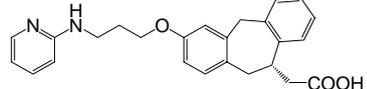
Integrin	Adhäsionssequenz (Herkunft)	Integrin	Adhäsionssequenz (Herkunft)
$\alpha 1\beta 1$	GFOGER (Col I)	$\alpha D\beta 2$	?
$\alpha 2\beta 1$	DGEA (Col I), RKKH (Dis), <sup>[118]</sup> YYGDALR, IAFQRN(Ln), <sup>[119]</sup> FYFDLR, (Col IV), GFOGER (Col I)	$\alpha L\beta 2$	KELLPGNNRKV (ICAM-1), LET, IET (?)
$\alpha 3\beta 1$	RGD (Fn), KQNCLSSRASFRGCVRNLRL SR (Ln)	$\alpha M\beta 2$	LYQAKRFKV, <sup>[120]</sup> KQAGDV (Fn), KRLDGS (Fb) <sup>[120]</sup>
$\alpha 4\beta 1$	REDV, LDV, IDAPS (Fn) QIDSP, GNEH, KLEK (VCAM), SVVYGLR (Opn), <sup>[107]</sup> MLDG (Dis) <sup>[121]</sup>	$\alpha IIb\beta 3$	KQAGDV, RGD (Fg), RGD (Fn, Vn, vWF, Tsp), KGD (Dis)
$\alpha 5\beta 1$	RGDSP, PHSRN, KNEED (Fn), <sup>[112]</sup> KQAGDV, RGD? (Fg), RYDS (Str), <sup>[122]</sup> CRRETAWAC (Phagendisplay)	$\alpha v\beta 3$	RGD (Vn, Fn, vWF, Tsp, Opn, BSP, Tn, Fib, <sup>[123]</sup> Fg, <sup>[124]</sup> SNS (Col IV), <sup>[125]</sup> KRLDGS (Fg) <sup>[126]</sup>
$\alpha 6\beta 1$	NPWHSIYTTRFG, <sup>[119]</sup> TWY- KIAFQRNRH, <sup>[127]</sup> SIYTTRF (Ln), <sup>[127]</sup> ECD (Fertilin- $\beta$ ) <sup>[128]</sup>	$\alpha v\beta 5$	RGD (Vn), RKKRRQRRR (Tat) <sup>[129]</sup>
$\alpha 7\beta 1$	?	$\alpha v\beta 6$	RGD (Fn), DLXXL (Tn)
$\alpha 8\beta 1$	RGD (Fn, <sup>[130]</sup> Vn, <sup>[131]</sup> Tn <sup>[132]</sup> )	$\alpha E\beta 1$	NRDKETKV (E-Cadherin) <sup>[133]</sup>
$\alpha 9\beta 1$	AEIDGIEL (Tn), <sup>[121]</sup> SVVYGLR (Opn), <sup>[134]</sup> MLDG (Dis) <sup>[134]</sup>	$\alpha 4\beta 7$	REDV (Fn), QIDSP, GNEH (VCAM), LDT (MadCAM)
$\alpha 10\beta 1$	?	$\alpha v\beta 8$	?
$\alpha 11\beta 1$	?	$\alpha 6\beta 4$	14mer aus Col XVII <sup>[135]</sup>
$\alpha v\beta 1$	RGD (Fn, Vn)	$\alpha X\beta 2$	GPRP (Fg)

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

## 2 Biologischer Hintergrund

Die intensivste Forschung wurde und wird derzeit auf dem Gebiet der  $\alpha v \beta 3$ -selektiven Verbindungen (Arthritis, Retinopathie, akutes Nierenversagen, Osteoporose, Tumorthherapie),<sup>[138, 143, 145, 146]</sup> der  $\alpha IIb \beta 3$ -selektiven Verbindungen (Blutgerinnung),<sup>[141, 147, 148]</sup> der  $\alpha 5 \beta 1$ -selektiven Verbindungen (Tumorthherapie, bakterielle Infektion)<sup>[149, 150]</sup> und der  $\alpha 4 \beta 1$ - und  $\alpha 4 \beta 7$ -selektiven Verbindungen (Entzündungen, Arthritis, Colitis, Diabetes)<sup>[144, 151, 152]</sup> betrieben (Tabelle 2.3).

**Tabelle 2.3** Übersicht ausgewählter peptidischer und nichtpeptidischer Integrinliganden.

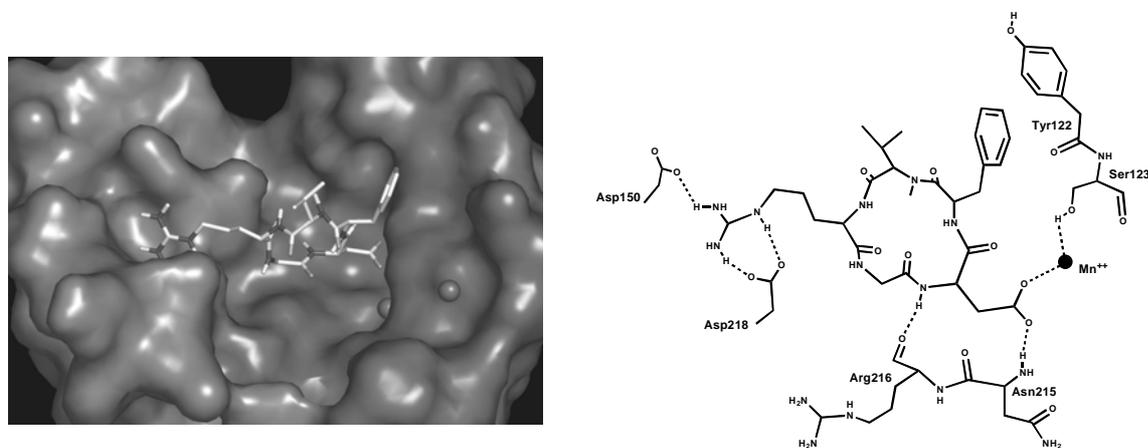
Struktur	IC <sub>50</sub> / nM			Ref.
	$\alpha v \beta 3$	$\alpha v \beta 5$	$\alpha IIb \beta 3$	
Vitronectin <sup>a</sup>	25	-	> 900	[45]
GRGDSPK	210	-	1700	[137]
GRGDS	320	-	10500	[45]
<i>cyclo</i> (-RGDfV-)	2,5	-	1700	[137]
<i>cyclo</i> (-RGDf(NMe)V-)	0,58	-	860	[137]
<i>cyclo</i> (-RGDfK-)	4,2	> 100	1800	[140]
	1,0	> 100	> 1000	[138]
	-	-	1,9	[141]
	2,94	-	-	[142]
	4,0 <sup>b</sup>	-	9000 <sup>b</sup>	[143]
<i>cyclo</i> (-LDTDpF-)	$\alpha 4 \beta 7$ : 7% <sup>c</sup>		$\alpha 4 \beta 1$ : 109 % <sup>c</sup>	[144]

<sup>a</sup> angenommene Masse des Proteins 75 kDa; <sup>b</sup> Bindungskonstante K<sub>i</sub>; <sup>c</sup> Adhäsion von 38- $\beta 7$ -Zellen bei 2 mg Verbindung / mL

Das zyklische Pentapeptid *cyclo*(-RGDfV-), welches Grundlage weiter Teile dieser Arbeit ist, hat laut NMR-spektroskopischen Untersuchungen eine Vorzugskonformation, bei der die Aminosäuren D-Phenylalanin und Valin die Positionen i+1 und i einer  $\beta II'$ -Schleife und Glycin die i+1-Position einer  $\gamma$ -Schleife einnehmen.<sup>[140]</sup> Die Seitenketten des Arginins und der Asparaginsäure werden dadurch in eine optimale Orientierung für die Wechselwirkung mit dem  $\alpha v \beta 3$ -Integrinrezeptor gedreht. Beide

funktionellen Seitenketten wurden als essentielle Pharmakophore identifiziert (Abstand für  $\alpha_v$ -selektive Liganden ca. 1,3 nm).<sup>[74, 137]</sup> In der Wechselwirkung mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin werden nur Guanidin oder Guanidinmimetika toleriert,<sup>[143, 153]</sup> während  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrinliganden auch starke basische Gruppen wie Amine oder Amidine enthalten können.<sup>[154]</sup> Der zur Carboxylgruppe benachbarte aromatische Rest erhöht die Bindungsaffinität durch  $\pi$ -Wechselwirkung mit dem Rezeptor.<sup>[155]</sup>

Abbildung 2.2.1 stellt die Wechselwirkungen des analogen Peptids *cyclo*(-RGDf(NMe)V-) mit dem  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins dar.<sup>[156]</sup> Die Bindungstasche für RGD-Liganden ist relativ flach, weshalb gerade genügend Platz für eine hydrophobe Wechselwirkung der Methylengruppe des Glycins mit der Integrinoberfläche zur Verfügung steht. Aus diesem Grund besitzen analoge RAD-Peptide eine wesentlich geringere Affinität gegenüber diesem Integrin (Tabelle 2.3). Arginin und Asparaginsäure binden über ionische Wechselwirkungen in etwas tiefere Rezeptortaschen. Die Carboxylgruppe koordiniert an ein zweiwertiges Kation in der MIDAS-Region der  $\beta$ -Untereinheit und an das NH des Asn215. Die Argininseitenkette bindet an das Asp150 und das Asp218 der  $\alpha$ -Untereinheit.<sup>[156]</sup> Das Valin geht keine Interaktion mit dem Rezeptor ein, weshalb es durch verschiedene Aminosäuren ohne Verlust der Integrinaffinität und -selektivität ersetzt werden kann.<sup>[115]</sup>



**Abbildung 2.2.1** (a) Darstellung der Kristallstruktur des  $\alpha_v\beta_3$ -Integrins mit dem Liganden *cyclo*(-RGDf(NMe)V-) und zwei  $Mn^{2+}$ -Ionen (MIDAS und ADMIDAS).<sup>[156]</sup> (b) Darstellung des Ligand- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Komplexes. Gestrichelte Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen dar.

### 2.3 Integrinvermittelte Signaltransduktion

Dass Signaltransduktion kein einfacher linearer Pfad biochemischer Interaktionen darstellt, sondern ein interagierendes Netzwerk, zeigt sich deutlich am Beispiel der Integrine. So kann z. B. eine Aktivierung (Ligandenbindung) des  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ -Integrins in Neutrophilen gegensätzliche Folgen haben: Liegen proapoptotische Stimuli vor, wird Apoptose ausgelöst, liegen diese Stimuli nicht vor, wird Apoptose unterdrückt. Weiterhin wird trotz proapoptotischer Stimuli Apoptose unterdrückt, wenn die Integrine im Cluster, aber nicht aktiviert vorliegen.<sup>[157]</sup> Integrine sind in eine enorme Zahl von Signaltransduktionsereignissen involviert.<sup>[158]</sup> Mit ihnen kann eine Zelle über viele Einzelereignisse im extrazellulären Bereich und im Zellinneren gleichsam „integrieren“ und dann entsprechende Entscheidungen treffen. Die integrinvermittelte Signaltransduktion findet dabei auf mehreren Ebenen statt: Konformationsänderung, clustern von Integrinen, Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen, Kraftübertragung und Translokation. Konformationsänderungen sind bei Integrinen mehrstufig. Für das  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin kennt man z. B. den niedrigaffinen ruhenden Zustand, in dem natürliche Liganden kaum gebunden werden,<sup>[159]</sup> einen höheraffinen, ligandenbindenden (ligandkompetenten) Status, bewirkt durch verschiedene Stimuli ( $\text{Mn}^{2+}$ , Regulation durch Proteine des Cytosols, RGD-Liganden),<sup>[160, 161]</sup> eine ADP-vermittelte affinitäts-neutrale Veränderung, so dass auch weniger exponierte Liganden gebunden werden können,<sup>[162]</sup> den ligandengebundenen Zustand und einen geöffneten Zustand nach Ligandenbindung.<sup>[160, 163]</sup> Für das  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin werden ähnliche Stufen postuliert, hier scheint konstitutiv der ligandkompetente Status vorzuliegen, welcher durch cytosolische Proteine in den ruhenden Zustand überführt wird.<sup>[164]</sup> Nach Modellrechnungen von K. Gottschalk beruht der Übergang zwischen dem niedrigaffinen und dem ligandkompetenten Status auf einer Verdrehung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zueinander. Durch die Bindung eines Liganden wird eine scherenartige Bewegung der Untereinheiten bewirkt, was zu einer Trennung der Kopfgruppen der Untereinheiten führt.<sup>[79, 163]</sup> Die Transmembrandomänen haben dabei sowohl bei der Verdrehung als auch bei der Öffnung scharnierartig miteinander Kontakt.<sup>[79]</sup> Stimuliert durch die geknickte Form der  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Kristallstruktur wird als Grundlage der Konformationsänderung und Signaltransduktion auch ein sogenanntes „Klappmesser-Modell“ vorgeschlagen.<sup>[161, 165]</sup>

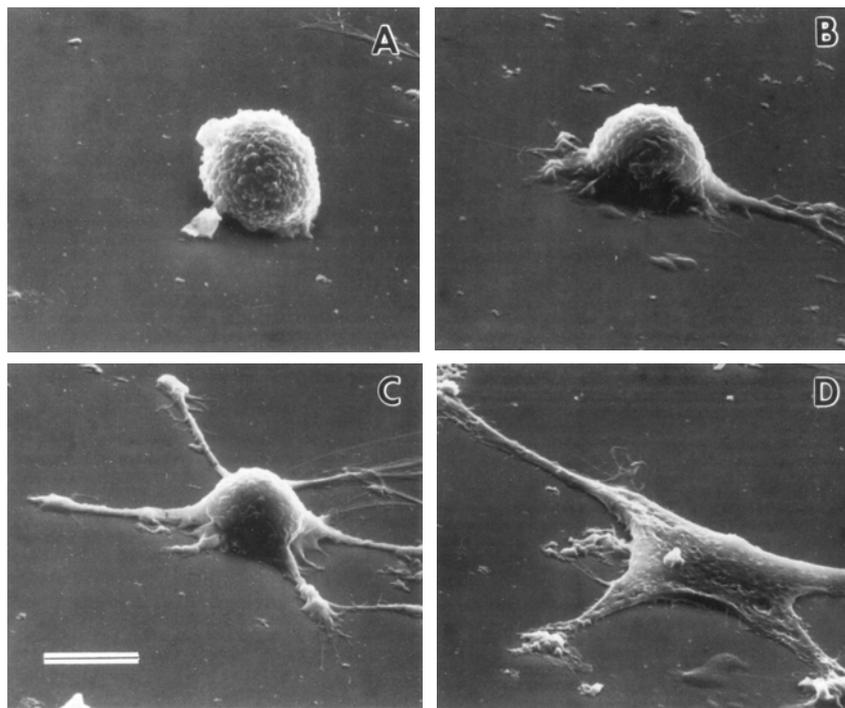
Das Clustern von Integrinen, also eine lokale Anhäufung, erhöht die Bindungsaffinität einer Zelle. Integrincluster sind Vorläufer von fokalen Adhäsionskomplexen

(FAs). Dort werden in besonderem Maß auch Partner für die Signalübertragung rekrutiert. Die Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen erfolgt im Zellinneren, in der Membran und im extrazellulären Bereich. Integrine interagieren mit Tetraspanninen, Pentaspanninen, Proteinen der Ig-Superfamilie, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Insulinrezeptor, uPAR (urokinaseartiger Plasminogenaktivator-Rezeptor), Caveolin, Ionenkanälen, Proteoglycanen und vielen anderen.<sup>[186, 158, 166, 167]</sup> Dabei haben Integrine Einfluss auf die Funktion der anderen Proteine und umgekehrt. Diese Beiträge zur Signaltransduktion überschneiden sich mit denen von Konformationsänderung und Clustern. Die integrinvermittelte Kraftübertragung besitzt neben der mechanischen Funktion in Zellverankerung und Migration auch eine signalgebende Komponente. Bereits der Widerstand, den ein ligandengebundenes, immobilisiertes Integrin auf die kontraktilen Kräfte der Zelle ausübt, ist ein sensorischer Beitrag, der in der Bildung von FAs und Stressfasern resultieren kann.<sup>[134, 168, 169]</sup> Es werden aber auch komplexere mechano-sensorische Funktionen von Integrinen in Geweben unter mechanischer Belastung und Fließkräften beschrieben, z. B. in Knochen, Knorpel und Epithel.<sup>[170-174]</sup> Eventuell verändert dabei die Krümmung der Membran die Konformation der Integrine.<sup>[175]</sup> Die Translokation von Integrinen aus der Zellmembran vermittelt ebenfalls Signale. Die bei der Zellmigration aus der Membran ausgerichteten  $\beta 1$ -Integrine aktivieren z. B. die Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1).<sup>[176, 177]</sup> Endocytisierte Integrine können RGD-funktionalisierte Proteine (z. B. Fibronectin, Antikörper) durch Endocytose ins Zellinnere transportieren.<sup>[178, 179]</sup> Endocytisierte, nicht-ECM-gebundene Integrine werden im sogenannten *unligation*-Modell für die apoptotische Wirkung von RGD-Peptiden verantwortlich gemacht.

### 2.4 Zelladhäsion

Integrinvermittelte Zelladhäsion besteht aus den vier Schritten Zellanheftung, Zellspreitung, Organisation des Cytoskeletts und Ausbildung der fokalen Adhäsionskomplexe (FAs).<sup>[180]</sup> Die Ereignisse können sich dabei auch z. T. überschneiden. Im ersten Schritt kontaktiert die Zelle das zu Grunde liegende Substrat und bindet zunächst nur schwach, z. B. über Proteoglykane, Selectine und einzelne Integrine.<sup>[181]</sup> Im zweiten Schritt beobachtet man ein Abplatten und Ausbreiten der Zelle über das Substrat (Abbildung 2.4.1). Hier werden Integrine wahrscheinlich aktiviert und geclustert. Dadurch wird im nächsten Schritt das Cytoskelett aktiviert, das Actin organisiert sich in Stressfasern zwischen den Integrinclustern. Die Zelle ist nun fest mit dem Substrat verankert. Im vierten Schritt bilden sich die fokalen Adhäsions-

komplexe aus. Sie bestehen – in der Zusammensetzung entsprechend Zellsorte, Zellzustand und ECM variabel<sup>[182]</sup> – aus über 50 anderen transmembranen, membranassoziierten und cytosolischen Proteinen.<sup>[183]</sup> Das initiale Ereignis zur Bildung der FAs ist das Clustern von Integrinen. Es kann durch multivalente Liganden ausgelöst werden, wie am Beispiel von  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrinen in Lipiddoppelschichten gezeigt wurde.<sup>[84]</sup> Interessanterweise erzeugt der dimere Ligand Fibrinogen neben Integrindimeren noch höhere Homologe. Das spräche für eine Tendenz zur Auto-oligomerisierung, wie sie, besonders im ligandengebundenen Zustand, in Micellen bei erhöhter Temperatur (40 °C) beobachtet wurde.<sup>[184]</sup> In Zellen scheint der monovalentgebundene Zustand nicht ausreichend zu sein, um ein stabiles Clustering herbeizuführen. Man kann sich aber leicht eine Kooperationskette nach folgendem Muster vorstellen: Monovalente Ligandenbindung / Aktivierung – Translokalisierung des Integrins in *rafts*<sup>[85]</sup> – weitere Anreicherung von Integrinen in *rafts* – erste Oligomerisierung – polyvalente Ligandenbindung – Rekrutierung von verbrückenden Proteinen – stabiler Cluster.



**Abbildung 2.4.1** Während des Adhäsionsvorgangs bildet die Zelle Ausläufer (Filopodien) und spreitet, bis sie flach auf dem Substrat aufliegt. In den Ausläufern finden sich u. a. fokale Adhäsionskomplexe. Elektronenmikroskopische Aufnahmen adhätierender Fibroblasten, Balkenlänge 10  $\mu$ m.<sup>[28]</sup>

In wie weit in Zellen Integrincluster durch direkten Kontakt der Integrine oder durch indirekte Kontakte (also über Adaptermoleküle in der Zellmembran oder Pro-

teine des Cytoskeletts) gebildet werden ist nicht bekannt. Aus Deletionsstudien ist bekannt, dass der cytosolische Teil der  $\beta$ -Untereinheit zum Clustern benötigt wird. Chimären aus einer irrelevanten Transmembrandomäne und der cytoplasmatischen  $\beta 1$ -Domäne lokalisieren konstitutiv in FAs.<sup>[185]</sup> Mit intakten Integrinen verläuft die Lokalisierung nicht passiv, sondern zielgesteuert. So entscheidet die Phosphorylierung eines Serins darüber, ob sich  $\beta 1$ -Integrine in fokalen Adhäsionskomplexen oder in Podosomen (einer anderen Art von Matrixkontakt) befinden.<sup>[181]</sup> Auch vom Zellinnern kann das Clustern von Integrinen ausgelöst werden, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen wenig bekannt sind.<sup>[158, 181]</sup> *Inside-out-clustering* zur Erhöhung der Integrin-Affinität kann in Leukozyten in weniger als 0,1 Sekunden erfolgen.<sup>[186]</sup> In diesem und in anderen beschriebenen Fällen<sup>[187]</sup> wird Zelladhäsion durch geclusterte, nichtaktivierte Integrine ausgelöst. Entsprechend wird in der aktuellen Forschung die Bedeutung der Bindungsavidität gegenüber der Bindungsaffinität in der Zelladhäsion neu bewertet.<sup>[188, 189]</sup> Der Abstand der Integrine in einem Integrincluster ist nicht bekannt. Man kann jedoch aus indirekten Messmethoden einen Minimalabstand von 6 nm und einen Maximalabstand von ca. 60 nm annehmen. Die Effekte des Integrinclusters sind eine Steigerung von Ligandenbindungstärke und -geschwindigkeit,<sup>[190, 191]</sup> Übertragung von Signalen, die von der monovalenten Ligandenbindung verschieden sind<sup>[157]</sup> und Bildung von fokalen Adhäsionskomplexen.<sup>[192]</sup> Diese sind eine spezielle Form der organisierten Zell-Matrixkontakte. Daneben kennt man noch Filopodien, Podosomen, Hemidesmosomen, Lamellen, *spikes*, *microspikes*, *ruffles*, *point contacts* und *fibrillar adhesions* (auch *focal complexes*).<sup>[183, 192, 193]</sup> Grundlage für FAs sind Cluster von Integrinen. In den Clustern finden sich verstärkt die „klassischen“ Integrine  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha IIb\beta 3$  und  $\alpha v\beta 3$ , aber auch die meisten anderen außer  $\alpha 4\beta 1$ .<sup>[192, 194]</sup> Infolge der Clusterbildung werden die Integrine mit dem Cytoskelett der Zelle, den Actin-Fasern, über die Strukturproteine  $\alpha$ -Actinin, Talin und Vinculin mit Hilfe von Paxillin, Vinculin und Tensin verknüpft (Abbildung 2.4.1).<sup>[158]</sup> Dies wird über die kleinen Rho(Ras homologe)-GTPasen Rho, Rac und Cdc42 organisiert, welche heute als essenziell für die Bildung von Integrinclustern, Stressfasern und FAs sowie Zellspreitung und Migration angesehen werden.<sup>[158, 168, 181, 195-197]</sup> Über Integrine in einem Cluster, aber auch über die Wechselwirkung der Integrine mit anderen Zellrezeptoren in FAs werden eine Vielzahl von *downstream*-Signalwegen aktiviert, z. B. Grb2 / Ras / Raf / Mek / MAPK (= Erk), PI3K / Akt und Crk / Rac / MAPK. Die von FAs ausgelösten Signalkaskaden sind u. a. wichtig für Zellproliferation (Fortschreiten im Zellzyklus) und Zellüberleben (Rast in der G1-Phase).<sup>[195]</sup> Das Ausbleiben dieser Signale kann zur Apoptose führen. FAs brau-

chen zu Ausbildung des ausgereiften Phänotyps Zeit (ca. sechs Stunden), beständigen Nachschub von weiteren Integrinen (wahrscheinlich über einen Exocytosemechanismus)<sup>[198]</sup> und mechanische Krafteinwirkung, entweder internen Ursprungs durch Myosin oder von außen.<sup>[168, 199]</sup> Unterbleibt diese Krafteinwirkung durch ein flexibles Substrat oder Inhibierung der Actin-Myosin-Kontraktilität, bilden sich z. B. auf Fibronectin kleinere Matrixkontakte, die fibrillar adhesions, die reich an  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrinen und Tensin sind, aber weniger Phosphorylierung und kein Paxillin, Vinculin und keine Stressfasern aufweisen.<sup>[168, 199, 200]</sup> Die *fibrillar adhesions*, also kleinere  $\alpha 5 \beta 1$ -Cluster, können nach initialen Adhäsionsvorgängen aus den reifenden FAs (auf der Grundlage von  $\alpha v \beta 3$ -Clustern) herausgezogen werden und gehorchen den zentripetalen Kräften der Zelle.<sup>[183, 201]</sup> Wahrscheinlich ergibt sich daraus die Beobachtung, dass mit  $\beta 1$ -GFP-Chimären angefärbte FAs in ruhenden Fibroblasten in Richtung Zellmitte wandern,<sup>[201]</sup> während die  $\alpha v \beta 3$ -basierenden FAs stationär bleiben.<sup>[178, 183, 198]</sup> In jüngerer Zeit wurde die Liste der Zell-Matrix-Kontakte um die sogenannten 3D-FAs erweitert. Diese wurden in Zellen in flexiblen dreidimensionalen ECM-Matrizes beobachtet. Sie unterscheiden sich deutlich von den FAs, die in Zellen auf starren zweidimensionalen Substraten gebildet werden, und zwar in Größe, Zusammensetzung und *downstream*-Ereignissen.<sup>[158, 202, 203]</sup> Die 3D-FAs scheinen eine Zwischenstellung zwischen den *fibrillar adhesions* und den auf starren Substraten beobachteten „klassischen“ FAs einzunehmen: Der Phosphorylierungsgrad ist eher gering und  $\beta 3$ -Integrine und FAK sind nur zu einem geringen Teil involviert, trotzdem sind die üblichen Strukturproteine (Tensin, Paxillin, Vinculin und Actin) enthalten. Seit der Entdeckung der 3D-FAs wird die Relevanz der bisherigen Erkenntnisse über FAs auf starren, künstlichen Oberflächen grundsätzlich in Zweifel gezogen.<sup>[202, 203]</sup> Man sollte dabei aber im Auge behalten, dass die 3D-FAs mit Fibroblasten, also Zellen ohne natürliche Polarität, in einer eher weichen Fibronectinmatrix untersucht wurden. In wie weit diese Ergebnisse auf polarisierte Zellen, also Epithelzellen, Osteoblasten und verklumpte Blutplättchen in den entsprechenden Matrizes übertragen werden können, ist nicht bekannt. In der jüngsten Zeit wird in der Literatur darauf hingewiesen, dass auch das Auflösen von FAs ein physiologisch wichtiger Vorgang ist. Dies wurde stimuliert durch die Beobachtung, dass bestimmte ECM-Proteine die Auflösung von FAs und Stressfasern bewirken: Tenascin-C über den Rezeptor Annexin II, Thrombospondin über Calreticulin und SPARC (*secreted protein, acidic and rich in cysteine*) über einen unbekanntenen Rezeptor.<sup>[185, 204]</sup> Die gespreitete Zellform und ein gewisses Maß an Integrinclustern können dabei erhalten bleiben. Diesem sogenannten *intermediate cell adhesion state* wird eine große

Bedeutung für Morphogenese, Wundheilung und Migration zugemessen. Er wird weiterhin als Übergang in den nicht-adhären, Apoptose induzierenden Zustand interpretiert.<sup>[204]</sup>

### 2.5 Integrine im Knochenstoffwechsel

Das  $\alpha v \beta 3$ -Integrin und seine Liganden sind auch an verschiedenen Prozessen des Knochenstoffwechsels beteiligt. Der Östrogenmangel, der während des Klimakteriums auftritt und neben ernährungsbedingtem Kalziummangel eine Ursache für Osteoporose darstellt,<sup>[205, 206]</sup> stimuliert die Aktivierung von Osteoclasten.<sup>[206, 207]</sup> Diese exprimieren die Integrine  $\alpha 2 \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 1$  und vor allem  $\alpha v \beta 3$ ,<sup>[47]</sup> welche an Bestandteile der Knochenmatrix (z.B. Osteopontin, Vitronectin) adhären, was zur Ausschüttung von Salzsäure und zum Abbau der mineralischen Knochensubstanz führt. Durch die Osteoclastenadhäsion wird die Proliferation von Osteoblasten gefördert, die durch den Knochenaufbau der Knochenresorption entgegenwirken. Primäre Osteoblasten exprimieren hauptsächlich  $\alpha 3 \beta 1$ -,  $\alpha 5 \beta 1$ - und  $\alpha v \beta 5$ -Integrine, in veränderlichem Maße  $\alpha v \beta 3$ -Integrine und andere Integrine.<sup>[30, 208, 209]</sup> Das Expressionsmuster variiert je nach Zelllinie und Kultivierungsbedingungen stark.<sup>[210]</sup> Im Knochenstoffwechsel führt eine reduzierte Osteoblastenadhäsion mit Matrixproteinen, verursacht durch inhibierte Integrine, zu einem erhöhten Apoptosepotential.<sup>[211]</sup>

*In vitro* konnte die Adhäsion von Osteoblasten an künstliche Oberflächen durch eine Oberflächenfunktionalisierung mit RGD-Peptiden in zahlreichen Fällen erzielt werden.<sup>[30, 34]</sup> Über welche Integrine die Osteoblastenadhäsion an künstliche Oberflächen stattfindet ist noch wenig untersucht; in einigen Fällen wurde von einer dominanten Rolle des  $\alpha v \beta 3$ -Integrins berichtet.<sup>[18, 212]</sup> Auf einer RGD-beschichteten PMMA-Oberfläche konnte über eine erfolgreiche Stimulierung der Zelladhäsion hinaus noch die Proliferation der Osteoblasten angeregt werden (Produktion von alkalischer Phosphatase und Collagen I). Inzwischen konnte auch *in vivo* eine erfolgreiche Knochenintegration eines PMMA-Formkörpers durch RGD-Beschichtung nachgewiesen werden.<sup>[30]</sup>

### 2.6 Immobilisierung von Integrinliganden auf künstlichen Oberflächen

Diese Arbeit beschäftigt sich mit einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Materialien und deren Beschichtung mit Integrinliganden zur Stimulierung der Zelladhäsion. Die Immobilisierung kann sowohl durch Modifizierung der Materialoberfläche als auch des Integrinliganden oder Mimetikums erfolgen.

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien, die Möglichkeiten ihrer Funktionalisierung und Anwendung sowie wichtige Aspekte der Oberflächenbeschichtung näher beschrieben.

#### 2.6.1 Grundlagen Biomaterialien

Biomaterialien sind so vielfältig und vielseitig wie ihre Anwendungsgebiete, zu denen z.B. die Implantationsmedizin und die Unfallchirurgie<sup>[213]</sup> ebenso zählen wie die Zell- und Gewebekultivierung (*tissue engineering*),<sup>[33]</sup> die DNA-Chiptechnik<sup>[214, 215]</sup> oder die mechanistische oder molekularbiologische Untersuchung des Zellverhaltens.<sup>[216]</sup> Die physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften differieren je nach Anforderungsprofil bzw. Einsatzgebiet. Der Materialcharakter kann durch physikalische (z.B. sintern, schleifen) oder / und chemische (z.B. ätzen, oxidieren, pegylierung) Prozesse sowie oberflächliche Modifizierung (Beschichtung mit gleichen oder anderen Materialien z.B. durch *grafting* oder *chemical vapor deposition* (CVD), adsorbierte Proteine, adhärenzte Zellen) verändert werden.<sup>[34]</sup> Heutzutage verwendete Werkstoffe sind zumeist Hybride, die die besten Eigenschaften verschiedener Materialien kombinieren.<sup>[217]</sup>

Materialien reagieren im Kontakt mit biologischen Systemen (Gewebe, Zellen) oder deren Bestandteilen verschieden und werden häufig in bioinerte, biokompatible und bioaktive Materialien unterteilt.<sup>[218]</sup> Bioinerte Werkstoffe zeichnen sich durch eine geringe Wechselwirkung zwischen Material und angrenzendem Gewebe aus, was beim Einsatz in der Implantationsmedizin ihr Nachteil ist. Biokompatible Materialien hingegen wechselwirken mit den sie umgebenden Zellen und Geweben, woraus eine mechanische Stabilisierung resultiert. Bioaktive Materialien stehen aufgrund ihrer Oberflächenstrukturierung oder / und -funktionalisierung in ausgeprägter Interaktion mit Geweben.

Man kann Biomaterialien aber auch im Hinblick auf ihre mechanische Stabilität bzw. Flexibilität unterscheiden, ebenso wie aufgrund ihrer Lebensdauer im Kontakt

mit lebenden Systemen – permanente (biostabile) und temporäre (abbaubare) Materialien.

Polymere haben eine weite Verbreitung im Anwendungsgebiet der Biomaterialien erlangt,<sup>[33, 34]</sup> da ihre Eigenschaften durch geschickte Wahl der Polymerisationsparameter (Monomer, Polymerisationsgrad, Vernetzungsgrad, Polymerverteilung, Taktizität, Additive, Copolymere, *grafting*) gezielt modifiziert werden können. Ein Vertreter ist das Poly(methylmethacrylat) (PMMA), welches durch radikalische Block-, Emulsions- oder Suspensionspolymerisation aus Methylmethacrylat hergestellt werden kann.<sup>[218]</sup> Der häufigste Vertreter ist Plexiglas. PMMA ist biostabil und wird von Geweben oder im Körper nicht resorbiert. Es gehört neben ultrahochmolekularem Polyethylen (UHMWPE) und Silikon zu den drei meistverwendeten Polymermaterialien in der orthopädischen Chirurgie.<sup>[219]</sup>

Anwendung findet PMMA in der Implantationsmedizin als Knochenzement Palacos<sup>®</sup>, der aus PMMA-Oligomeren, Methylmethacrylat und dem Radikalstarter Dibenzoylperoxid besteht. Palacos<sup>®</sup> dient der Stabilisierung von Gelenkendoprothesen durch eine verbesserte mechanische Verankerung des Implantats im Knochen. Bei der Einzementierung des Implantats treten jedoch Temperaturspitzen auf, die ebenso wie nicht polymerisierte toxische Monomere und PMMA-Oligomere nachteilig auf das umliegende Gewebe einwirken.<sup>[220]</sup>

Als Knochenersatzmaterial auf Basis von Kalziumphosphatkeramiken werden hauptsächlich Trikalziumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) und Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5[(\text{OH})(\text{PO}_4)_3]$ ) eingesetzt. Sie gelten im Kontakt mit Knochen, der als anorganische Hauptkomponente Apatit ( $\text{Ca}_5[(\text{F},\text{OH},\text{Cl})(\text{PO}_4)_3]$ ) enthält, als bioaktiv und biokompatibel.<sup>[221]</sup> Hydroxylapatit kann vollsynthetisch hergestellt oder durch Sintern aus natürlichem Kalziumkarbonat gewonnen werden.

Letzteres besitzt bereits eine gewisse Porosität, die auf die Gerüststruktur von Korallen (Biocoral<sup>®</sup>, Interpore<sup>®</sup>) oder Kalkalgen zurückzuführen ist.<sup>[218, 222]</sup> Kalzinierte Rinderknochen werden ebenfalls als Knochenersatzmaterial verwendet, wobei Apatitnanokristalle zu größeren Aggregaten zusammensintern (Endobon<sup>®</sup><sup>[223]</sup>, Pyrost<sup>®</sup><sup>[224]</sup>).

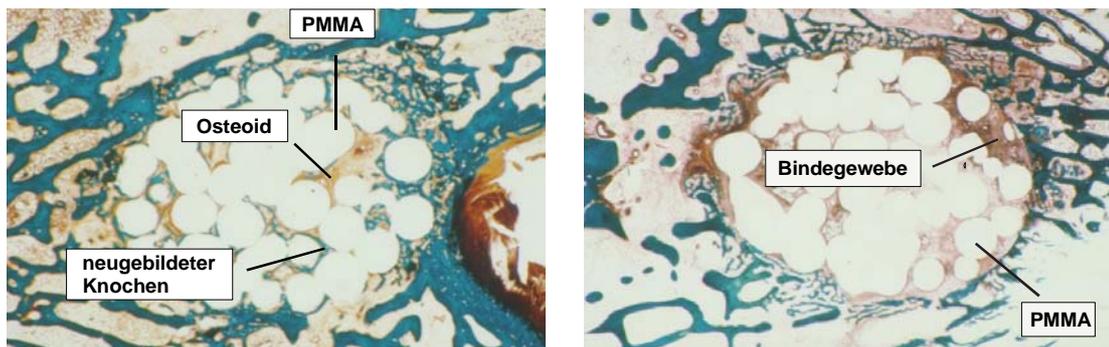
Metalle und ihre Legierungen werden ebenfalls als Biomaterialien genutzt. Rostfreier Stahl, Titan<sup>[225]</sup> und seine Legierungen (Ti6Al4V, Ti6Al7Nb, Ti5Al13Ta)<sup>[226-228]</sup> finden vor allem in der Gelenkendoprothetik Anwendung. Gold wird häufig in der Zahnmedizin verwendet, wie auch zur Strukturierung von Oberflächen zur Untersuchung von molekularbiologischen Prozessen (z.B. Zelladhäsion,<sup>[216]</sup> Sensorik<sup>[229]</sup>) oder bioelektronischen Anwendungen.<sup>[230, 231]</sup>

Silizium findet zunehmend in der Sensorik Interesse,<sup>[229, 230, 232, 233]</sup> da die Halbleitertechnologie zur Herstellung komplexer elektronischer Strukturen auf kleinstem Raum befähigt ist.<sup>[234]</sup> Im Kontakt mit Zellen verhalten sich amorphes hydrogenisiertes Silizium (a-Si:H)<sup>[235]</sup> und ozonisierte Silizium-Suboxidoberflächen biokompatibel.<sup>[236]</sup> Modifizierte a-Si:H-Oberflächen können zukünftig in der Biosensorik und Bioelektronik zum Auslesen biochemischer Prozesse, z.B. von Ionentransporten in Zellen, verwendet werden. Verglichen mit bereits etablierten Verfahren auf der Basis von einkristallinem Silizium haben sie aufgrund der größeren Bandlücke (1,8 eV vs. 1,1 eV) den Vorteil, dass das elektronische Hintergrundrauschen bei Anwendungen im Bereich der Raumtemperatur drastisch sinkt.<sup>[236]</sup>

Oberflächenmodifizierte Gläser besitzen ebenfalls Potential zur Anwendung im Bereich der Biosensorik<sup>[237-241]</sup> und aufgrund ihrer veränderten peptid- und proteinadsorbierenden Eigenschaften in der Implantationsmedizin.<sup>[242]</sup>

### 2.6.2 Beschichtung von Oberflächen mit künstlichen Integrinliganden

Die Steigerung der Zelladhäsion auf Werkstoffen kann verschiedene Vorteile bieten. In der Medizin kann z.B. die Stimulierung der Makrophagenadhäsion gezielt hervorgerufen werden,<sup>[243]</sup> welche den Abbau von Wundnähten oder resorbierbaren Schrauben potentiell beschleunigen kann, während Implantate durch gezieltes Ansprechen von Osteoblasten / Osteoclasten schneller in Knochen einwachsen und



**Abbildung 2.6.1** Vergleich zweier Querschnitte durch PMMA-Implantate, zwei Wochen nach der Implantation in das Patella-Gleitlager der Femurkondyle von Kaninchen. links: PMMA-Kügelchen mit RGD-Beschichtung befinden sich in direktem Kontakt mit neuem Knochen (Osteoid). rechts: Bei fehlender Beschichtung wird das Implantat von einer Bindegewebschicht eingeschlossen. Vergrößerung 16x, Färbung nach Goldner-Masson. Farb-Index: weiß: PMMA-Kügelchen; blau: Knochen; hellbraun: neugebildeter Osteoid; dunkelbraun: Bindegewebe.<sup>[30]</sup>

vor der Einkapselung mit Bindegewebe geschützt werden (Abbildung 2.6.1).<sup>[30, 244-252]</sup> Strukturierte Oberflächen, auf denen zelladhäsive und zellrepulsive Bereiche aneinander grenzen, können zur Untersuchung von molekularbiologischen Prozessen wie der Integrinclusterung<sup>[253]</sup> oder für die Entwicklung von Sensoren verwendet werden.<sup>[229, 237, 254-256]</sup>

Zur Erhöhung der zelladhäsiven Eigenschaften von Oberflächen wurden synthetische Materialien zunächst mit natürlichen Integrinliganden wie Fibronectin, Collagen oder Laminin beschichtet.<sup>[7-9, 11-14]</sup> Gerade für medizinische Anwendungen ist die Verwendung von Proteinen nachteilig, da neben der aufwendigen Isolierung und Reinigung aus Fremdorganismen oder Zellkulturen unerwünschte Immunantworten (z.B. Thrombosen, Einkapselung) auftreten können und das Infektionsrisiko steigt. Entzündungen können durch den enzymatischen Abbau der Proteine hervorgerufen werden.<sup>[257]</sup> Adsorbierte<sup>[258-261]</sup> und kovalent gebundene Proteine<sup>[262, 263]</sup> müssen auch oberflächennah die richtige Konformation und Orientierung besitzen,<sup>[264]</sup> um ihren Zelladhäsion stimulierenden Charakter zu erhalten. Oft wird dieser durch die Strukturierung des Materials und dessen Hydrophobizität oder Oberflächenladung so beeinflusst,<sup>[260, 265-272]</sup> dass Denaturierung auftritt bzw. das Bindungsmotiv in einer anderen Konformation präsentiert wird und die Rezeptorbindung nicht stattfinden kann.<sup>[273, 274]</sup>

Künstliche Integrinliganden, die zur Stimulierung der integrinvermittelten Zelladhäsion eingesetzt werden, sind hauptsächlich Peptide.<sup>[26, 28, 34, 275-279]</sup> Sie besitzen eine höhere Toleranzgrenze gegenüber Sterilisation,<sup>[257]</sup> Hitzeeinwirkung, pH-Variation<sup>[280, 281]</sup> und enzymatischem Abbau (bei integrierten D-Aminosäuren und konformationeller Fixierung, die z.B. durch Zyklisierung erreicht werden kann).<sup>[26, 44, 45, 113, 275, 282]</sup>

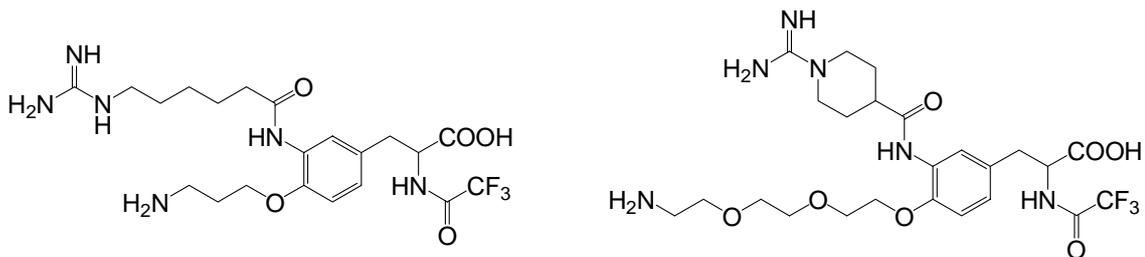
Aber auch nicht jede Peptidsequenz ist zur Stimulierung der Zelladhäsion auf Oberflächen geeignet. Voraussetzungen, die erfüllt sein sollten, um eine integrinvermittelte Zelladhäsion auf Oberflächen hervorzurufen, werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

### 2.6.2.1 Allgemeine Anforderungen

Die RGD-Sequenz ist Bestandteil der am häufigsten verwendeten Peptide zur Stimulierung von Zelladhäsion durch Integrinwechselwirkung.<sup>[34, 48, 276]</sup> Das RGD-Motiv, selbst die minimale Zelladhäsionssequenz,<sup>[35, 41, 283]</sup> ruft keine spezifische Zellantwort hervor, da es eine Vielzahl der unterschiedlichsten Rezeptoren anspricht

(Kapitel 2.2). Eine gerichtete Antwort kann nur dann erzielt werden, wenn ein (möglichst) selektiver Ligand mit hoher Rezeptoraffinität genutzt wird. Viele eher unspezifische lineare Peptide wie z.B. RGDS,<sup>[284]</sup> GRGD,<sup>[285-287]</sup> GRGDS,<sup>[277, 288, 289]</sup> YRGDG,<sup>[19, 243]</sup> GRGDSP<sup>[290-292]</sup> oder GRGDSPK<sup>[293-295]</sup> stimulieren auf unterschiedlichsten Materialien die Adhäsion verschiedener Zellen.<sup>[33, 34, 279]</sup> Erst in letzter Zeit werden vereinzelt integrinsubtypenspezifische Liganden auf Oberflächen immobilisiert, um gezielt bestimmte Zelltypen anzusprechen. Dazu zählen unter anderem die zyklischen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin selektiven RGD-Peptide vom Typ *cyclo(-RGDFX-)*<sup>[29, 30, 279]</sup> und *cyclo(-RGDEV-)*,<sup>[275]</sup> sowie die in Abbildung 2.6.2 dargestellten integrinselektive RGD-Mimetika.<sup>[32, 65, 296]</sup>

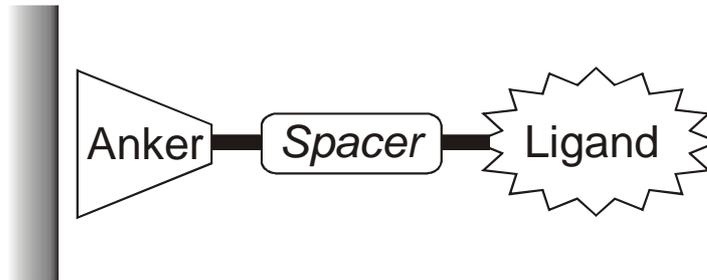
Vor allem bei Anwendungen in der Implantationsmedizin ist es von Bedeutung, dass nur ein bestimmter Zelltyp an die Implantatoberfläche adhärert, um den Aufbau eines homogenen Gewebes zu unterstützen und z.B. Kapselbildung vorzubeugen.



**Abbildung 2.6.2** Oberflächenadhäsive tyrosinbasierende RGD-Mimetika. links:  $\alpha_{IIb}\beta_3$  selektiv,<sup>[32, 65]</sup> rechts:  $\alpha_v\beta_3$  selektiv.<sup>[296]</sup>

Eine unzureichende Rezeptoraffinität eines Liganden kann nur bedingt durch die Erhöhung der immobilisierten Substanzmenge ausgeglichen werden. In verschiedenen Studien (XPS,<sup>[18, 297]</sup> Radiomarkierung,<sup>[28, 289, 298]</sup> Aminosäureanalyse<sup>[280, 299]</sup>) konnte gezeigt werden, dass die (maximale) Stimulierung der Zelladhäsion auf Oberflächen wie PMMA, Glas und anderen bei sehr geringen Peptiddichten (fmol/cm<sup>2</sup> bis pmol/cm<sup>2</sup>) auftritt. Eine Möglichkeit, die Zelladhäsion gegenüber monomeren Liganden zu steigern, liegt in der Verwendung von Multimeren, die durch Integrinclusterung eine verstärkte Zellantwort hervorrufen können.<sup>[300]</sup> Neueste Untersuchungen auf RGD-nanostrukturierten Oberflächen mit Osteoblasten konnten zeigen, dass Abstände von  $\leq 58$  nm zwischen zwei immobilisierten Liganden (*cyclo(-RGDFK-)*) ausreichen, um eine integrinvermittelte Adhäsion zu induzieren. Bei Abständen  $\geq 73$  nm wurde keine Zelladhäsion hervorgerufen.<sup>[253]</sup> Ältere Arbeiten über Fibroblastenadhäsion auf RGD-funktionalisiertem Glas zeigen hingegen,

dass ein Peptid-Peptid-Abstand von maximal 440 nm für eine  $\alpha\beta$ 3-integrinvermittelte Fibroblastenausbreitung ausreicht, jedoch zur Ausbildung fokaler Adhäsionspunkte ein Abstand von maximal 140 nm (gemittelt) erforderlich ist.<sup>[28]</sup> Hier wurden allerdings die Peptide statistisch auf der Oberfläche fixiert. Dabei ist es nicht ausgeschlossen, dass Stellen höherer Dichte auftreten. Der Wert von 140 nm ist über die Gesamtbelegung gemittelt.



**Abbildung 2.6.3** Schematische Darstellung eines oberflächenadhäsiven Integrinliganden, aufgebaut aus Ligandkopfguppe und Linkermolekül, bestehend aus Spacer und Anker.

Neben einem spezifischen Liganden ist die Wahl des *Linkers* wichtig, welcher zur Anbindung an das Material dient (Anker) und dabei eine gewisse Distanz zwischen der Oberfläche und dem Liganden erzeugt (*Spacer*) (Abbildung 2.6.3). In der Nähe der Oberfläche ist meist ein kurzer aliphatischer Linker (C3-C6) vorteilhaft, da eine maximal dichte Packung des Liganden aufgrund der Bildung von SAMs (*self-assembled monolayer*) generiert werden kann. Ob die Hydrophilie eines weiterreichenden Spacers einen Einfluss auf die Zelladhäsion besitzt, konnte bis jetzt nicht ermittelt werden. Aber gerade bei strukturierten Oberflächen, die durch Pegylierung partiell protein- und zellrepulsiv sind, könnten sich hydrophile Spacer durch bessere Wechselwirkung mit dem Material als vorteilhaft erweisen.

Aus unterschiedlichen Studien geht hervor, dass der Abstand eines künstlichen Integrinliganden vom Werkstoff stark von der Strukturierung der Materialoberfläche abhängt. Elastische Oberflächen wie z.B. Proteine (BSA) benötigen in der Regel keinen *Spacer*<sup>[29]</sup> im Gegensatz zu porösen oder stark gegliederten Materialien (z.B. PMMA). In der Literatur wird übereinstimmend eine effektive *Spacerlänge* von 3.0 - 3.5 nm (gestreckt) angegeben.<sup>[29, 162, 301]</sup>

Die Immobilisierung von Integrinliganden und Molekülen allgemein hängt meist von dem zu funktionalisierenden Material ab, wobei man zwischen adhäsivem, ionischem und kovalentem Charakter der Anbindung unterscheidet. Während die Moleküladsorption und die ionische Wechselwirkung von Material und Ligand gleichermaßen und / oder gleichzeitig ausgehen muss, können kovalente Bindungen durch

die Erzeugung oder den Einbau reaktiver Gruppen auf Seiten des Materials oder des zu immobilisierenden Liganden erfolgen. Dabei ist die Verwendung von hetero- oder homobifunktionalen *Linkern*, sogenannten *Crosslinkern*, möglich.

Adsorbierte RGD-Peptide sind nur schwach durch hydrophobe / hydrophile Wechselwirkungen an die Materialoberfläche gebunden.<sup>[230]</sup> Dies hat zur Folge, dass in Zelladhäsionsversuchen zumeist nur eine mäßige Stimulierung der Zellanbindung erzielt wird.<sup>[259, 262, 302-305]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur ionische und kovalente Immobilisierungsmethoden genutzt. In Abhängigkeit vom Material werden in den folgenden Kapiteln verschiedene Möglichkeiten der Oberflächenfunktionalisierung näher beleuchtet.

### 2.6.2.2 Immobilisierung auf Titan

Titanoberflächen haben eine gewisse Affinität zu Thiolen<sup>[306]</sup> und weisen nach Beschichtung mit RGD-Thiolpeptiden eine leicht verstärkte Zelladhäsion auf. Titan lässt sich auch analog zu Glas mit Alkoxysilanen funktionalisieren.<sup>[307]</sup> Die Alkoxygruppen des Silans werden dabei durch Hydroxygruppen an der Metalloberfläche substituiert. Über eine Aminogruppe des Silans wurde so mittels Maleinimidocarbonsäure-NHS-*Linker* das Peptidfragment CGGNGEPRGDTYNAY (aus BSP) angebunden. Dadurch konnte in serumfreiem Medium die Anhaftung und Spreitung von Osteoblasten auf Titan gesteigert werden.<sup>[308]</sup> Eine nach derselben Methode mit GRGDSPYG<sub>5</sub>C funktionalisierte Titanoberfläche stimulierte Knochenzellen zu höherer Produktion von ECM-Molekülen und Osteoclasten-Differenzierungsfaktoren.<sup>[309]</sup> Auch *cyclo(-RGDfK[Mercaptopropionyl]-)* konnte auf diese Weise auf Titan immobilisiert werden.<sup>[310]</sup> Das gleiche Peptid kann über die Thiolfunktion auch direkt an Titan gebunden werden. Derart behandelte Implantate zeigten im Tierversuch ein verringertes Wachstum von fibrösem Gewebe, eine signifikant erhöhte Knochendichte am Implantat und eine erhöhte mechanische Stabilität.<sup>[311]</sup>

Analog zur Beschichtung mit funktionalisierten Alkoxysilanen wurde auch ein Verfahren zur Titanbeschichtung mit funktionalisierten Phosphonaten vorgestellt. An auf der Titanoberfläche immobilisierte Phosphonatmoleküle mit Aminogruppe in der Seitenkette wurden über einen Maleinimidocarbonsäure-NHS-*Linker* RGD-Peptide angebunden und so die Adhäsion von Osteoblasten an die Titanoberfläche stimuliert.<sup>[312]</sup> Eine weitere Technik zur Funktionalisierung von Titanoberflächen ist

die Abscheidung und der Einbau von phosphat- und phosphonathaltigen Peptiden auf einer anodisch erzeugten Titandioxidschicht. Nach diesem Verfahren wurden von Bernhardt *et al.* TiAl6V4-Stifte mit dem obengenannten Phosphonatpeptid beschichtet. In Tierversuchen wurde um diese Titanstifte eine verstärkte Knochenneubildung nachgewiesen.<sup>[313]</sup> Durch die anodische Oxidation wurde von Schliephake *et al.* Collagen I mit in die Oxidationsschicht eingebaut, an dieses konnte dann photochemisch *cyclo*(-RGDfK[Ahx-Ahx-Acryloyl]-) angebunden werden. Die Implantate wurden Fuchshunden in den Kieferknochen eingesetzt. Nach drei Monaten zeigte sich bei allen Implantaten mit organischer Zwischenschicht ein erhöhter Knochen-Implantat-Kontakt, der durch die RGD-Peptide nicht signifikant gesteigert werden konnte. Allerdings weist auch die Collagenschicht das RGD-Motiv auf, so dass auch dadurch schon eine verbesserte Biokompatibilität gegeben ist.<sup>[314]</sup> Mit CDI können die Peptide über den *N*-Terminus auch direkt kovalent an die OH-Gruppen der Titanoxidschicht gebunden werden.<sup>[315]</sup>

### 2.6.2.3 Immobilisierung auf Gold

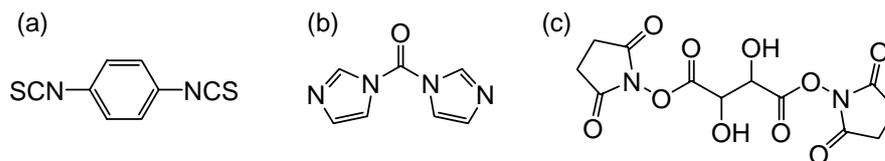
Gold wird üblicherweise mit Molekülen beschichtet, die eine Thiolankergruppe tragen. Der Mechanismus der Anbindung des Thiols an die Goldoberfläche ist noch nicht geklärt,<sup>[316]</sup> die Gold-Schwefel-Anbindung ist jedoch ausreichend stabil für eine Beschichtung.<sup>[317]</sup> So konnte z. B. das Peptid GRGDS über einen Thiollinker auf Oligoethylenglycolbasis auf einer Goldoberfläche immobilisiert werden und die Adhäsion von Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren.<sup>[318, 319]</sup> Durch die Beschichtung einer Goldoberfläche mit Molekülen, die sich in einer monomolekularen Schicht organisieren (SAM), lassen sich Oberflächenbeschichtungen mit definierten zelladhäsiven Eigenschaften erzeugen: In der Arbeitsgruppe um Whitesides wurden zunächst SAMs mit antiadhäsiven PEG-Alkylthiolen hergestellt. Durch die Zugabe von GRGDS-PEG-Alkylthiolen konnte mit steigender Konzentration von RGD-Verbindung ein Übergang von schwach angehefteten bis hin zu gespreiteten Zellen beobachtet werden.<sup>[319]</sup> Sind die GRGDS-PEG-Alkylthiole kürzer als die umgebenden PEG-Alkylthiole, ist die RGD-Sequenz für die Zelle nicht erreichbar und es findet keine Adhäsion mehr statt.<sup>[320]</sup>

### 2.6.2.3 Immobilisierung auf Silizium

Die Adhäsion von Zellen an Silizium-Oberflächen findet starke Beachtung in der Chipstechnologie. Die erfolgreiche Beschichtung von amorphem Silizium mit einem von C. Dahmen synthetisierten *cyclo*(-RGDfK-)-Peptid mit Pentenoylanker konnte durch ELISA bestätigt werden.<sup>[321]</sup>

### 2.6.2.4 Immobilisierung durch kovalente Anbindung

Aminoanker können kovalent an Materialien angebunden werden, sofern diese reaktive Gruppen aufweisen.<sup>[230, 322, 323]</sup> Carboxylterminierte Oberflächen sind nach Bildung eines Aktivesters zur Kupplung mit aminofunktionalisierten Spezies befähigt. Die Immobilisierung von Molekülen kann auch durch das Einführen eines *Crosslinkers*, der Oberfläche und Molekül über einen zusätzlichen *Spacer* miteinander verbindet, ermöglicht werden. Bis-Isothiocyanate, *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) und Disulfosuccinimidyltartrate (DST) sind nur einige Vertreter (Abbildung 2.6.4). Mittels aktivierter Maleinimidocarbonsäuren werden beispielsweise wenig oder nicht zelladhäsive Proteinoberflächen mit freien Aminogruppen wie BSA (*bovine serum albumin*), OVA (*ovalbumin*) oder Collagen mit Thiolverbindungen funktionalisiert.<sup>[180, 324-327]</sup> Die Beschichtung natürlicher oder naturähnlicher Polymere mit Peptiden, die die RGD-Sequenz enthalten, ist in einer Vielzahl von Publikationen näher beschrieben.<sup>[33, 34, 328]</sup> Als Template können die unterschiedlichsten proteinadhäsiven Materialien dienen, auf denen die Proteinschicht nur durch Adsorption verankert wird.



**Abbildung 2.6.4** Reagenzien zur kovalenten Anbindung (a) *p*-Phenyldiisothiocyanat, (b) *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) und (c) Disulfosuccinimidyltartrat (DST).

Die direkte kovalente Funktionalisierung einiger wichtiger Biomaterialien wird im Folgenden näher beschrieben, wobei einige Beispiele für die Modifizierung mit RGD-Peptiden aufgezeigt werden.

Polymere wurden in der Vergangenheit wohl am häufigsten mit zelladhäsionssteigernden RGD-Peptiden beschichtet.<sup>[34]</sup> Polyacrylate, die als Biozemente eingesetzt werden, können verschiedentlich kovalent mit RGD-Peptiden modifiziert werden. Durch Copolymerisation können Aktivester<sup>[329, 330]</sup> oder andere funktionelle

Gruppen<sup>[289, 331, 332]</sup> in den Werkstoff eingeführt werden, die nach den bereits beschriebenen Methoden modifiziert werden. RGD-Peptide mit Acrylamidankern lassen sich direkt durch Copolymerisation<sup>[261]</sup> oder im Anschluss an die Aushärtung des Materials durch unumgesetzte Radikale in das Material integrieren. Letzteres gelingt nicht mit weniger aktivierten olefinischen Ankergruppen wie z.B. Pent-4-ensäurederivaten.<sup>[333]</sup>

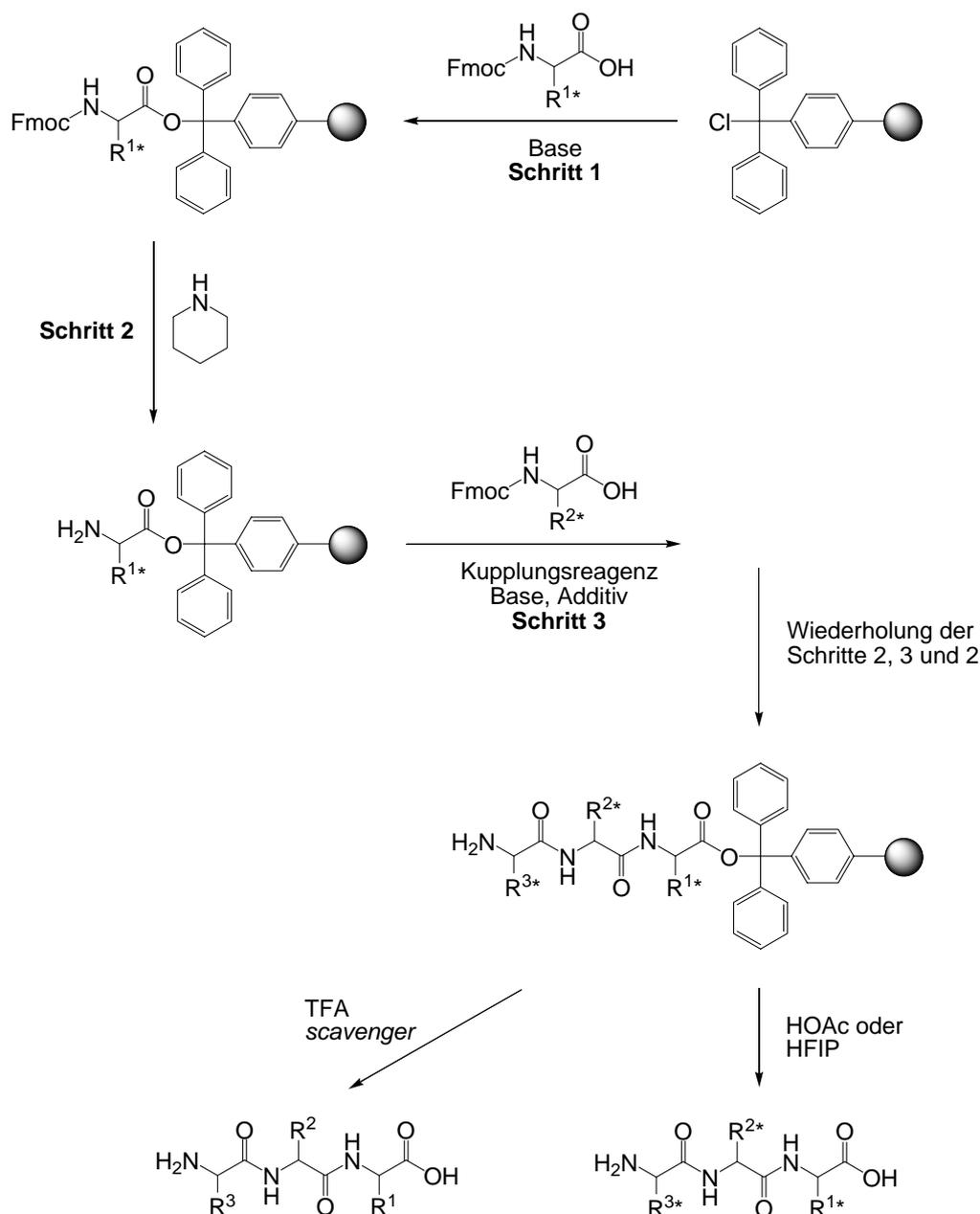
Glas wird für die Peptidbeschichtung zunächst mit Alkyltrialkoxysilanen silanisiert, die auch funktionelle Gruppen (Amino-,<sup>[334, 335]</sup> Epoxy-,<sup>[27, 28]</sup> oder Thiolfunktionen<sup>[230]</sup>) enthalten können. An aminofunktionalisierte Gläser können durch o.g. Methoden Moleküle kovalent angebunden werden. Epoxygruppen eignen sich zur Immobilisierung von Verbindungen mit freien Aminogruppen,<sup>[336]</sup> während an unsubstituierte Silane Moleküle mit olefinischer Ankergruppe anbinden (thermisch<sup>[337-344]</sup> oder photochemisch induzierte<sup>[345-347]</sup> Hydrosilylierung). Die Funktionalisierung von einkristallinem, polykristallinem und porösem Silizium mit kleinen organischen Molekülen ist bekannt, wobei zumeist mehrstufige Additions- und Substitutionsreaktionen an der Oberfläche durchgeführt werden müssen.<sup>[348-351]</sup> In der Literatur sind zahlreiche Beispiele für die Beschichtung von Gläsern mit RGD-Peptiden bekannt.<sup>[28, 212, 258, 352-359]</sup>

### 2.7 Prinzipien der Peptidsynthese

Die Bedeutung von Peptiden für die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Biopolymeren wurde bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts erkannt. Entsprechend früh wurden dann auch von E. Fischer und T. Curtius die Grundlagen für eine chemische Synthese von Peptiden in Lösung erarbeitet.<sup>[360, 361]</sup> Erst durch die Einführung urethanischer Schutzgruppen durch Bergmann konnte das Problem der Racemisierung überwunden werden und führte zum Durchbruch in der Peptidsynthese.<sup>[362]</sup> Für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide wird die von Merrifield entwickelte Strategie der Festphasenpeptidsynthese (SPPS) verwendet.<sup>[363, 364]</sup> Bei dieser Technik wird die Peptidkette sequenziell an einem festen Träger aufgebaut, indem eine mit einer temporären Schutzgruppe für die Aminogruppe und einer permanenten Schutzgruppe für die Seitenkette geschützte Aminosäure an eine *N*-terminal entschützte, festphasengebundene Aminosäure gekuppelt wird. Die Vorteile dieser Methode bestehen im Wesentlichen darin, dass durch hohe Reagenzienüberschüsse die Kupplungsreaktion fast quantitativ verläuft und dass die überschüssigen Reagenzien von dem jeweiligen harzgebundenen Ziel-

## 2 Biologischer Hintergrund

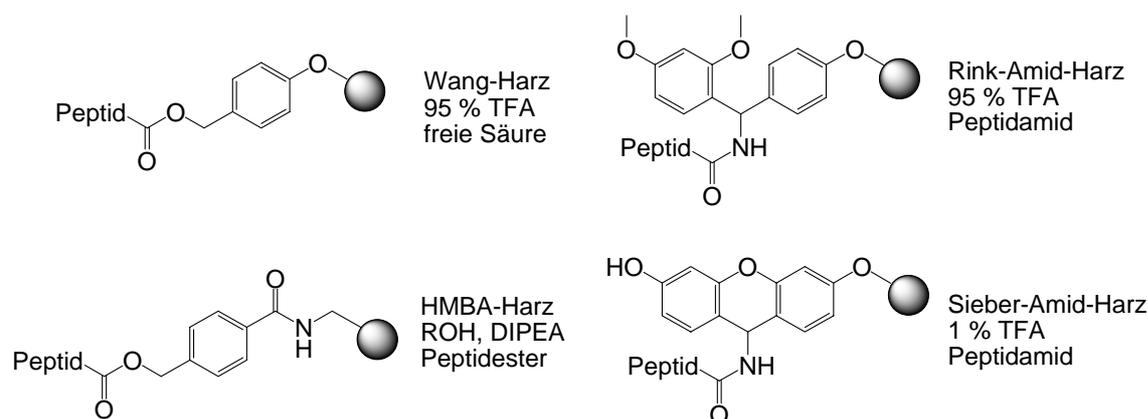
molekül durch einfache Filtration entfernt werden können. Dabei kommt die von Carpino *et al.* entwickelte Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Schutzgruppenstrategie zum Einsatz, wie sie in Abbildung 2.7.1 dargestellt ist.<sup>[365-367]</sup> Vorteil dieser Methode ist, dass die Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe unter milden Bedingungen mit einer 20%igen Piperidinlösung in NMP (Schritt 2) orthogonal zu den säurelabilen Seitenketten-schutzgruppen und der Peptidverankerung erfolgt.



**Abbildung 2.7.1** Darstellung der Synthesestrategie von Peptiden an fester Phase nach Merrifield und Carpino unter Verwendung des Trityllinkers. Die Abspaltung des Peptids vom festen Träger in Schritt 4 erfolgt entweder unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen (\*) unter schwach sauren Bedingungen (z. B.  $\text{HOAc}$  oder  $\text{HFIP}$ ) oder durch simultane Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen mittels TFA.

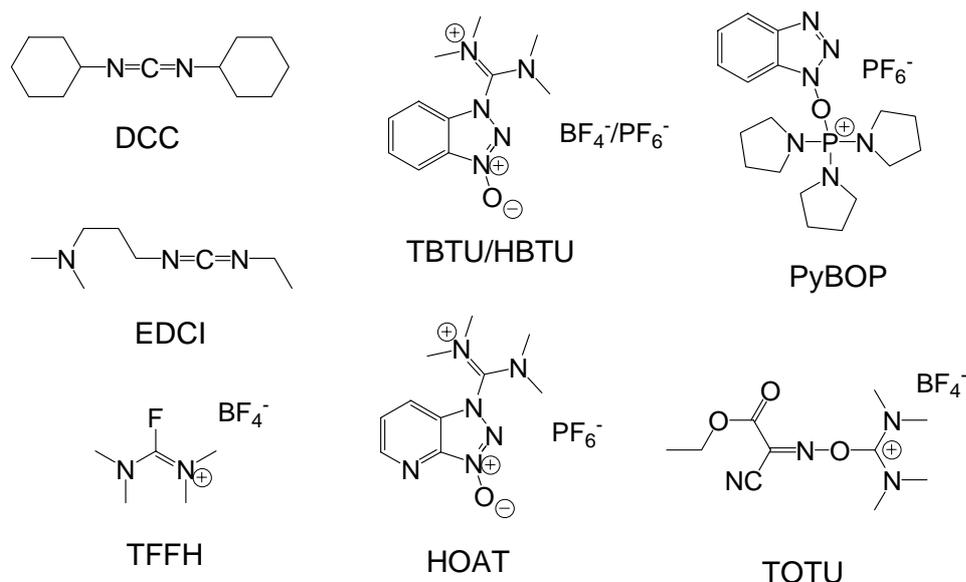
## 2 Biologischer Hintergrund

Die Verankerung der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure am Harz (Schritt 1) erfolgt über ein zu den Kupplungsbedingungen orthogonales *Linkermolekül*, dessen Bindung zum Peptid erst bei der Peptidabspaltung vom Harz gebrochen wird. Dabei haben sich neben dem in dieser Arbeit verwendeten *Trityllinker*,<sup>[368, 369]</sup> die in Abbildung 2.7.2 dargestellten *Linker* in der chemischen Festphasensynthese als besonders verlässlich für die Synthese modifizierter Peptide herausgestellt.<sup>[370, 371]</sup>



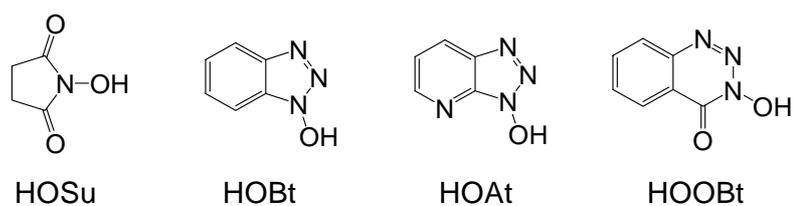
**Abbildung 2.7.2** Auswahl an Linkern, die sich in der Festphasensynthese von Peptidderivaten bewährt haben, mit Angabe der Abspaltbedingungen und des zu erwartenden Peptidderivats.

Die Aktivierung der zu kuppelnden Fmoc- und seitenkettengeschützten Aminosäure erfolgt mittels schwacher organischer Basen (z. B. durch *N,N,N*-Diisopropylethylamin) und Aktivierungsreagenzien (siehe Abbildung 2.7.3),<sup>[372-374]</sup> die *in situ* im ersten Schritt der Reaktion eine hochreaktive Acyluronium oder -phosphonium-Spezies erzeugen. Im zweiten Schritt wird diese durch den nucleophilen Angriff von Fluorid, Bromid, HOBt oder HOAt in das Säurehalogenid bzw. in den Aktivester umgewandelt, welches/r dann letztendlich mit dem entschützten *N*-Terminus des harzgebundenen Peptids zum Amid reagiert (Schritt 3). Neben den *in situ* Reagenzien, die überwiegend in der automatisierten Peptidsynthese verwendet werden, werden auch bereits voraktivierte Aminosäurederivate eingesetzt, wie z. B. symmetrische Anhydride, *N*-Carboxyanhydride (NCA), Pentafluorphenolester oder Säurehalogenide.<sup>[367, 375, 376]</sup> Unter den verschiedenen Kupplungsreaktionen weisen OAt-Aktivester, symmetrischen Anhydride und Aminosäurehalogenide die größte Reaktivität auf, während die Aminosäurefluoride ganz besonders für sterisch gehinderte Kupplungen, wie z. B. zwischen  $\alpha$ -disubstituierten Aminosäuren (z. B. Aminoisobuttersäure) geeignet sind.<sup>[377-379]</sup>



**Abbildung 2.7.3** Kupplungsreagenzien für die *in situ* Aktivierung von Aminosäuren. (Review siehe [380])

Die in den ersten Reaktionsschritten der Aktivierung gebildeten Acyl-Onium-Verbindungen racemisieren leicht, sodass diese durch den Zusatz von Additiven (Abbildung 2.7.4) in die entsprechenden, stabileren Aktivester überführt werden müssen, bzw. das Reaktionsgleichgewicht zu diesen verschoben werden muss.<sup>[381, 382]</sup> Gleichzeitig müssen sterisch gehinderte bzw. sehr schwache Basen wie Collidin eingesetzt werden, um unerwünschte Racemisierungen z. B. von Cystein zu vermeiden.<sup>[383-385]</sup>



**Abbildung 2.7.4** Gebräuchliche Additive für die Kupplung von *in situ* aktivierten Aminosäurederivaten. Die Effizienz in der Unterdrückung der Racemisierung nimmt von links nach rechts zu.

## 2 Biologischer Hintergrund

Als permanente Seitenkettenschutzgruppen für die Fmoc-Aminosäuren kommen folgende Schutzgruppen zum Einsatz, die allesamt TFA-labil sind:

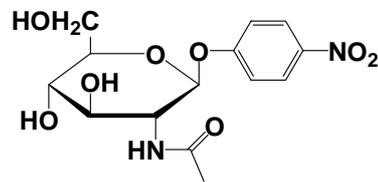
**Tabelle 2.4** Seitenkettenschutzgruppen für Aminosäuren.

Aminosäure	Schutzgruppe
Serin, Threonin	<i>tert.</i> -Butylether (tBu)
Aspartat, Glutamat	<i>tert.</i> -Butylester (O <sup>t</sup> Bu), Benzylester (OBn)
Cystein, Asparagin, Glutamin, Histidin	Triphenylmethyl (Ttt)
Tryptophan	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl (Boc)
Lysin	<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl (Boc), 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)-3-methylbutyl (ivDde), Benzoxy carbonyl (Z)
Arginin	N <sup>α</sup> -(2,2,4,6,7)-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) <sup>[386]</sup>

Die Peptidabspaltung vom Harz (Schritt 4) erfolgt im Fall des Trityllinkers durch Behandlung mit schwachen Säuren wie Hexafluorisopropanol (HFIP)<sup>[387]</sup> oder Essigsäure in Dichlormethan, wenn die Seitenkettenschutzgruppen erhalten bleiben sollen. Zur Abspaltung vom Harz unter gleichzeitiger, vollständiger Entschützung des Peptids verwendet man Trifluoressigsäure. Die bei der sauren Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen entstehenden Carbokationen müssen dabei mittels geeigneter *scavenger* abgefangen werden, um die irreversible Alkylierung nucleophiler Aminosäureseitenketten zu unterdrücken. Als Abspaltmischung kommen dabei Mischungen aus TFA und unterschiedlichen Anteilen an *scavengern* wie Wasser, Thioanisol, Ethandithiol oder Phenol zum Einsatz.<sup>[388]</sup> Mittlerweile hat sich Triisopropylsilan (TIPS) zusammen mit geringen Mengen an Wasser in TFA als Abspaltmischung der Wahl etabliert, da es geruchlos ist und Carbokationen sehr effektiv abfängt.<sup>[389]</sup> Für die Cyclisierung von seitenkettengeschützten Peptiden wird im Normalfall die Azidmethode verwendet, nach der der Ringschluß über eine Amidbildung mit Hilfe von Diphenylphosphorsäureazid (DPPA) und Natriumhydrogencarbonat in DMF erfolgt.<sup>[390]</sup> In diesem Fall wird die Reaktion unter Anwendung des Verdünnungsprinzips durchgeführt, wobei durch Konzentrationen von 10<sup>-3</sup> M die Bildung von Dimeren und höheren Oligomeren unterdrückt werden soll.

### 2.8 Bestimmung der Zahl adhärenter Zellen

Die Wirksamkeit der einzelnen Beschichtungen wurde in der vorliegenden Arbeit durch Adhäsionsversuche mit verschiedenen Zelllinien überprüft. Die Anzahl der adhärenter Zellen wurde dabei meist durch die Aktivität des lysosomalen Enzyms Hexosaminidase ( $\beta$ -*N*-Acetyl-D-hexosaminide-*N*-acetylhexosaminohydrolase, EC 3.2.1.52) bestimmt. Hexosaminidase spaltet von *p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl- $\beta$ -D-glucoseaminide (Abbildung 2.8.1) die Nitrophenolgruppe ab, die Menge an freiem Nitrophenol kann dann anschließend photometrisch gemessen werden. Da die Hexosaminidase-Aktivität proportional zur Zellzahl ist, kann so mit Hilfe einer Standardkurve die Zahl adhärenter Zellen bestimmt werden.<sup>[391]</sup>



**Abbildung 2.8.1** Struktur von *p*-Nitrophenyl-*N*-acetyl- $\beta$ -D-glucoseaminide.



# 3 Peptidische Integrinliganden: Design, Synthese und biologische Evaluierung

Im folgenden Kapitel wird die Synthese von oberflächenadhäsiven Peptiden beschrieben. Die modifizierten Peptide werden zur Beschichtung künstlicher Oberflächen verwendet, um die Zelladhäsion auf bereits als Implantat genutzten Materialien zu erhöhen bzw. auf normalerweise wenig oder gar nicht zelladhäsiven Oberflächen zu stimulieren. Die Peptide wirken hierbei als hochaffine Integrinliganden.

Die Testung der Integrinaffinität und -selektivität erfolgte, soweit nicht anders angegeben, im Labor von Dr. S. L. Goodman bei der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Beschichtung der Oberflächen sowie die biologische Charakterisierung der modifizierten Oberflächen bei der Firma *Biomet Deutschland GmbH*, Darmstadt unter der Leitung von Dr. A. Enderle und Dr. D. Zukowski oder am Lehrstuhl für Biophysik (E22), Department Physik, TUM von Gabi Chmel durchgeführt.

## 3.1 Allgemeine Strategie

Für die Beschichtung der Oberflächen wurden Konjugate bestehend aus einem peptidischen Integrinliganden und einem *Linkersystem* synthetisiert. Als hochaffine und selektive  $\alpha v\beta 3$ - /  $\alpha v\beta 5$ -Liganden dienten die zyklischen Pentapeptide *cyclo(-RGDfK-)* **Z1** und *cyclo(-RGDfE-)* **Z3**. Die Zyklopeptide *cyclo(-R $\beta$ ADfK-)* **Z2**

und *cyclo*(-R $\beta$ ADfE-) **Z4**, die eine sehr viel geringere Affinität aufweisen, wurden in Konjugate integriert, die als Negativkontrollen verwendet werden sollten. Als Liganden für andere Integrine wurden die zyklischen Hexapeptide **Z7**, **Z8** und **Z9** und lineare Sequenzen eingesetzt. Die *Linker* setzten sich in der Regel aus einem *Spacer*, der sowohl in Länge, Hydrophilie (z.B.  $\epsilon$ -Aminohexansäure, Oligoethylenglykolaminocarbonsäure) als auch dem Einbau von Verzweigungseinheiten (z.B. L-Lysin) variieren kann und einem oberflächenspezifischen adhäsiven Anker zusammen.

Die verwendeten Zyklopeptide wurden als orthogonal geschützte lineare Peptide nach der Fmoc-Strategie an der festen Phase aufgebaut,<sup>[363, 368, 392]</sup> in Lösung zyklisiert<sup>[33, 392]</sup> und anschließend durch Hydrierung partiell entschützt. Die Synthese der Zyklopeptide ist im Multigrammaußmaßstab möglich.<sup>[333]</sup>

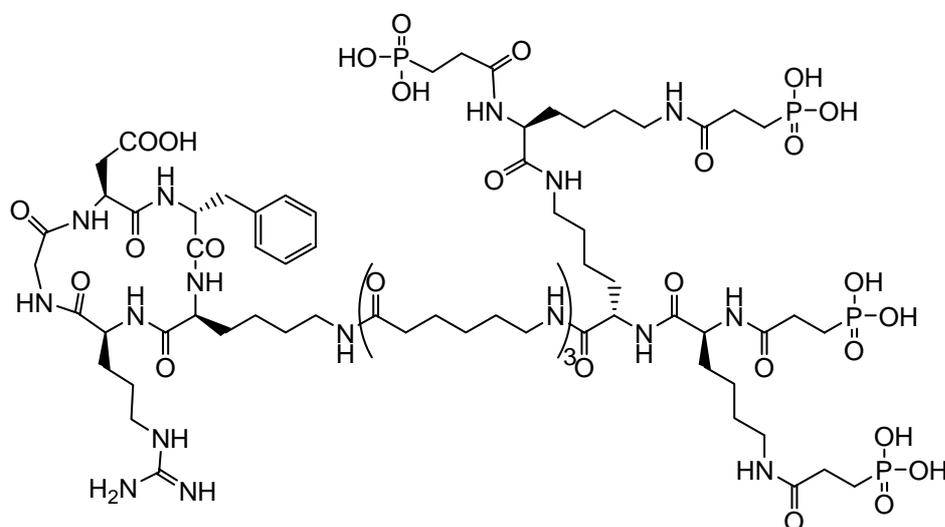
Mehrstufige *Linkersynthesen* erfolgten ebenfalls festphasenunterstützt mit TBTU<sup>[373, 393]</sup> / HOBt<sup>[384, 394]</sup> / DIPEA. Die Peptide wurden durch Fragmentkuppelung über eine Amidbindung in Lösung oder an fester Phase an den *Linker* gekuppelt. Anschließend wurden die Konjugate mit TFA entschützt und mittels RP-HPLC aufgereinigt. Der Erhalt der Integrinaffinität und -selektivität wurde durch Affinitätsstudien gegen die Integrine  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 5$ ,  $\alpha v \beta 6$  und  $\alpha II b \beta 3$  bzw. einem Zelltest bei  $\alpha 4 \beta 7$  bestätigt.

## 3.2 Zyklische RGD-Peptide mit Phosphonatanker

Die irreversible Beschichtung von Kalziumphosphaten wie Hydroxylapatit mit Peptiden ist bekannt. Die Anbindung ist ionischer Art und kann durch saure Ankergruppen erfolgen. Polyanionische Anker, welche Oligophosphonsäuren,<sup>[313, 333]</sup> Polyglutamate<sup>[395, 396]</sup> oder Peptidsequenzen mit Phosphoserin<sup>[397]</sup> und Glutamat<sup>[398, 399]</sup> enthalten, dienen dabei zur Immobilisierung von RGD- und anderen Peptiden.

3-Phosphonopropionsäure wurde in einem dendritischen Linkersystem verwendet, um eine ausreichende Anzahl von sauren Ankergruppen zu erzeugen. M. Kantelehn führte hierzu erste Synthesen von RGD-Peptiden durch, die einen *Spacer* bestehend aus  $\epsilon$ -Aminohexansäuren oder 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (Triethylenglykolaminocarbonsäure) und zwei Generationen der Verzweigungseinheit L-Lysin besaßen.<sup>[333]</sup> Weitere Untersuchungen an der Synthese wurden von C. Dahmen durchgeführt.<sup>[400]</sup> Bei biologischen Testungen fiel die Verbindung *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx<sub>3</sub>-K-(K-Phosphonopropionyl)<sub>2</sub> **PC1** (Abbildung 3.2.1) auf, weil sie die Osteoblastenadhäsion sowohl auf Hydroxylapatit als auch auf Titan erfolg-

reich stimulieren konnte.<sup>[401]</sup> Die Zulassung zur Verwendung der resultierenden biofunktionalisierten Implantatmaterialien in der Humanmedizin wird zur Zeit von der Firma *Biomet Deutschland GmbH* verfolgt.



**Abbildung 3.2.1** Schematische Darstellung des Phosphonatpeptids *cyclo(-RGDfK)-Abx-Abx-Abx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> PC1*.

Die Phosphonsäuregruppen wurden hier durch 3-Diethylphosphonopropionsäure<sup>[400, 401]</sup> eingeführt. Wie von C. Dahmen beschrieben, lässt sich die vollständig geschützte Verbindung **PC1\*** in guten Ausbeuten erhalten. Die Entschützung der Phosphonatpeptide verlief allerdings nicht reproduzierbar und wurde daher näher untersucht. Die Spaltung der Phosphonsäureester erfolgte in TMSBr / CHCl<sub>3</sub> (1:10) über drei Tage und anschließender wässriger Aufarbeitung.<sup>[333, 395, 396]</sup> Die Abspaltung der permanenten Seitenkettenschutzgruppen von **PC1\*** wurde mittels 95 % TFA / Wasser erzielt. Bereits nach der Phosphonsäureentschützung konnte vollständig entschütztes Phosphonatpeptid **PC1** im <sup>1</sup>H-NMR- und ESI-Massenspektrum in geringen Ausbeuten nachgewiesen werden. Die Verlängerung der Reaktionszeit führte nicht in ausreichender Menge zu der gewünschten Verbindung **PC1**. Nebenreaktionen traten immer dann auf, wenn das TMSBr vor der Umsetzung nicht farblos war, sondern bereits orangebraune Spuren von Bromwasserstoff aufwies. Die Massendifferenz des häufigsten Nebenproduktes betrug [m+18]<sup>+</sup>.

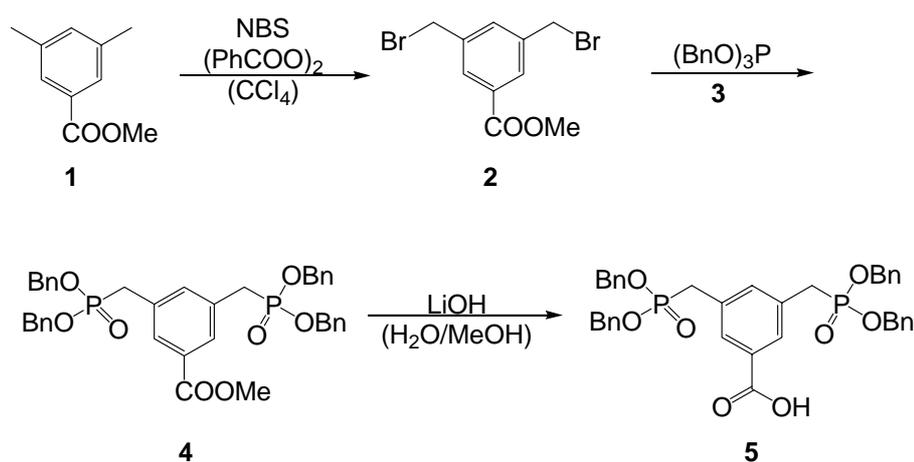
Der Versuch der vollständigen Entschützung des Phosphonatpeptids **PC1\*** allein mit 95 % TFA / Wasser resultierte in einem Gemisch aus Peptiden mit partiell geschützten Phosphonatankern. Mittels HPLC konnten die Peptide mit 2, 3, 4, 6, 7 und 8 Ethylestern getrennt und durch MALDI-TOF-MS charakterisiert werden. Die Spaltung des ersten Phosphonsäureesters erleichtert die Hydrolyse des zweiten am

### 3 Peptidische Integrinliganden

selben Phosphor befindlichen Esters, was die hohen Anteile der Peptide mit 4 und 6 Ethylestern im Reaktionsgemisch erklärt. Eine Verlängerung der Reaktionszeit führte aber auch unter diesen Bedingungen nicht zu einer vollständigen Entschützung des Phosphonatpeptids.<sup>[400]</sup>

Durch den Einbau von Benzylschutzgruppen für die Phosphonsäuren sollten die Nebenreaktionen bei der Entschützung minimiert werden können, da auf die Verwendung von TMSBr verzichtet werden kann. Da auch hier die Phosphonsäureestergruppen durch eine Arbuzov-Reaktion eingeführt werden sollten, konnte nicht mehr ein Brompropionsäureester als Ausgangsstoff eingesetzt werden. Bei der Arbuzov-Reaktion wird Benzylbromid frei, das kontinuierlich durch Destillation aus der Reaktionsmischung entfernt werden muss, wobei aber das Esterbromid nicht mit übergehen darf. Aus diesem Grund bot sich die Verwendung von 3,5-Bis(bromomethyl)benzoesäuremethylester **2** an, dessen Siedetemperatur hoch genug ist und der auch schon bei der Synthese eines künstlichen RGD-Rezeptors<sup>[402]</sup> zur Herstellung einer Bisphosphonsäure benutzt wurde.

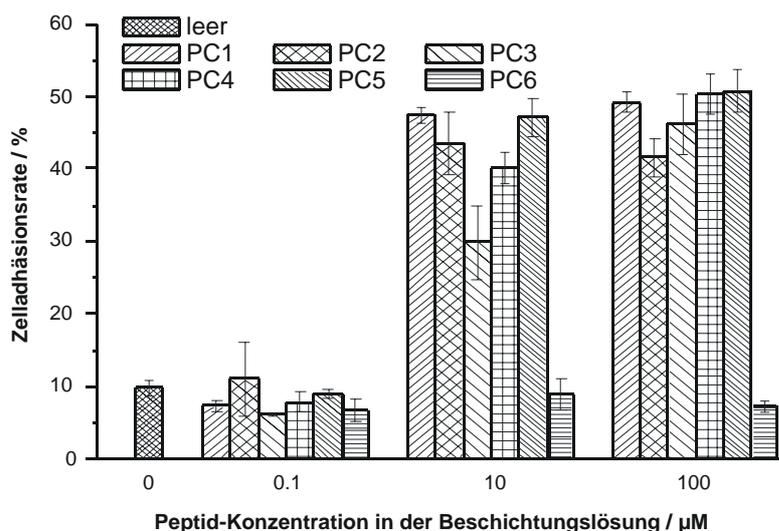
Ausgehend von kommerziell erhältlichem Methyl-3,5-dimethylbenzoat **1** wurde eine Wohl-Ziegler Bromierung in Benzylstellung durchgeführt. Die Dibrom-Verbindung **2** wurde dann in einer Arbuzov-Reaktion mit Tribenzylphosphit **3** umgesetzt. Diese wurde im Hochvakuum und einer Ölbadtemperatur von 240 °C durchgeführt, um das entstehende Benzylbromid kontinuierlich abzudestillieren. Abschließend wurde der Methylester **4** mit Lithiumhydroxid in einer Wasser / Methanol Mischung gespalten (Abbildung 3.2.2).



**Abbildung 3.2.2** Darstellung von 5-Carboxy-*m*-xylene-bisphosphonsäure-tetrabenzylester **5**.



### 3 Peptidische Integrinliganden



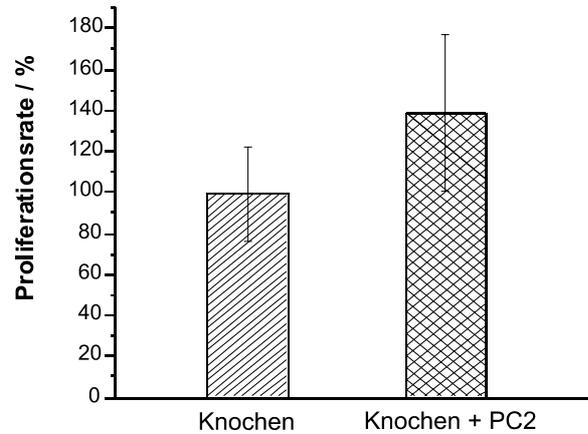
**Abbildung 3.2.4** Adhäsion von MC3T3-E1-Mausosteoblasten auf unbeschichteten und beschichteten Titanoberflächen. Die Mittelwerte stammen von Dreifachmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Für die Füllung größerer Knochendefekte werden u. a. Knochentransplantate verwendet. Diese Technik erfordert eine Sterilisation, sowohl bei Eigentransplantaten aus tumorösem Knochen wie auch bei der Verwendung von allogenen Transplantaten. Dazu werden verschiedene Methoden wie Autoklavieren, Bestrahlen oder chemische Behandlungen (z. B. Tutoplast® Methode) herangezogen, alle führen jedoch zu einer Veränderung der biomechanischen und biologischen Eigenschaften des Knochens. Nachdem die Phosphonatanker auch auf Hydroxylapatit haften,<sup>[333]</sup> wurden von Dr. Ulla Magdolen (Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum r. d. Isar) Untersuchungen mit **PC2** an sterilisierten Knochen durchgeführt.

Zylindrische Knochenplättchen (Ø 8 mm) aus Hüftknochen wurden mit dem Peptid beschichtet. Adhäsionsversuche mit humanen Osteoblasten aus tumorösen Knochen zeigten jedoch keine erhöhten Zelladhäsionswerte auf den mit peptidbeschichteten Plättchen. Dieses negative Ergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass die unlösliche Collagen I Matrix die Sterilisation und Reinigung auf dem Knochen übersteht. Die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln führt zwar zu einer Denaturierung des Collagen I, jedoch nicht zu einer Ablösung und die Zelladhäsionsareale sind auch noch im denaturierten Protein vorhanden.

Außerdem wurde untersucht, ob die Beschichtung mit **PC2** einen Einfluss auf die Proliferationsrate von Osteoblasten aufweist. 8 Tage nach dem Aufbringen der Zellen auf die beschichteten und unbeschichteten Knochenstücke wurden die Zellzahlen durch die Hexaminidaseaktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Proli-

ferationsrate auf den mit RGD-Peptid beschichteten Proben 1,4-fach erhöht war (Abbildung 3.2.5).



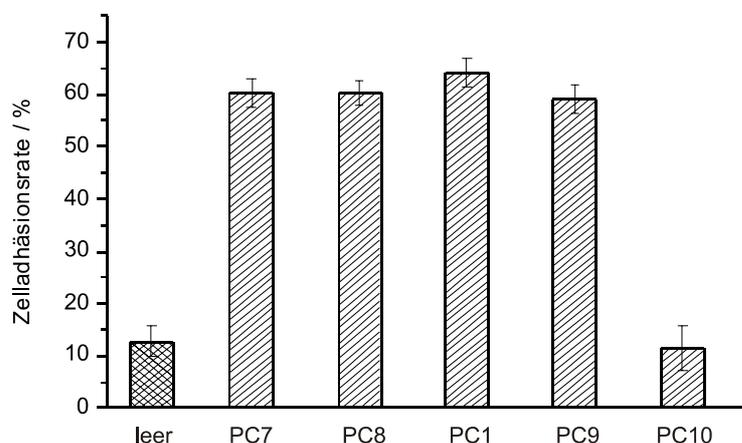
**Abbildung 3.2.5** Proliferation von Osteoblasten auf RGD-beschichteten (**PC2**) Konchenstücken. Die Mittelwerte stammen aus 9 Experimenten, die Proliferationsdauer betrug 8 Tage.

Nachdem, wie bereits oben erwähnt, die *Biomet Deutschland GmbH* eine Zulassung von **PC1** für die Beschichtung von Titanimplantaten anstrebt und dafür schon zahlreiche Tests durchgeführt wurden, war das Interesse an einem anderen Syntheseweg für **PC1** groß und eine externe Firma wurde mit der Synthese von *Biomet* beauftragt. Daraus resultierte Dibenzylphosphonopropionsäure als Ankerbaustein, die Verbindung ist in der Zwischenzeit bei *Novabiochem* auch kommerziell erhältlich.

Bei den für die Zulassung notwendigen Studien an **PC1** stellte sich die Frage nach dem möglichen Einfluss der Spacerlänge auf die Zelladhäsion. Daher wurden *Linker* mit verschiedenen *Spacer*längen synthetisiert. Der Aufbau erfolgte an der festen Phase, ausgehend von *N*-Fmoc- $\epsilon$ -Aminohexansäure. Die Phosphonatgruppen wurden mit Dibenzylphosphopropionsäure eingeführt. Nach der Abspaltung vom Harz wurden alle *Linker* (**P1\***, **P6\***, **P7\***, **P8\***) präoperativ HPLC-gereinigt. **P6\***, **P7\*** und **P8\*** wurden mit Zyklopetid **Z1\*** konjugiert. **P1\*** wurde mit dem RDG-Zyklopetid **Z10\*** als Negativkontrolle gekuppelt. Die Fragmentkupplung wurde ebenfalls mit HATU / HOAt / Collidin in DMF durchgeführt. Nach Aufarbeitung, Entschützung mit TFA und HPLC-Reinigung wurden folgende Peptide erhalten:

- PC7**     *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub>
- PC8**     *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub>
- PC9**     *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub>
- PC10**    *cyclo*(-RDGfK-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

**PC7 – PC10** wurden zusammen mit **PC1** auf Titanoberflächen (Ti6Al4V, Ø 1 cm) immobilisiert. Auf diesen Oberflächen wurde die Adhäsion von MC3T3-E1 Mausosteoblasten bestimmt. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit zeigten die Peptide **PC1**, **PC7**, **PC8** und **PC9** das gleiche Potential die Zelladhäsion zu steigern (ca. 60 % gegenüber 13 % bei unbeschichtetem Titan). D. h. ein *Spacer* bestehend aus einer  $\epsilon$ -Aminohexansäure und einem Lysinbaum der 2. Generation ist auf Titanoberflächen ausreichend um die Osteoblastenadhäsion effektiv zu steigern. Auf Proben, die mit dem inaktiven Peptid **PC10** beschichtet wurden, ist keine Steigerung der Zelladhäsion festzustellen. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei den anderen Peptiden um eine spezifische Wechselwirkung der Zelle mit den RGD-Peptiden handelt und eine unspezifische Zelladhäsion durch die veränderte Oberfläche, etwas durch den *Spacer* oder den Anker, ausgeschlossen werden kann (Abbildung 3.2.6).



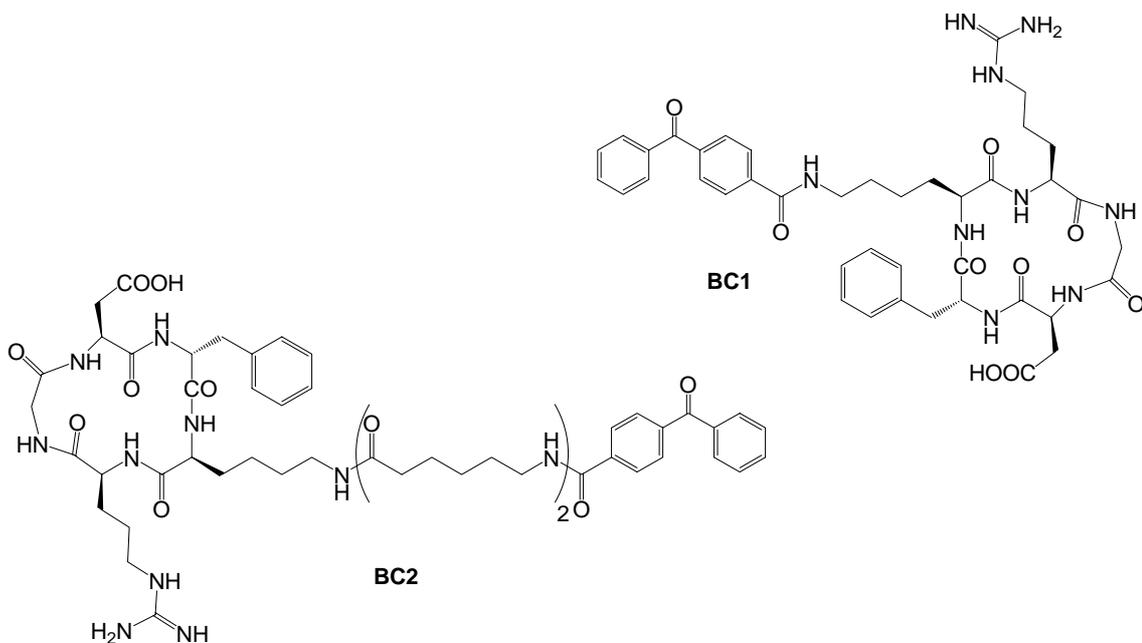
**Abbildung 3.2.6** Adhäsion von MC3T3-E1-Mausosteoblasten auf unbeschichteten und beschichteten Titanoberflächen. Als Anker dient eine tetramere Phosphonopropionsäure. Bei **PC7**, **PC8**, **PC1** und **PC9** nimmt die Spacerlänge jeweils um eine  $\epsilon$ -Aminohexansäure zu. **PC10** enthält die inaktive RGD-Sequenz. Die Mittelwerte stammen von Sechsfachmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung war 100  $\mu$ M.

Diese Ergebnisse zeigen sehr gut, dass zyklische RGD-Peptide mit Phosphonatankern, sowohl aliphatischen als auch aromatischen, geeignet sind, die Biokompatibilität von Titan zu erhöhen. Die Modifikation führt zu einer verstärkten Zelladhäsion an der Implantatoberfläche. Durch den Einsatz von benzylgeschützten Phosphonsäurederivaten lässt sich die Synthese der Peptide auch im großen Maßstab bewerkstelligen.

### 3.3 Zyklische RGD-Peptide mit Benzophenonanker

Zur Erzeugung von strukturierten zelladhäsiven und zellrepulsiven Bereichen auf Oberflächen unter Verwendung photolithographischer Maskentechniken kann man die photoadhäsive Verbindung *p*-Benzophenoncarbonsäure verwenden, die in der Literatur zur Immobilisierung von RGD-enthaltenden Peptidsequenzen auf Alkylthiol-SAMs beschrieben wird.<sup>[404]</sup>

Von M. Kantlehner wurde **BC1** synthetisiert. C. Dahmen baute bei der Synthese von **BC2** zusätzlich einen *Spacer* bestehend aus zwei Aminohexansäuren zwischen dem Zylopeptid und der Benzophenoncarbonsäure ein (Abbildung 3.3.1). Der Einbau eines *Spacers* sollte zeigen, ob auch bei der Verwendung photoadhäsiver Peptide ähnlich wie bei Acrylatpeptiden auf PMMA *spacer*abhängige Effekte auf bestimmten Oberflächen zu beobachten sind.<sup>[29, 30, 333]</sup>

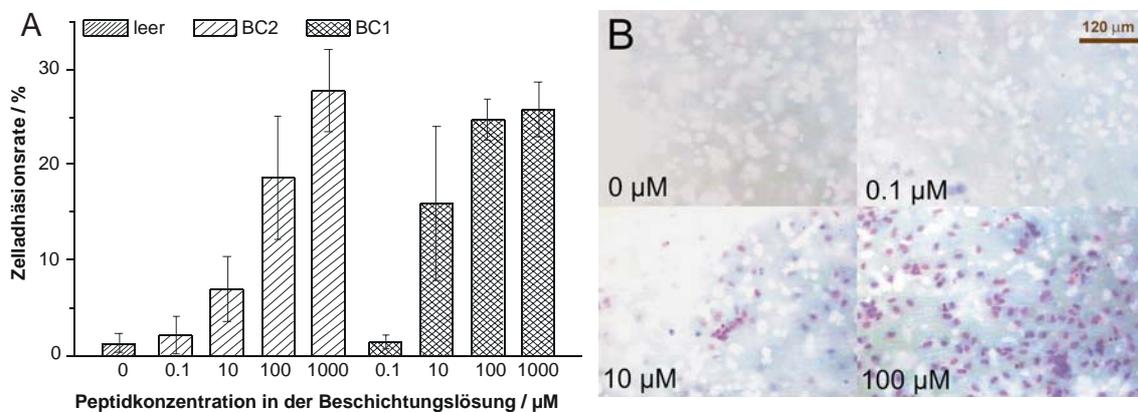


**Abbildung 3.3.1** Photoadhäsive Peptide bestehend aus *p*-Benzophenoncarbonsäure **BC1** und erweitert mit einem *Spacer* aus zwei  $\epsilon$ -Aminohexansäuren **BC2**.

Von C. Dahmen wurden mit den Peptiden **BC1** und **BC2** Immobilisierungsversuche auf BSA-beschichteten Zellkulturplatten durchgeführt. Die Belichtung erfolgte bei 254 nm und bei 366 nm für unterschiedliche Zeiten, jedoch konnte kaum immobilisiertes Peptid durch den ELISA nachgewiesen werden. Analoge Untersuchungen wurden auch auf PMMA-Oberflächen durchgeführt. Hier konnte im ELISA zwar gezeigt werden, dass **BC2** immobilisiert werden kann, Zelladhäsionsversuche wurden aber nicht durchgeführt.<sup>[400]</sup>

### 3 Peptidische Integrinliganden

In Zusammenarbeit mit G. Chmel wurden Zelladhäsionstests mit **BC1** und **BC2** auf PMMA durchgeführt. Zuerst wurde die Abhängigkeit der Zelladhäsionsrate von der Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung untersucht. Dabei zeigten die photoadhäsiven Peptide nach Immobilisierung durch Bestrahlung bei 366 nm für 6 h eine deutliche Abhängigkeit der Zelladhäsionsrate von der Konzentration. Für **BC1** konnte die Adhäsionsrate um 24,6 %, für **BC2** um 26,6 % gesteigert werden (1000  $\mu\text{M}$  Peptid) (Abbildung 3.3.2 A). Die im Enzymassay gemessenen Ergebnisse spiegeln sich auch in den mikroskopischen Untersuchungen von mit **BC2** beschichteten Plättchen wider (Abbildung 3.3.2 B). Eine Abhängigkeit von der *Spacerlänge* konnte nicht festgestellt werden.

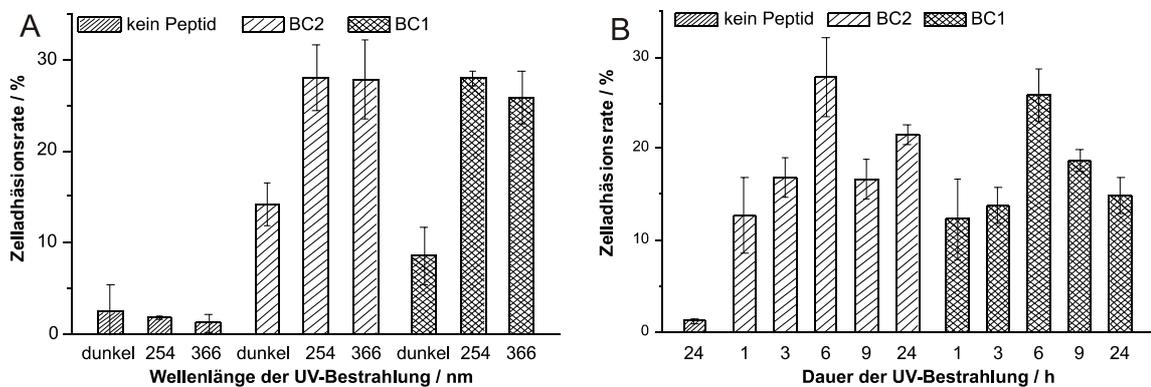


**Abbildung 3.3.2** Zelladhäsion nach 1 h von EC3T3-E1 Mausosteoblasten auf mit **BC1** und **BC2** in verschiedenen Konzentrationen beschichteten PMMA-Oberflächen (6 h bei 366 nm). (A) Zelladhäsionsrate im Enzymassay; (B) Mikroskopaufnahmen nach Fixierung und Färbung mit Gimsa, Beschichtung mit **BC2**.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Wellenlänge der UV-Bestrahlung bei der Anbindung untersucht. Es wurde der in der Literatur angegebene Wert von 366 nm<sup>[405]</sup> mit dem energiereicheren Licht von 254 nm und einer Beschichtung ohne Licht verglichen. Um einen maximalen Effekt zu erreichen, wurde eine Peptidkonzentration von 1000  $\mu\text{M}$  und eine sechsstündige Beschichtung gewählt. Es zeigte sich, dass sogar ohne Bestrahlung beide Peptide etwas an die PMMA-Oberfläche binden. Dies kann durch die Herstellung der Plättchen erklärt werden: Benzoylperoxid wird als Starter bei der Polymerisation benutzt und verbleibende Reste können die Immobilisation des Ankers initiieren. Die Behandlung mit UV-Strahlung zeigte kaum eine Abhängigkeit von der Wellenlänge, sowohl bei 254 nm als auch bei 366 nm steigt die Zelladhäsionsrate um etwa 26 % für beide Peptide (Abbildung 3.3.3 A).

### 3 Peptidische Integrinliganden

Einen großen Einfluss auf die Zelladhäsionsrate hat jedoch die Zeit, die den Peptiden für die Beschichtung der Oberfläche gegeben wird. Beide Peptide **BC1** und **BC2** wurden in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  auf die PMMA-Oberfläche aufgebracht und für 1, 3, 6, 9 und 24 h bei 366 nm belichtet. Für Peptid **BC2** lag der Zuwachs der Zelladhäsionsrate bei 6 h Bestrahlung mit 28 % am höchsten. Eine längere Bestrahlung führte dann wieder zu einer Abnahme der Adhäsionsrate, dies könnte durch eine zunehmende Zerstörung des Peptids erklärt werden oder durch eine Insertion neu angebundener Peptide in bereits immobilisierte. Auch bei **BC1** war die Zelladhäsionsrate nach sechsständiger Beschichtung mit einer Zunahme von 26 % am größten (Abbildung 3.3.3 B).



**Abbildung 3.3.3** Zelladhäsionsraten nach 1 h auf PMMA. 1000  $\mu\text{M}$  Peptid in der Beschichtungslösung; (A) verschiedene Wellenlängen bei der Bestrahlung, 6 h; (B) verschieden lange Bestrahlungszeiten, 366 nm.

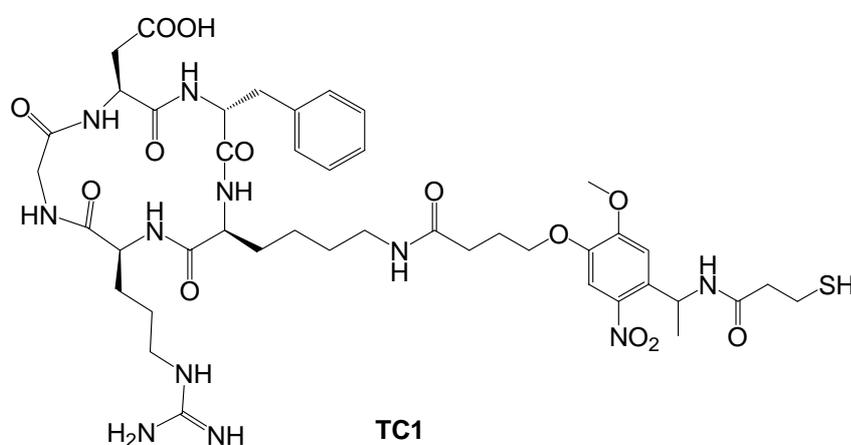
Beide Peptide **BC1** und **BC2** eignen sich also dazu, auf PMMA strukturierte Oberflächen durch Photolithographie zu erzeugen. Ein Nachteil dabei ist allerdings, dass die Peptide auch in Abwesenheit von Licht schon in einem beträchtlichen Ausmaß an die Oberfläche anbinden.

### 3.4 Zyklische RGD-Peptide mit photolabilem Anker

Im Folgenden soll eine Möglichkeit vorgestellt werden, durch lichtinduzierte Abspaltung zelladhäsiver Peptide unter Verwendung photolithographischer Maskentechniken mikrostrukturierte Oberflächen zu generieren, auf denen sich zelladhäsive und zellrepulsive Bereiche abwechseln. Derartig strukturierte Template eignen sich vor allem zur Untersuchung mechanistischer und molekularbiologischer Phänomene wie z. B. der Zelladhäsion, Zellmigration sowie der adhäsionsvermittelten Zellproliferation bzw. Apoptose.

### 3 Peptidische Integrinliganden

M. Kantlehner integrierte ein photolabiles Element in den *Linker* eines RGD-Peptids mit Thiolanker, was sowohl die Anbindung auf Metallen wie Titan oder Gold als auch auf maleinimidfunktionalisierten Oberflächen ermöglicht. Ein in der Peptidchemie etablierter Photolinker vom *o*-Nitrobenzyltyp<sup>[406, 407]</sup> mit ausreichender effektiver *Spacerlänge* wurde unter Lichtausschluss an der Festphase mit (*S*-Trt)-3-Mercaptopropionsäure gekuppelt (**T1\***). Dabei eignet sich die an der Benzylgruppe methyloxy-substituierte Verbindung besser als die normale Benzylgruppe. Da das bei der Photospaltung entstehende Nitroacetophenon weniger Nebenprodukte liefert als der Nitrobenzaldehyd. Anschließend erfolgte die Fragmentkuppelung des *Linkers* **T1\*** mit dem Zyklopeptid **Z1\***.



**Abbildung 3.4.1** Zyklopeptid **TC1** mit Linker aus photospaltbarem Element vom *o*-Nitrobenzyltyp und 3-Mercaptopropionsäure zur lichtinduzierten Peptidabspaltung von Oberflächen.<sup>[333]</sup>

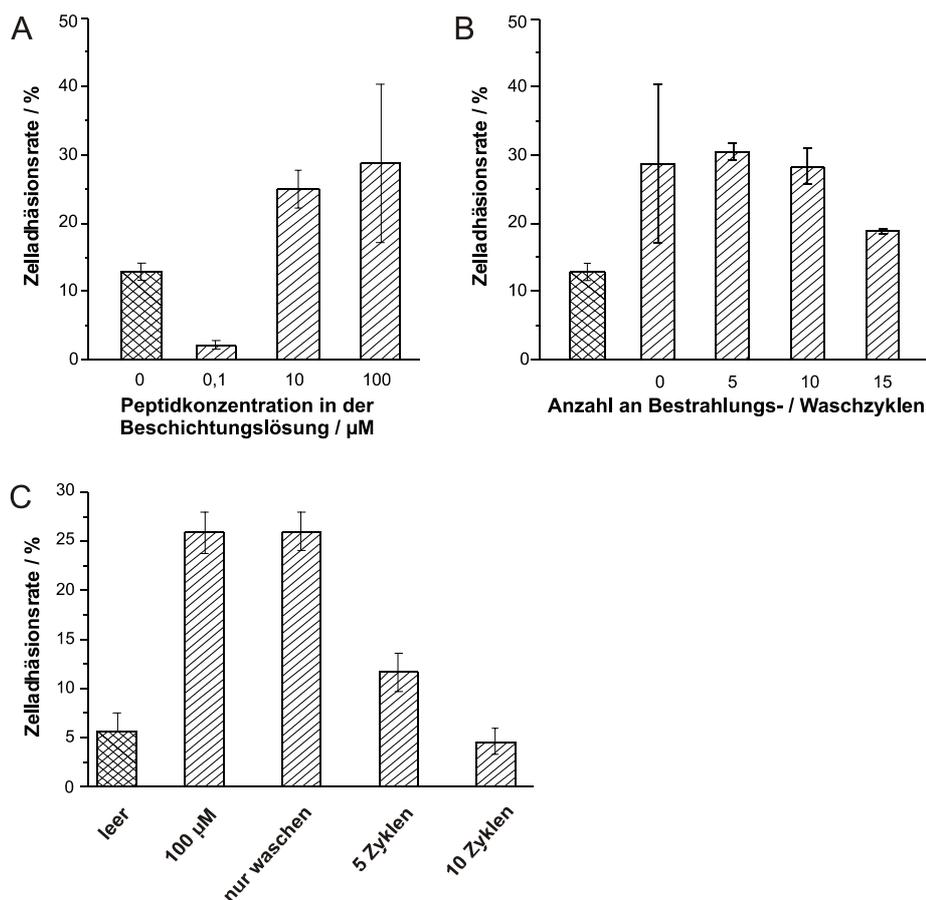
Das nach der Entschützung (95 % TFA / Wasser) resultierende zelladhäsive Peptid **TC1** (Abbildung 3.4.1) wurde zunächst in verschiedenen Konzentrationen auf maleinimidfunktionalisiertem BSA immobilisiert. Die Proben wurden unterschiedlich lange mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm belichtet, um das Thiolpeptid photochemisch von der Oberfläche abzuspalten. Allerdings konnte selbst nach 24-stündiger Bestrahlung keine Reduktion der RGD-Peptidmenge auf dem BSA im ELISA nachgewiesen werden.<sup>[333]</sup> Da der lichtinduzierte Bindungsbruch im Photolinker initiiert worden sein muss, kann davon ausgegangen werden, dass hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Teil des *Linkers*, der nach der Photolyse am Zyklopeptid verbleibt, und den lipophilen Aminosäuren des BSA das RGD-Peptid an der Oberfläche zurückhalten. Die Proteinoberfläche kann aber nur mit wässrigen Lösungen gewaschen werden, welche die adsorbierten Moleküle aufgrund schlechter Löslichkeit nicht vom BSA entfernen können. Es musste im Fol-

genden auf ein anderes Material ausgewichen werden, welches auch mit organischen Lösungsmitteln gewaschen werden kann.

Da der Thiolanker auch eine Immobilisierung auf Metalloberflächen ermöglicht, wurde für weitere Versuche Titan als Träger gewählt, da dieses auch mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln gewaschen werden kann. Zuerst wurde **TC1** in unterschiedlichen Konzentrationen auf Titan immobilisiert und die Zelladhäsion mit MC3T3-E1 Mausosteoblasten untersucht. Wie Abbildung 3.4.2 A zu entnehmen ist, nimmt die Zelladhäsionsrate mit steigender Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung zu. Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  lässt sich die Zelladhäsion um 16 % gegenüber unbehandeltem Titan steigern. Erste Abspaltungsversuche wurden durch mehrmaliges Bestrahlen bei 366 nm für 15 min und Waschen mit 0,5 mL *iso*-Propanol durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine Reduktion des Zelladhäsionspotentials durch diese Behandlung möglich ist, jedoch zeigte sich erst nach 15 Wiederholungen ein Effekt auf die Zelladhäsionsrate, die dann um 10 % zurückging (Abbildung 3.4.2 B). Wurden für das Waschen verschiedene organische Lösungsmittel, wie 80 % DMF, 50 % Acetonitril, 70 % Dioxan in Wasser benutzt, ließ sich das Peptid nach zehn Bestrahlungs-Wasch-Zyklen vollständig wieder abspalten (Abbildung 3.4.2 C).

**TC1** eignet sich demnach dazu, auf Titanoberflächen photolithographisch zelladhäsive und -repulsive Bereiche zu erzeugen. Ein Nachteil bei der verwendeten Methode des photospaltbaren *Linkers* ist allerdings, dass die Oberfläche mehrmals mit unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln gewaschen werden muss, um das abgespaltene Peptid wieder abzuwaschen. Abhilfe könnte die Verwendung von photolabilen Schutzgruppen am Aspartat bringen. Hier würden sehr kleine Moleküle abgespalten, von denen außerdem keine Zellantwort zu erwarten ist, so dass es nichts ausmacht, wenn noch Reste der Schutzgruppe auf der Oberfläche verbleiben. Dieser Ansatz wird gegenwärtig von M. López verfolgt.

### 3 Peptidische Integrinliganden



**Abbildung 3.4.2** Zelladhäsionsraten von MC3T3-E1 Mausosteoblasten auf mit **TC1** beschichteten Titanoberflächen. **A** Beschichtung mit verschiedenen Peptidkonzentrationen in der Beschichtungslösung. **B** Abspaltung des Peptids durch wiederholtes Bestrahlen bei 366 nm und anschließendes Waschen mit  $3 \times 0,5 \text{ mL}$  iso-Propanol. **C** Abspaltung des Peptids durch wiederholtes Bestrahlen bei 366 nm und anschließendes Waschen mit je  $0,5 \text{ mL}$  80 % DMF, 50 % MeCN, 70 % Dioxan, PBS. Die Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung war bei **B** und **C**  $100 \mu\text{M}$ .

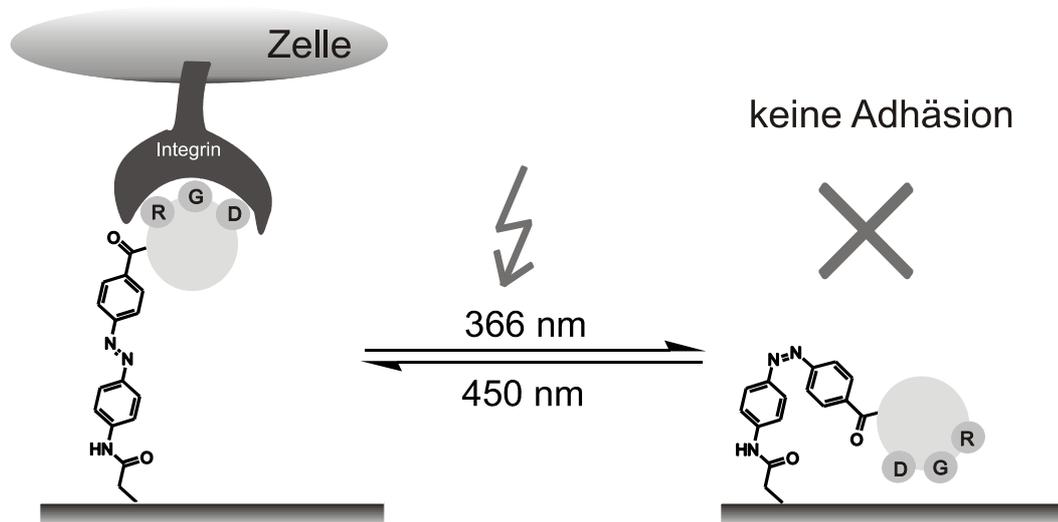
### 3.5 Zyklische RGD-Peptide mit photoschaltbarem *Linker*

Um auf Materialoberflächen zelladhäsive und zellrepulsive Bereiche nebeneinander zu generieren, gibt es z. B. die Möglichkeit der in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten photochemisch regulierten Beschichtung mit zelladhäsiven Molekülen. Diese Methode eignet sich zur irreversiblen Beschreibung von Oberflächen mit bestimmten photolithographisch zugänglichen Mustern. Eine potentiell reversible Schaltung der zelladhäsiven Bereiche soll im folgenden Kapitel beschrieben werden.

Aufgrund der von der *Spacerlänge* abhängigen Zelladhäsion, die auf verschiedenen Oberflächen beobachtet werden konnte,<sup>[29, 30, 162, 301]</sup> sollten zyklische RGD-

### 3 Peptidische Integrinliganden

Peptide mit variabler, schaltbarer *Spacer*länge synthetisiert werden. Ein zu kurzer *Spacer* würde dabei, im Gegensatz zu einem längeren, die Zelladhäsion nicht stimulieren. Die photoinduzierte Längenänderung des *Spacers* kann am einfachsten durch den Einbau von isomerisierbaren Elementen bewerkstelligt werden (Kapitel 2.6.2.1).



**Abbildung 3.5.1** Konzept des photoisomerisierbaren Linkers zur Schaltung der Zelladhäsion.

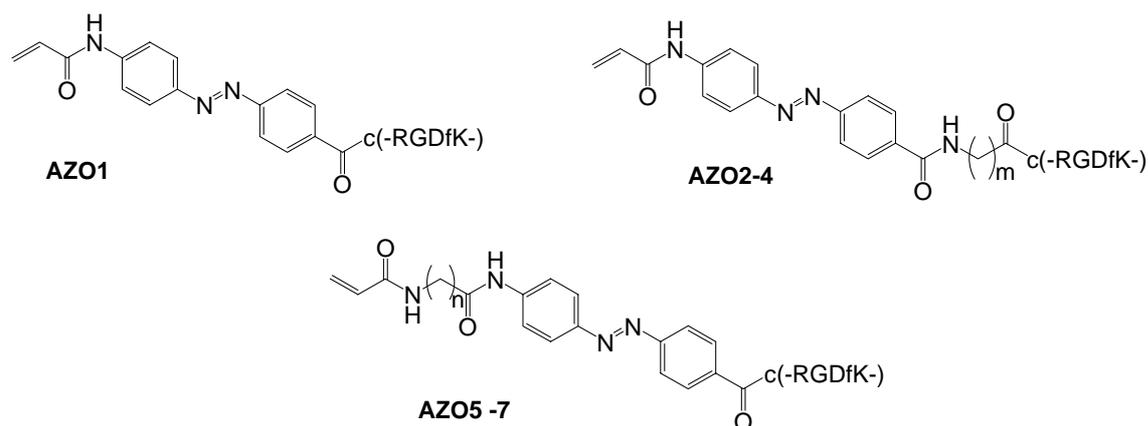
Von C. Dahmen wurde 4'-Aminophenylazo-4-benzoesäure<sup>[408, 409]</sup> als isomerisierbare Einheit ausgewählt, da sie in die Peptidsynthese integriert und einfach durch Belichtung zwischen *cis*- und *trans*-Zustand reversibel und ohne Nebenreaktionen umgeschaltet werden kann.<sup>[410]</sup> Im thermodynamischen Gleichgewicht ist das um ca. 3 Å längere *trans*-Isomer bevorzugt, welches durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge um 360 nm in die *cis*-Form umgewandelt werden kann (Abbildung 3.5.1). Die thermische Relaxation in die *trans*-Form verläuft langsam innerhalb mehrerer Tage.<sup>[411]</sup> Rascher erfolgt das Umschalten in Gegenwart von Licht mit Wellenlängen um 450 nm.<sup>[412-416]</sup> Das zur Isomerisierung benötigte eher langwellige Licht ist kompatibel mit biologischen Systemen, weshalb dieses Phenylazobenzolderivat in der Vergangenheit schon häufiger in Peptiden,<sup>[411, 412, 417-427]</sup> Proteinen<sup>[428]</sup> oder DNA<sup>[413, 414, 421]</sup> als strukturinduzierendes bzw. -veränderndes Element eingebaut wurde.

Die in Abbildung 3.5.2 dargestellten Peptide mit der reversibel photoisomerisierbaren Phenylazobenzoleinheit im *Linker* wurden von C. Dahmen synthetisiert. Allerdings hat sie das Schaltverhalten nur in Lösung charakterisiert, wohingegen das Verhalten auf Oberflächen von ihr nicht untersucht wurde. Die Längen (Abstand zwischen den beiden äußeren Carbonylkohlenstoffatomen) in den jeweiligen *cis*- und

### 3 Peptidische Integrinliganden

*trans*-Isomeren wurden in Energieminimierungsrechnungen mit ChemDraw 3D (MM2 Kraftfeld)<sup>[429]</sup> und Discover (CVFF)<sup>[430]</sup> abgeschätzt.<sup>[400]</sup>

Die Immobilisierung der RGD-Peptide **AZOC1** – **AZOC7** sollte mittels des Acrylamidankers auf PMMA erfolgen, da hier der *Spacer*einfluss auf die integrinvermittelte Zelladhäsion in der Literatur beschrieben ist: Ein effektiv wirksamer *Linker* aus zwei  $\epsilon$ -Aminohexansäuren und Acrylamidanker besitzt eine Länge von 1,7 nm (Abstand zwischen den beiden äußeren Carbonylkohlenstoffatomen). Hingegen ist ein Acryl-Ahx-*Linker* mit 0,9 nm zu kurz um Zelladhäsion zu vermitteln.<sup>[29]</sup>

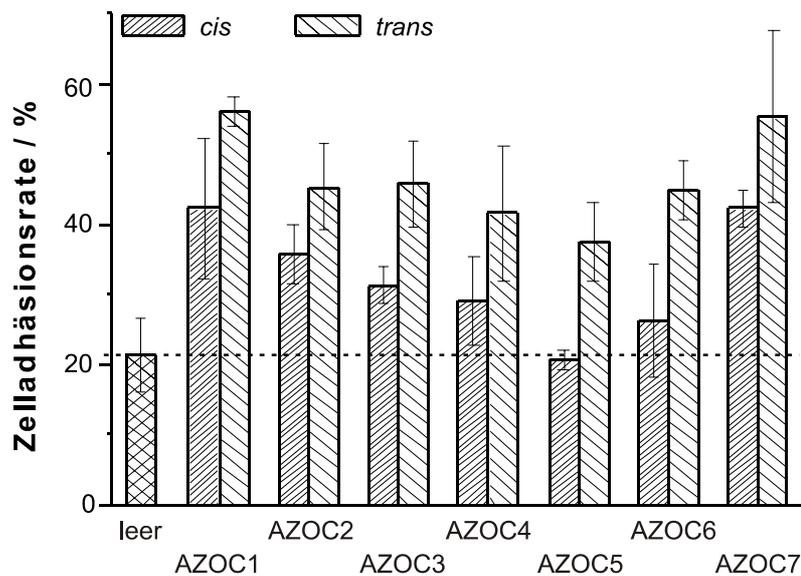


	<i>trans</i> -Isomer		<i>cis</i> -Isomer	
	ChemDraw	Discover	ChemDraw	Discover
Acryl-Ahx-c(-RGDfK-)	0,856	0,885		
Acryl-Ahx <sub>2</sub> -c(-RGDfK-)	1,723	1,751		
<b>AZOC1</b>	1,289	1,334	0,885	1,084
<b>AZOC2</b> m = 1	1,503	1,631	1,175	1,210
<b>AZOC3</b> m = 3	1,757	1,829	1,380	1,482
<b>AZOC4</b> m = 5	1,945	2,056	1,517	1,545
<b>AZOC5</b> n = 1	1,572	1,637	1,171	1,229
<b>AZOC6</b> n = 4	2,018	1,971	1,382	1,646
<b>AZOC7</b> n = 5	2,147	2,088	1,508	1,500

**Abbildung 3.5.2** Reversibel photoisomerisierbare Peptide **AZOC1** – **AZOC7** aus Acrylamidanker, Photoswitchereinheit 4'-Aminophenylazo-4-benzoesäure und  $\omega$ -Aminoalkylcarbonsäurespacer. Die Längen der Spacer sind in nm angegeben.

Die Peptide **AZOC1** – **AZOC7** wurden durch UV-Bestrahlung bei 254 nm auf die PMMA-Oberflächen angebunden. Die eine Hälfte der Proben wurde für drei Stunden mit Licht der Wellenlänge 450 nm bestrahlt und anschließend 5 Tage im Dunkeln gelagert, um alle Peptide in die *trans*-Konformation zu schalten. Der andere

Teil der Proben wurde direkt vor dem Zelltest für 12 h bei 366 nm bestrahlt. Danach wurde ein Zelladhäsionstest mit EC3T3-E1 Mausosteoblasten durchgeführt. Dabei zeigten alle mit 450 nm bestrahlten Proben eine erhöhte Zelladhäsion gegenüber unbeschichteten PMMA-Oberflächen. Proben, die durch Bestrahlung bei 366 nm in die kürzere *cis*-Konformation geschaltet wurden, zeigten immer eine deutlich geringere Zelladhäsionsrate als die entsprechenden Proben mit dem Peptid in der *trans*-Konformation. Allerdings wurde nur für **AZOC5** eine Reduktion der Zelladhäsionsrate auf das Niveau von unbeschichtetem PMMA erreicht (Abbildung 3.5.3). Durch die kürzere Relaxationszeit von **AZOC1**<sup>[400]</sup> lässt sich erklären, dass auf Proben, die mit **AZOC1** beschichtet sind, sowohl in der *trans*- als auch in der „*cis*“-Konformation die Zelladhäsion stimuliert wird, obwohl nach den Berechnungen in dieser Verbindung der kürzeste *Spacer* vorliegen sollte. Außerdem hat in dieser Verbindung der *Spacer* auf Grund seiner Struktur eine rigide, gestreckte Konformation. Dies ist bei allen anderen *Spacern* nicht der Fall, da durch die zusätzlichen Methylengruppen weitere Freiheitsgrade gegeben sind. Dies führt, obwohl **AZOC1** den kürzesten *Spacer* hat, zu einer weiteren Steigerung der Zelladhäsionsrate.



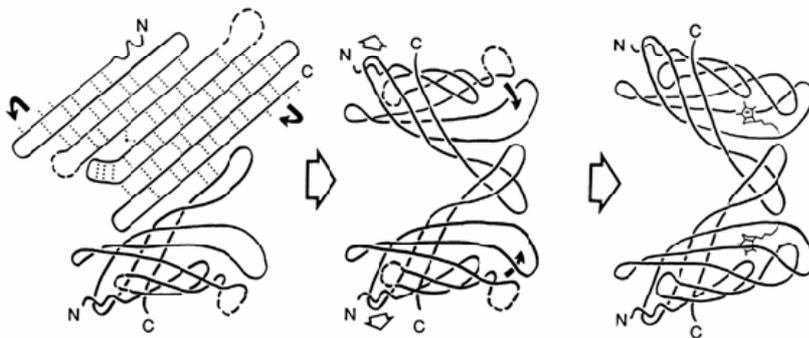
**Abbildung 3.5.3** Zelladhäsion von MC3T3-E1 Mausosteoblasten auf PMMA-Oberflächen, die mit den photoschaltbaren Peptiden **AZOC1** - **AZOC7** beschichtet sind. Die Peptide wurden 12 h bei 366 nm (*cis*-Konformation) bzw. 3 h bei 450 nm (*trans*-Konformation) bestrahlt. Die Peptidkonzentration in der Beschichtungslösung war 1 mM.

Mit **AZOC5** wurde eine Verbindung gefunden, die die reversible Schaltung der Zelladhäsion auf PMMA-Oberflächen durch Bestrahlung ermöglicht. Jedoch ist die Zunahme der Zelladhäsionsrate mit 17 % gegenüber dem Grundzustand nicht sehr hoch. Das liegt sicherlich auch daran, dass der *Spacer* in der *trans*-Konformation ge-

rade lang genug ist, um überhaupt die Zelladhäsion zu stimulieren. Ein längerer *Spacer* würde zwar einen größeren Effekt bewirken, jedoch wäre dann die *cis*-Konformation auch zu lang. Abhilfe könnte der Einbau der Isomerisierungseinheit in den Peptidzyklus bringen, da ein relativ langer *Spacer* gewählt werden kann und die Schaltung durch eine Veränderung der Konformation in der Bindungsregion des Liganden erfolgt.

### 3.6 Zyklische RGD-Peptide mit Biotinanker

Eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen zwischen einem Biomakromolekül und seinem Liganden ist die Wechselwirkung zwischen Streptavidin und Biotin mit einer Dissoziationskonstante von  $\approx 10^{-14}$ .<sup>[431]</sup> Streptavidin wird vom Aktinobakterium *Streptomyces avidinii* produziert und in die Umgebung des Bakteriums ausgeschieden. Es fungiert in natürlicher Umgebung als antimikrobielles Agens, das der Umgebung das für ein Überleben von Organismen essentielle Vitamin H (Biotin) entzieht. In dieser Funktion ist die hohe Affinität des Proteins zu Biotin aus evolutionärer Sicht zu verstehen. Von Streptavidin<sup>[432, 433]</sup> liegen Kristallstrukturen in freiem und biotungebundenem Zustand vor. Es handelt sich um Homotetramere mit antiparalleler  $\beta$ -Faltblattstruktur. Jede Untereinheit weist innerhalb dieses  $\beta$ -barrels eine Biotinbindungsstelle auf, die sich in der Kristallstruktur als Bindungstasche darstellt. Bei der Anbindung von Biotin kommt es zu konformationeller Umorientierung des Moleküls unter Präsentation der für die Biotinbindung essentiellen Tryptophanseitenketten (Abbildung 3.6.1).<sup>[434]</sup>



**Abbildung 3.6.1** Struktur von Streptavidin. Gezeigt ist ein Dimer von  $\beta$ -Faltblättern, welches sich bei Anbindung von Biotin vor allem im Bereich zweier Schleifen (unterbrochene Linien) umorientiert (siehe Pfeile). Somit werden die für die Biotinbindung essentiellen Tryptophanreste zugänglich.<sup>[433]</sup>

### 3 Peptidische Integrinliganden

---

Die Bindung ist bestimmt durch van-der-Waal-Wechselwirkungen und ein ausgeprägtes Wasserstoffbrückenmuster. Die Komplexstabilität ist vor allem auf die langsame Dissoziationskinetik des Komplexes zurückzuführen.<sup>[435]</sup> Wie bei Bindung in einem tetrameren Komplex zuerst vermutet werden konnte, zeigt die Bindung von Biotin jedoch keine Kooperativität.<sup>[436]</sup>

Dieses reversible System kann für eine Reihe von biochemischen Anwendungen wie Affinitätschromatographie oder Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden, da eine starke, jedoch nicht-kovalente Bindung vorliegt.<sup>[437, 438]</sup>

Es wurden die vier folgenden Biotin-funktionalisierten Peptide hergestellt:

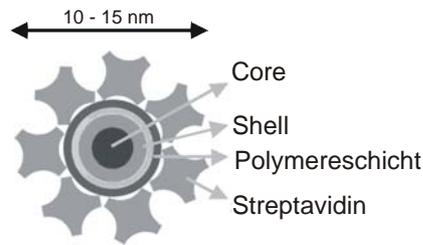
- BiC1**     *cyclo*(-RGDfK-)-Biotinyl
- BiC2**     *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Biotinyl
- BiC3**     *cyclo*(-R $\beta$ ADfK-)-Biotinyl
- BiC4**     *cyclo*(-R $\beta$ ADfK-)-Ahx-Ahx-Biotinyl

**BiC1** und **BiC3** wurden durch eine Kupplung von Biotin mit dem partiell geschützten Lysinzyklus **Z1\*** bzw. **Z2\*** mit HATU / HOAt und Collidin in DMF synthetisiert. Anschließend wurden die Schutzgruppen mit TFA / Wasser / TIPS abgespalten und das fertige Peptid HPLC-gereinigt.

Für die Synthese von **BiC2** und **BiC4** wurde der *Linker Bi1*, bestehend aus zwei  $\epsilon$ -Aminohexansäuren und Biotin, an der festen Phase mit TBTU / HOBt / DIPEA aufgebaut und anschließend mit 10 % TFA in DCM abgespalten. Die anschließende Fragmentkupplung wurde mit HATU / HOAt und Collidin in DMF durchgeführt. Danach wurden alle Schutzgruppen mit TFA / Wasser / TIPS abgespalten und die Peptide mittels HPLC gereinigt.

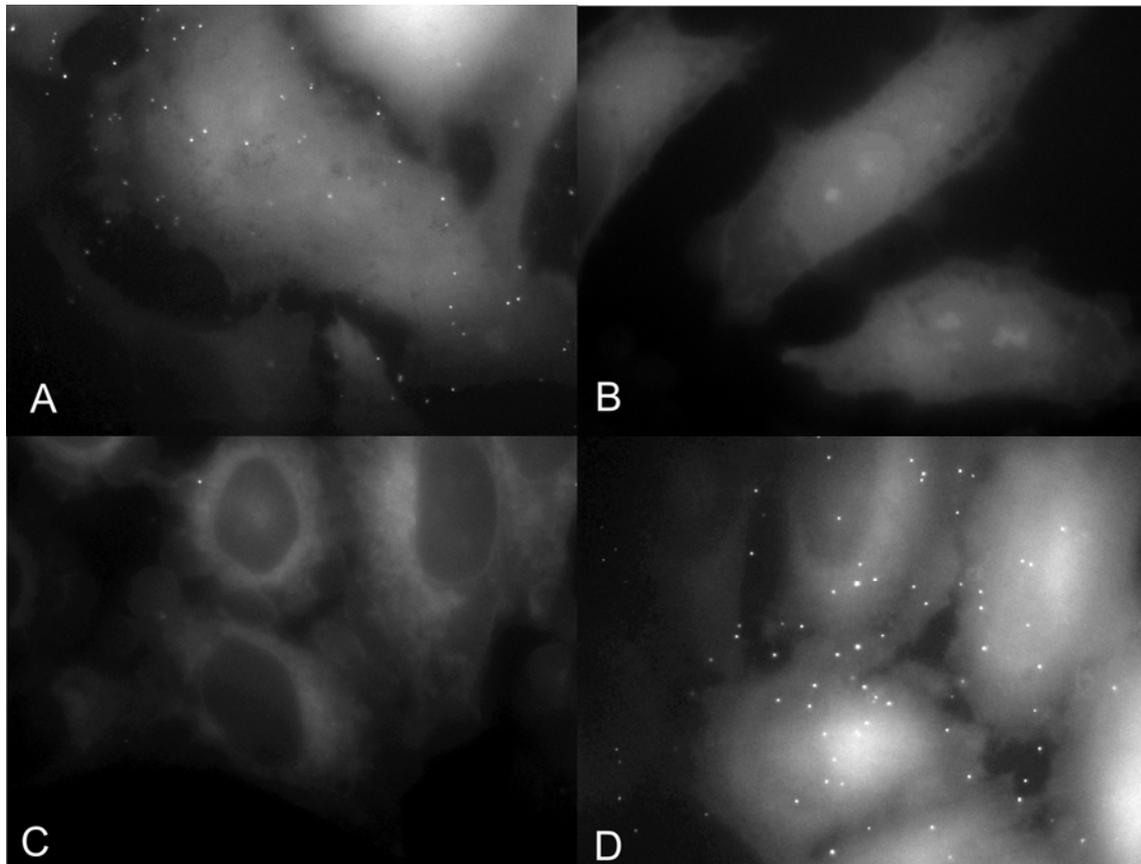
Qdots<sup>®</sup> sind neuartige Farbstoffe auf Halbleiterbasis für die Fluoreszenzmikroskopie. Sie bestehen aus einem Nanokristall aus Halbleitermaterial (CdSe), welcher mit einer Hülle eines zweiten Halbleiters (ZnS) ummantelt ist.<sup>[439]</sup> Diese Halbleiterkristalle sind von einer Polymerschicht umgeben und mit Streptavidin beschichtet, um die Konjugation mit Biomolekülen zu ermöglichen (Abbildung 3.6.2). Über die Biotin-Streptavidin-Bindung wurden die Qdots<sup>®</sup>, (Emissionswellenlänge 655 nm) mit den Peptiden **BiC1** und **BiC2** beschichtet. Die Zelleexperimente wurden von C. Semmrich (Department Physik, E22, TU München) durchgeführt.

### 3 Peptidische Integrinliganden



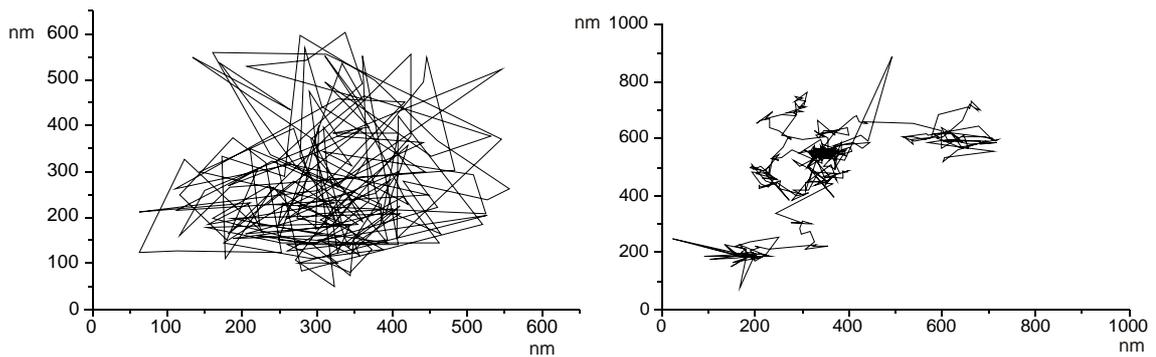
**Abbildung 3.6.2** Schematische Struktur eines Qdot® Streptavidinkonjugats.

HeLa-Zellen, die auf Glasplättchen adhärirt waren, wurden mit den RGD-beschichteten Qdots® inkubiert. Als Vergleich dienten Qdots® die mit Biotin *gecappt* waren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist deutlich zu erkennen, dass mehr von den RGD-funktionalisierten Qdots®, an den Zellen anbinden (Abbildung 3.6.3). Außerdem wurde die zeitliche Bewegung einzelner Qdots® auf der Zelloberfläche und damit einzelner Integrine in der Zellmembran beobachtet (Abbildung 3.6.4).



**Abbildung 3.6.3** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen, die auf Glasplättchen adhärirt sind. Qdots® mit (A) **BiC2**, (B) Biotin, (C) BSA-Biotin und (D) **BiC2** und Biotin 1:10. Anregung bei 400 nm, Detektion bei 655 nm.

### 3 Peptidische Integrinliganden



**Abbildung 3.6.4** Bewegung eines einzelnen Integrins in der Zellmembran. Beobachtungszeitraum 22,5 s links, 63,8 s rechts.

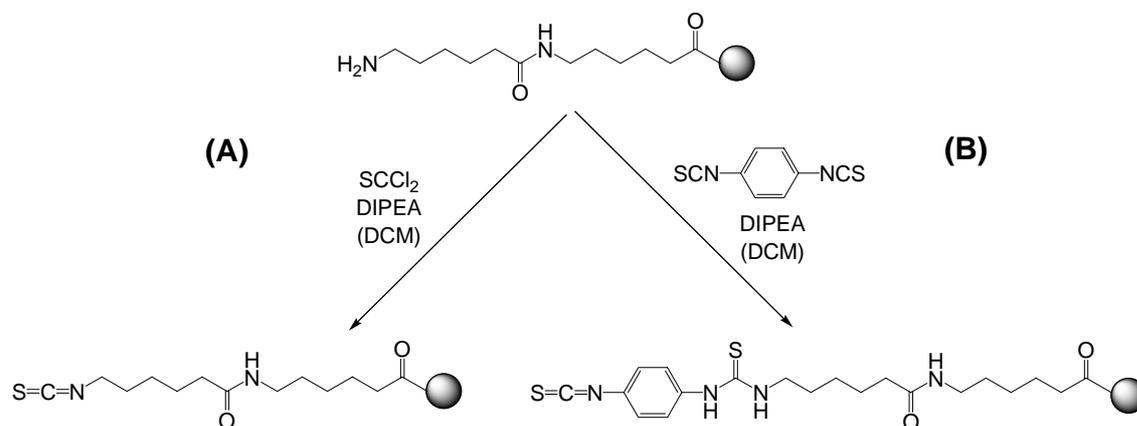
Insgesamt hat sich allerdings gezeigt, dass sich nur einige wenige Qdots<sup>®</sup> auf der Zelle bewegen. Dies könnte daran liegen, dass an einem Qdot<sup>®</sup> natürlich mehrere RGDs und somit auch mehrere Integrine binden. Dies kann wiederum zu einer Ausbildung von Integrinclustern und damit fokalen Adhäsionspunkten führen, die sich nicht mehr in der Membran bewegen. Auch ein Vermischen von RGDs mit Biotin, um eine „Verdünnung“ zu erreichen, brachte keine Abhilfe. Evtl. kann das Problem durch eine Mischung aus RGD- und R $\beta$ AD-Peptiden gelöst werden. Tests hierzu werden gegenwärtig durchgeführt.

### 3.7 RGD-Peptide mit Isothiocyanatanker

Die irreversible Beschichtung von aminofunktionalisierten Oberflächen kann durch die Reaktion der Aminogruppen mit Isothiocyanaten erfolgen, wobei sich ein Thioharnstoffderivat bildet. Diese Methode wurde auch schon für Dynorphin A Analoga als Affinitätsmarker verwendet.<sup>[440]</sup>

Ursprünglich sollte die Isothiocyanatfunktion mit Thiophosgen in das vollständig geschützte Peptid eingeführt werden um Nebenreaktionen z. B. mit der Guanylfunktion des Arginins zu verhindern (Abbildung 3.7.1A). Die Entschützung war dann nach HPLC-Reinigung und Anbindung auf die Oberfläche mit 95 % TFA geplant. Vorversuche mit Thioharnstoff-Derivaten haben hierzu ergeben, dass die Thioharnstoff-Funktion durch diese Behandlung nicht in Mitleidenschaft gezogen wird. Jedoch hat sich im Laufe der Synthesen herausgestellt, dass die Isothiocyanatfunktion nicht nur gegenüber Wasser und Alkoholen unreaktiv ist, sondern auch gegenüber Guanylfunktionen. Daher ist es möglich die Peptide vollständig zu entschützen, die HPLC-Reinigung durchzuführen und anschließend zu immobilisieren. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass es möglich ist, isothiocyanatfunktionalisierte

*Linker* durch eine Fragmentkupplung mit HATU / HOAt über den C-Terminus an die freie Aminogruppe von *cyclo*(-R(Pbf)GD(O*t*Bu)fK-) (**Z1\***) zu koppeln, ohne dass der Isothiocyanatrest beeinträchtigt wird. Eine weitere Erleichterung der Synthese ergab der Ersatz von Thiophosgen durch *p*-Phenylendiisothiocyanat (Abbildung 3.7.1B), welches kommerziell erhältlich ist.



**Abbildung 3.7.1** Einführung der Isothiocyanatfunktion (A) mit Thiophosgen, (B) mit *p*-Phenylendiisothiocyanat (PDIT).

Folgende Sequenzen mit Isothiocyanatanker wurden synthetisiert.

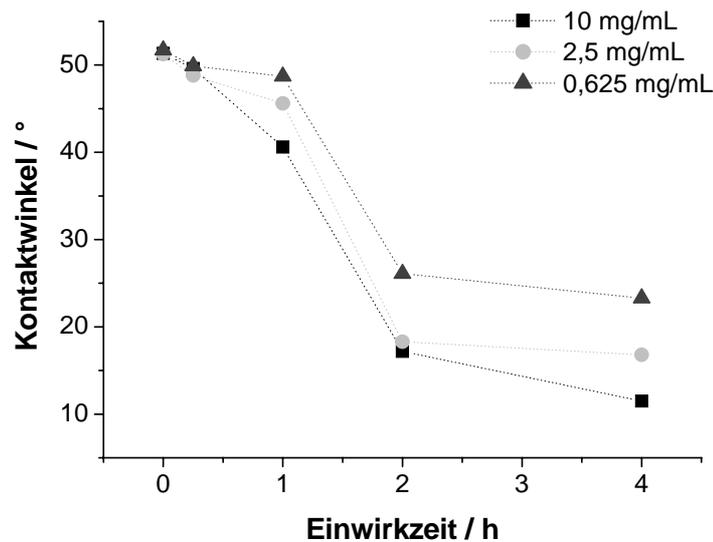
- IC1** PDIT-Ahx-Ahx-*cyclo*(-RGDfK-)
- IL1** PDIT-Ahx-Ahx-GRGDS-OH
- IL2** PDIT-Ahx-Ahx-GRGDSP-OH
- IL3** PDIT-Ahx-Ahx-GRβADSP-OH

**IC1** wurde in Zusammenarbeit mit S. Cesana (Department Chemie, Lehrstuhl f. Makromolekulare Stoffe, TU München) erfolgreich zur Funktionalisierung von Polyoxazolinen benutzt. Poly(2-oxazoline) sind synthetisch leicht zugänglich und besitzen ähnliche Eigenschaften wie PEG-Oberflächen. Aus patentrechtlichen Gründen werden Poly(2-oxazoline) daher häufig auch als PEG-Ersatz verwendet. Um das zellrepulsive Material adhären für Zellen zu gestalten, sollte es mit dem RGD-Zyklopeptid beschichtet werden. Hierfür wurden Boc-geschützte Aminogruppen in die Seitenketten des Polymers eingeführt, die nach Entschützung mit TFA mit der Isothiocyanateinheit von **IC1** umgesetzt werden konnten.<sup>[441]</sup> Eine biologische Testung der Konjugate steht noch aus.

In Kooperation mit A. Schambony (Institut f. Zoologie II, TH Karlsruhe) wurden die linearen Sequenzen getestet. Glasoberflächen wurden in einem *micro contact printing* (μCP) Verfahren mit 19,4 μm breiten Goldbahnen in einem Abstand von

### 3 Peptidische Integrinliganden

42,2  $\mu\text{m}$  beschichtet. Die unbedeckten Glasstreifen wurden anschließend mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan aminoterminiert und mit Hilfe der Isothiocyanatanker mit den Peptiden **IL1** – **IL3** beschichtet (Abbildung 3.7.3 A und B). Um eine unspezifische Zelladhäsion an nichtreagierten Aminogruppen zu verhindern, werden diese mit 4-Methoxyphenyl-isothiocyanat *gecappt*. Kontaktwinkelmessungen mit Wasser an aminoterminierten Oberflächen, die mit verschiedenen Konzentrationen von **IL1** unterschiedlich lange inkubiert wurden, wurden durchgeführt um die Effektivität der Anbindung zu untersuchen (Abbildung 3.7.2). Es zeigte sich, dass der Kontaktwinkel mit zunehmender Inkubationsdauer und Peptidkonzentration abnimmt. Da die Polarität der Peptide verglichen mit der des aminofunktionalisierten Glases größer ist, kann diese Abnahme durch eine höhere Anzahl an gebundenen Peptidmolekülen erklärt werden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass der Kontaktwinkel für alle Konzentrationen in den ersten beiden Stunden sehr stark abnimmt, danach jedoch nur unwesentlich.

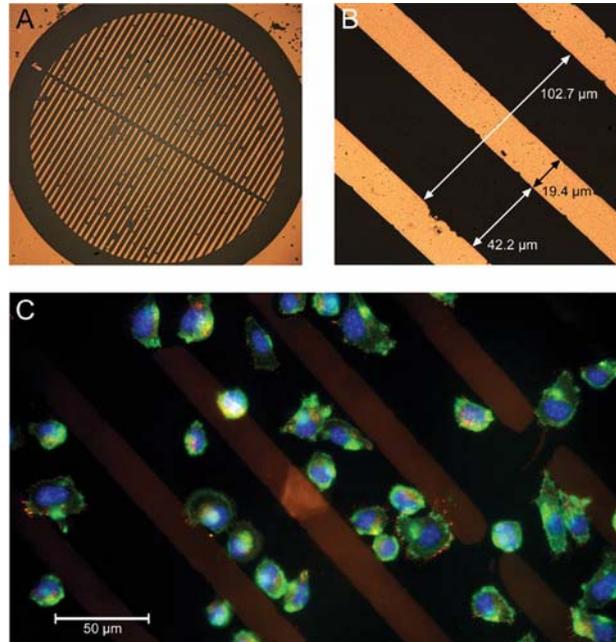


**Abbildung 3.7.2** Entwicklung des Kontaktwinkels eines Wassertropfens (0,5  $\mu\text{L}$ ) auf aminoterminierten Glasoberflächen, welche unterschiedlich lange mit verschiedenen Konzentrationen von **IL1** behandelt wurden.

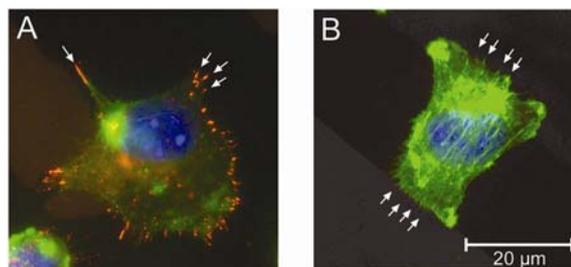
Die Biokompatibilität der Beschichtung wurde mit einer Mausfibroblasten Zelllinie (L cells) untersucht. Nach einer Stunde waren die Zellen auf den GRGDS-funktionalisierten (**IL1**) Bereichen adhärirt, jedoch nicht auf den nichtfunktionalisierten (Abbildung 3.7.3C). In den adhärenenten Zellen konnte durch Immunofärbung gegen F-Actin und Phosphopaxillin eine Umstrukturierung des Cytoskeletts und die Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von Paxillin durch *focal adhesion kinase* und Src-Kinase stellt

### 3 Peptidische Integrinliganden

ein frühes Stadium in der Zelladhäsion an die ECM dar<sup>[442-445]</sup> und ist sowohl essenziell für die Ausbildung von fokalen Adhäsionspunkten und Stressfasern als auch für die Dynamik dieser Strukturen. <sup>[442, 446]</sup>



**Abbildung 3.7.3** Mikrostrukturierte Oberflächen für die Peptidanbindung (A). B zeigt eine Vergrößerung von A mit Pfeilen, die die Dimensionen der funktionalisierten und nichtfunktionalisierten Bereiche angeben. Nach der Beschichtung mit **IL1** adhären Mausfibroblasten fast ausschließlich auf den funktionalisierten Bereichen (C). Immunofärbungen zeigen das Actinfilament (grün) und Phosphopaxillin (rot). Der Zellkern wurde mit DAPI blau gefärbt.



**Abbildung 3.7.4** Gespreitete Zellen, die Stressfasern aufweisen, welche mit Phalloidin (grün) gefärbt wurden. Fokale Adhäsionspunkte, mit Anti-Phosphopaxillin rot gefärbt (A), bilden sich nur auf den funktionalisierten Bereichen, nichtfunktionalisierte Streifen werden überbrückt. Der Nukleus ist jeweils mit DAPI blau gefärbt. Die Größenangabe gilt für beide Teilbilder.

Fokale Adhäsionspunkte wurden vor allem an der Peripherie der Zellen und an den Enden der F-Actin-Bündel gefunden (Abbildung 3.7.4A), was für gut gespreitete Zellen spricht. In einigen Fällen überbrücken Zellen auch nichtfunktionalisierte Bereiche (Abbildung 3.7.4B). Diese Zellen weisen Stressfasern senkrecht zu den

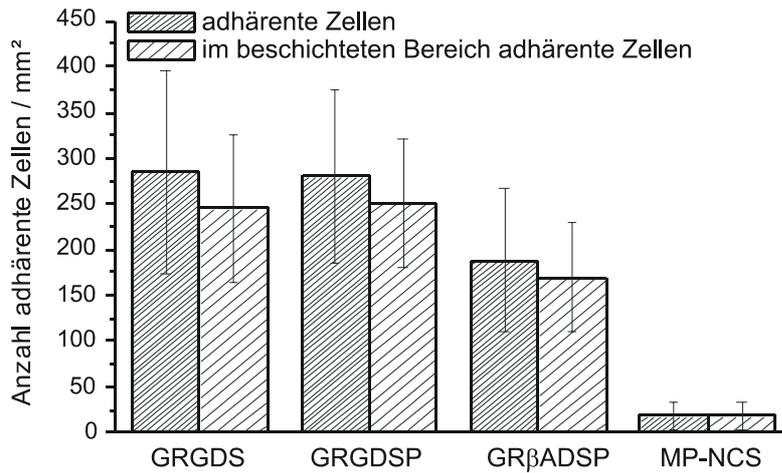
nichtfunktionalisierten Streifen auf und bilden Filopodien vor allem an den Enden aus, an denen sie an den peptidbeschichteten Oberflächen anhaften. Durch die Zugabe von 500 µg / mL von H-GRGDS-OH zum Kulturmedium konnte die Zelladhäsion völlig blockiert werden. Dies zeigt eindeutig, dass die Oberflächenfunktionalisierung und die Zelladhäsion räumlich auf die aminofunktionalisierten Bereiche beschränkt sind und die Zelladhäsion integrinvermittelt ist. Außerdem deuten die Ausbildung von Stressfasern und die Phosphorylierung des Paxillins eher auf aktive und funktionelle fokale Adhäsionspunkte als auf eine unspezifische Adhäsion durch andere Mechanismen hin.

Um die Spezifität der Zelladhäsion weitergehend zu untersuchen, wurden verschiedene Peptide miteinander verglichen. Während H-GRGDS-OH ungefähr die gleiche Aktivität gegen über  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  zeigt,<sup>[447]</sup> ist die Affinität von H-GRGDSP-OH gegenüber  $\alpha_5\beta_1$  erhöht.<sup>[19, 243, 283]</sup> **IL3** wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Peptide, in denen die RGD-Sequenz durch R $\beta$ AD ersetzt ist, zeigen eine 100 – 10000fach niedrigere Integrinaffinität.<sup>[30, 35, 45, 283]</sup>

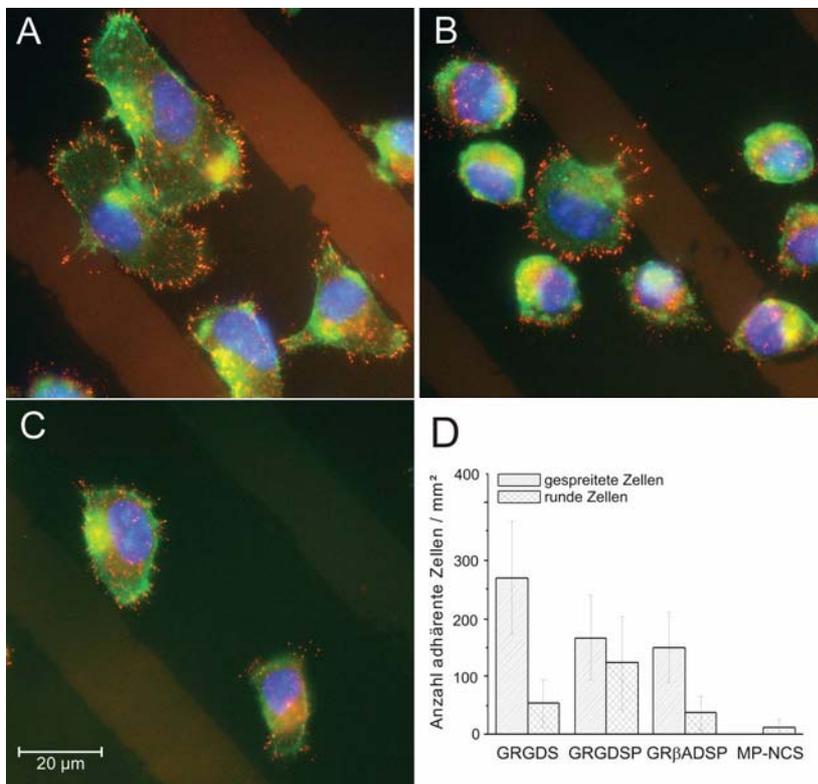
80 – 90 % der Zellen adhärten bei allen Peptiden in den funktionalisierten Bereichen, was zeigt, dass es gelang, strukturierte Oberflächen mit zelladhäsiven und zellabstoßenden Bereichen zu generieren. Jedoch ließen sich signifikante Unterschiede in der Zahl der adhärenen Zellen nachweisen. Bei Oberflächen, die mit **IL1** oder **IL2** beschichtet waren, stellte sich ein Wert von ungefähr 280 Zellen / mm<sup>2</sup> ein. Interessanterweise konnte bei den mit **IL3** beschichteten Oberflächen nur ein Rückgang um 33 % (188 Zellen / mm<sup>2</sup>) gefunden werden. Als eine nichtpeptidische Negativkontrolle wurden mit 4-Methoxyphenyl-isothiocyanat beschichtete Oberflächen eingesetzt, diese verhinderten die Zelladhäsion vollständig (Abbildung 3.7.5).

Diese Zellantwort auf die Negativkontrolle **IL3** war nicht erwartet worden, da R $\beta$ AD-Peptide keine Zelladhäsion stimulieren sollten. Weiterhin kann die beobachtete Zelladhäsion nicht auf einer unspezifischen Adhäsion an der aminofunktionalisierten Oberfläche beruhen, da nach der Peptidanbindung verbleibende Aminogruppen mit 4-Methoxyphenyl-isothiocyanat umgesetzt wurden. Andererseits sind ähnliche Beobachtungen von Zelladhäsion an Kontrollpeptiden auch in der Literatur beschrieben.<sup>[31, 45, 448]</sup>

### 3 Peptidische Integrinliganden



**Abbildung 3.7.5** Anzahl der adhärenter Zellen auf peptidmodifizierten, strukturierten Oberflächen.



**Abbildung 3.7.6** Zellen, die auf mit **IL1** beschichteten Proben adhärten, spreiteten deutlich und zeigten eine ausgeprägte Formierung von Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten (A), während auf **IL2** funktionalisierten Oberflächen nur etwa die Hälfte der Zellen gespreitet war (B). Auf Oberflächen, die mit dem Kontrollpeptid **IL3** beschichtet waren, adhärten deutlich weniger Zellen, die jedoch zum Spreiten und zur Ausbildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten neigten (C). Der Graph in D zeigt die Anzahl der gespreiteten und runden Zellen für die einzelnen Peptide und MP-NCS.

Auf mit **IL1** beschichteten Proben waren alle Zellen gespreitet und die Formation von Stressfasern war zu erkennen (Abbildung 3.7.6 A und D). **IL2** unterstützte die Zelladhäsion ungefähr genauso gut, jedoch waren nur 54 % der Zellen gespreitet und hatten Stressfasern und fokale Adhäsionspunkte ausgebildet (Abbildung 3.7.6 B und D). Fibroblasten bilden die fokalen Adhäsionspunkte vor allem durch das  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, das an GRGDS bindet, GRGDSP und damit **IL2** zeigte eine höhere Affinität zu  $\alpha_5\beta_1$ .<sup>[19, 243, 283]</sup> Auf mit **IL3** beschichteten Oberflächen war der größte Teil der Zellen gespreitet, wobei die Ausbildung der Filopoden und Lamellopoden nicht soweit fortgeschritten war wie bei den RGD-Peptiden (Abbildung 3.7.6 C und D). Daher scheint die Adhäsion zwar spezifisch aber nicht sehr affin zu sein.

### 3.8 Multimere, cyclische RGD-Peptide

Von U. Hersel wurden multimere RGD-Peptide mit Tricysteinanker synthetisiert.<sup>[300]</sup> Diese Peptide wurden in der Arbeitsgruppe von J. Spatz an nanostrukturierten Goldoberflächen getestet. Hierbei handelt es sich um Glasoberflächen, auf denen in einem definierten Abstand Goldkügelchen von < 8 nm Durchmesser aufgebracht sind. Werden an diese Goldkügelchen monomere RGD-Peptide mit Tricysteinanker aufgebracht, zeigte sich, dass eine Zelladhäsion von MC3T3 Mausosteoblasten nur bis zu einem Abstand der Goldpunkte von 58 nm stimuliert werden kann. Wird der Abstand größer, findet keine Zelladhäsion mehr statt.<sup>[253]</sup> Werden jedoch tetramere RGD-Peptide aufgebracht, findet die Zelladhäsion auch auf Oberflächen mit einem Abstand der Goldkügelchen von 100 - 120 nm statt.<sup>[449]</sup>

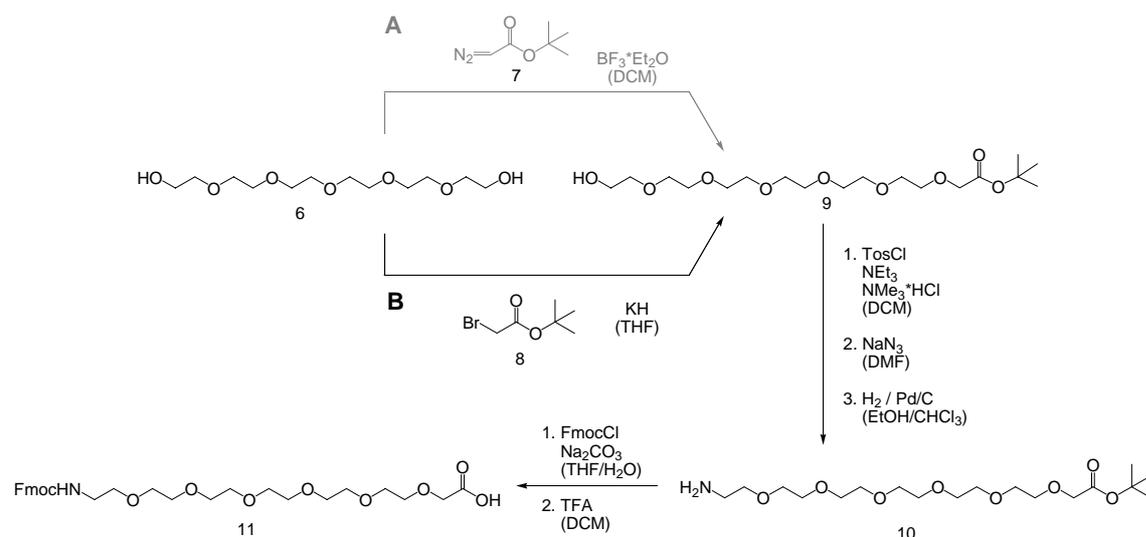
In weiteren Experimenten soll nun untersucht werden, ob auch mit einem trimeren RGD-Peptid die Zelladhäsion auf diesen Oberflächen stimuliert werden kann. Im einem gängigen Modell zur integringesteuerten Zelladhäsion wird von einer Trimerisierung der  $\beta$ -Untereinheit ausgegangen, wozu drei RGDs in engerer Nachbarschaft erforderlich sind.<sup>[450]</sup> Des Weiteren soll untersucht werden, wie sich die Zellen auf Oberflächen verhalten, die mit Tetrameren beschichtet sind, bei denen 1, 2 oder 3 RGDs durch R $\beta$ ADs ausgetauscht sind.

Von U. Hersel wurden die dendritischen RGD-Peptide sequenziell an der festen Phase aufgebaut. Ausgehend von *N*-Fmoc-*S*-Trt-Cystein, wurde als Verzweigungseinheit *N,N'*-Bis-Fmoc-Lysin gefolgt von *N*-Fmoc-Hegas **11** gekuppelt. Abschließend wurde das Zylopeptid **Z3\*** angehängt, vom Harz abgespalten und mit TFA / TIPS / Wasser entschützt. Die anschließende HPLC-Reinigung stellte, bedingt

### 3 Peptidische Integrinliganden

durch viele sehr ähnliche Nebenprodukte – die zum Teil aus unvollständigen Kuppelungen, oder den nicht aufgereinigten Edukten **Z3\*** und *N*-Fmoc-Hegas stammen – ein großes Problem dar, so dass eine größere Anzahl an Verbindungen, wie sie durch den Austausch von RGDs gegen R $\beta$ ADs entsteht, auf diese Weise nicht mehr in einem vertretbaren Zeitrahmen herzustellen sind.

Zum einen wurde die erste Stufe der *N*-Fmoc-Hegas **11** Synthese umgestellt (Abbildung 3.8.1). Dies hat einen reinen Kostenaspekt, die Qualität von Produkt **9** ist davon nicht beeinflusst. Hexaethylglycol **6** wird mit Kaliumhydrid in THF deprotoniert und anschließend mit Bromessigsäure-*tert.*-butylester **8** umgesetzt. Dadurch konnten die Eduktkosten um 56 % gegenüber Reaktionsweg A mit Diazoesigsäure-*tert.*-butylester **7** gesenkt werden. Der restliche Syntheseweg wurde unverändert beibehalten. Der *tert.*-Butylester **9** wird erst in das Tosylat und anschließend das Azid überführt. Dieses wird katalytisch reduziert (**10**) und anschließend erfolgen die Fmoc-Schützung und die Spaltung des *tert.*-Butylesters zum Produkt **11**.



**Abbildung 3.8.1** Alter (A) und neuer (B) Syntheseweg der Spaceraminosäure *N*-Fmoc-Hegas **11**.

Um die HPLC-Reinigung der Endprodukte zu erleichtern, wurden an der festen Phase folgende Zwischenprodukte hergestellt, abgespalten und dann durch präparative HPLC gereinigt.

- 12** *cyclo*(-R(Pbf)GD(*t*Bu)fE-)-Hegas-OH
- 13** *cyclo*(-R(Pbf) $\beta$ AD(*t*Bu)fE-)-Hegas-OH
- 14** *cyclo*(-R(Pbf)GD(*t*Bu)fE-)-Hegas-K[Hegas-*cyclo*(-R(Pbf) $\beta$ AD(*t*Bu)fE-)]-OH

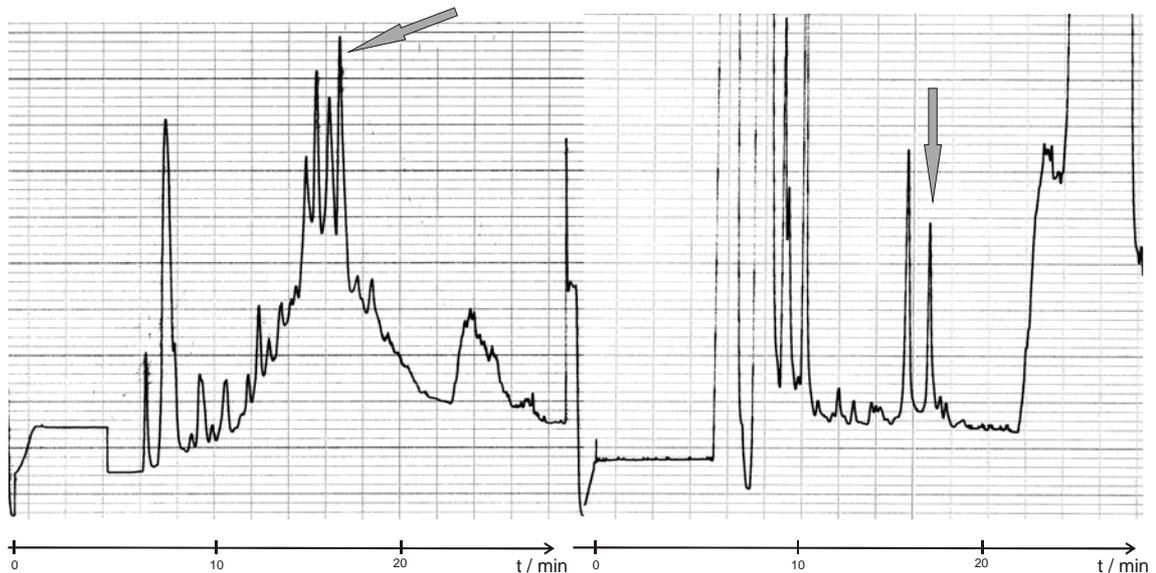
### 3 Peptidische Integrinliganden

Die Kupplungen erfolgten mit Triphosgen / DIPEA in THF, die Kupplungszeiten wurden nach 30minütiger Voraktivierung auf 24 h ausgedehnt um mit einem Überschuss von 0,2 – 0,5 eq. ausreichend gute Kupplungen zu erzielen.

Diese Fragmente wurden anschließend mit HATU / HOAt an das Grundgerüst bestehend aus harzgebundenem Tricystein mit Trityl-Schutzgruppen und einer Verzweigungseinheit aus *N,N*'-Bis-Fmoc-Lysin und *N*<sup>α</sup>-Fmoc-*N*<sup>ε</sup>-ivDde-Lysin gekuppelt um folgende Tetra- bzw. Trimere zu erhalten. **D3** und **D5** konnten allerdings auf diesem Weg nicht erhalten werden, da sich **14** weder mit HATU noch mit Triphosgen kuppeln ließ.



Wie in Abbildung 3.8.2 für das Tetramer **D2** exemplarisch gezeigt wird, ist die HPLC-Reinigung der so synthetisierten Dendrimere problemlos zu bewerkstelligen.



**Abbildung 3.8.2** Chromatogramm der semipräparativen HPLC-Reinigung von **D2**. rechts: Chromatogramm mit deutlicher Basislinientrennung nach dem neuen Syntheseweg unter Verwendung des aufgereinigten Bausteins **12**; links: Chromatogramm unter Verwendung der „alle Kupplungen an einem Harz“-Strategie von U. Hersel. Hier liegt der Produktpeak in einem Hügel aus Nebenprodukten. Gradient: 25 auf 38 % MeCN in 18 min.

Die biologische Evaluierung der gemischten Tetramere und des Trimers bei J. Spatz ist noch nicht abgeschlossen. Erste Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei einem Abstand der Goldpunkte von 110 nm mit dem trimeren und tetrameren RGD (**D1** und **D2**) die Zelladhäsion stimuliert werden kann, nicht jedoch mit dem gemischten Tetramer **D4**.

## 3.9 Andere Zelladhäsionssequenzen

### 3.9.1 Lineare Lamininsequenzen mit Acrylatanker

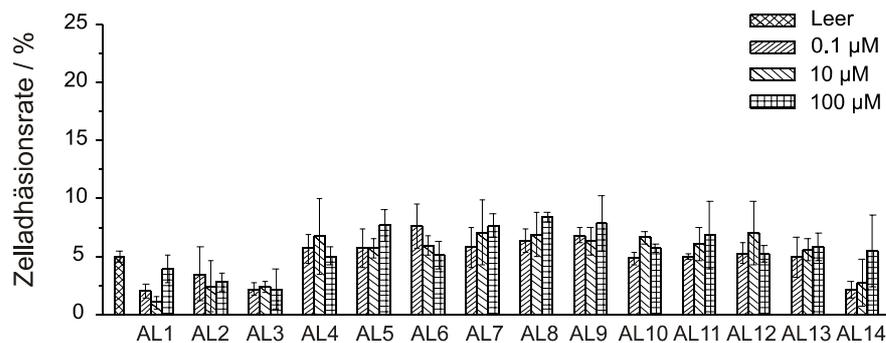
Neben dem RGD-Peptid sind in der Literatur viele weitere Adhäsionspeptide (und -glycoside) beschrieben.<sup>[34]</sup> Diese können Liganden für Integrine, aber auch andere Zelladhäsionsrezeptoren sein. Topkin<sup>®</sup>-Folien, die aus einem Kopolymer aus D, L-Lactid und  $\epsilon$ -Caprolacton bestehen, werden in der Medizin für die Abdeckung von frischen, traumatischen Wunden z. B. bei offenen Frakturen benutzt. Für die biologische Funktionalisierung dieser Oberflächen sollte eine Peptidsequenz gefunden werden, die in der Lage ist, Keratinocyten zu binden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Keratinocyten durch das  $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin an Laminin binden.<sup>[451]</sup> In Vorversuchen mit *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Acryloyl konnte gezeigt werden, dass der Acrylatanker geeignet ist, Peptide auf dem Topkin<sup>®</sup>-Material zu immobilisieren. Daraufhin wurden folgende Peptidsequenzen synthetisiert, die aus einer dem Laminin entnommenen Adhäsionssequenz und einem *Linker* aus Acryloyl-Ahx-Ahx bestehen.

<b>AL1</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-YIGSR-OH <sup>[452]</sup>
<b>AL2</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-PDSGR-OH <sup>[452]</sup>
<b>AL3</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-SIKVAV-OH <sup>[453]</sup>
<b>AL4</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-LGTIPG-OH <sup>[454]</sup>
<b>AL5</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-IKVAV-OH <sup>[454]</sup>
<b>AL6</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-SEIKLLIS-OH <sup>[454]</sup>
<b>AL7</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-EIKLLIS-OH <sup>[454]</sup>
<b>AL8</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-IGSR-OH
<b>AL9</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-KQNCLS-OH
<b>AL10</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-EPDIM-OH <sup>[451]</sup>
<b>AL11</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-NKDIL-OH <sup>[451]</sup>
<b>AL12</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-NKDIL-OH
<b>AL13</b>	Acyloyl-Ahx-Ahx-EPDIL-OH

#### AL14 Acyloyl-Ahx-Ahx-YIGSR-NH<sub>2</sub><sup>[452]</sup>

Die Peptide wurden nach Standard Fmoc-Strategie<sup>[365]</sup> am TCP-Harz<sup>[368]</sup> bzw. **AL14** am Rink-Amid-Harz<sup>[455]</sup> synthetisiert. Die Ankereinheit aus Acyloyl-Ahx-OH **A1** wurde zuvor in Lösung synthetisiert und dann an die Peptidkette gekuppelt. Die fertigen Peptide wurden mit TFA / Wasser / TIPS von der festen Phase abgespalten, gleichzeitig entschützt und dann HPLC gereinigt.

Bei *Biomet Deutschland GmbH* wurden die Peptide durch UV-Bestrahlung an das Topkin<sup>®</sup>-Material gebunden und ein Adhäsionstest mit HaCaT-Zellen durchgeführt. Keines der Peptide **AL1 – AL14** war jedoch in der Lage die Zelladhäsion zu stimulieren (Abbildung 3.9.1). Dies könnte daran liegen, dass die verwendeten Peptide in der Literatur nur ohne *Linker* beschrieben sind, d.h. mit freiem N-Terminus. Peptide, für die eine Adhäsionsstimulation auf Oberflächen beschrieben ist, waren nur adsorptiv an die Oberfläche gebunden.<sup>[451, 452]</sup>



**Abbildung 3.9.1** Adhäsion von HaCaT-Zellen an mit **AL1 – AL14** beschichteten Topkin<sup>®</sup>-Oberflächen.

#### 3.9.2 Zyklische LDT-Peptide mit Acrylatanker

Von J. Boer wurden einige zyklische Hexapeptide identifiziert, die die LDT-Sequenz enthalten und an das  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin binden.<sup>[144]</sup> Einige der aktiven Peptide enthalten neben der LDT-Sequenz auch ein Aspartat, dieses könnte zur Funktionalisierung des Zyklopeptides mit einem *Linker* benutzt werden. Wenn die Seitenkette des Aspartats nicht in die Bindung eingreift, sollte auch der Einbau eines Lysins an dieser Stelle möglich sein. Als Anker für erste Untersuchungen wurde ein Acrylatanker gewählt, da damit die Immobilisierung auf PMMA möglich ist und die Tests durch G. Chmel (Biophysik, TUM) durchgeführt werden konnten.

Die teilgeschützten Zyklopeptide **Z8\*** und **Z9\*** wurden an der festen Phase aufgebaut und in Lösung zyklisiert. Danach wurden in einer Fragmentkupplung die

### 3 Peptidische Integrinliganden

*Linker* **A2** bzw. **A3** angehängt bzw. mit Essigsäureanhydrid acyliert. Anschließend wurden die Verbindungen mit TFA entschützt und mittels HPLC gereinigt.

Um den Effekt des *Linkers* auf die Bindung zu überprüfen, wurde zuerst die Aktivität der nicht immobilisierten Verbindungen gemessen. Die Tests wurden von M. Semmrich (Forschergruppe Sepsis, Klinikum r. d. Isar) durchgeführt. Die Integrinaffinität wird dabei über die Reduktion der Adhäsion von Zellen an MAdCAM bestimmt (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1** Inhibierung der Adhäsion von 38- $\beta$ 7 Lymphomzellen an MAdCAM durch die Cyclopeptide.

	Verbindung	Adhäsion [%]
<b>Z8</b>	<i>cyclo</i> (-LDTDpF-)	14,5 $\pm$ 2
<b>Z9</b>	<i>cyclo</i> (-LDTKpF-)	13 $\pm$ 3
<b>C<sup>L1</sup></b>	<i>cyclo</i> (-LDTK(Ac)pF-)	12 $\pm$ 0
<b>AC<sup>L1</sup></b>	<i>cyclo</i> (-LDTDpF-)-Diamin-Ahx-Ahx-Acyloyl	13,5 $\pm$ 4
<b>AC<sup>L2</sup></b>	<i>cyclo</i> (-LDTKpF-)-Ahx-Ahx-Ahx-Acyloyl	48 $\pm$ 6*

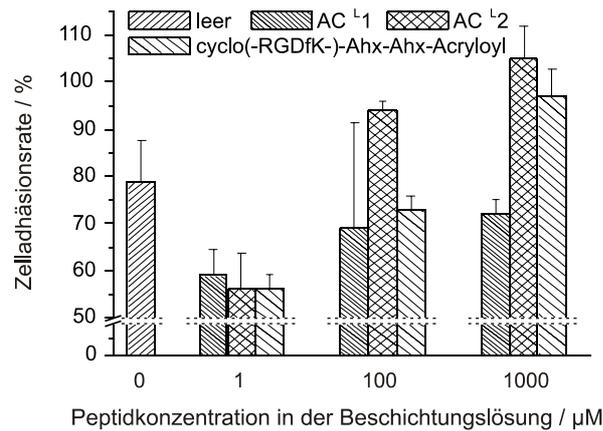
\* Verbindung ist unter den Testbedingungen ausgefallen. Die Peptidkonzentration betrug 1,45  $\mu$ mol/mL. Die Werte stammen aus einer Doppelbestimmung.

Wie aus den Affinitätsstudien zu erkennen ist, hat die Modifizierung der LDT-Peptide mit einem *Linker* keinen Einfluss auf die Bindung an das Integrin. Auch ein Austausch Asp gegen Lys, sowie eine anschließende Seitenkettenmodifikation ist ohne Affinitätsverlust möglich.

Die Peptide **AC<sup>L1</sup>** und **AC<sup>L2</sup>** sollten ursprünglich über die Acrylatfunktion an PMMA-Oberflächen angebunden werden. Jedoch konnten dann im Zelladhäsionstest die 38- $\beta$ 7 Lymphomzellen nicht mehr detektiert werden. Sowohl der Hexosaminidasetest, eine Fluoreszenzfärbung der DNA mit Höchst 33258,<sup>[456]</sup> wie auch die Reaktion mit MTT<sup>[457]</sup> ließen keine Quantifizierung der Zellen zu. Da bei *Biomet Deutschland GmbH* erfolgreich Versuche gemacht wurden, *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Acyloyl direkt in Zellkulturplatten aus Polystyrol zu immobilisieren, wurde diese Vorgehensweise auch für die beiden LDT-Peptide gewählt, da in der Gruppe von M. Semmrich eine Methode etabliert ist, die 38- $\beta$ 7 Zellen in 96-*well* Platten zu quantifizieren. Die Immobilisierung erfolgte durch Bestrahlen von Peptidlösungen unterschiedlicher Konzentration in 2-Propanol direkt in den Vertiefungen der Zellkulturplatte. Anschließend wurden die Platten mit BSA geblockt und die Zelladhäsion untersucht. Wie in Abbildung 3.9.2 zu sehen ist, nimmt die Zelladhäsionsrate mit

### 3 Peptidische Integrinliganden

steigender Peptidkonzentration zwar zu, jedoch ist der Leerwert mit ca. 80 % Zelladhäsion extrem hoch. Außerdem scheint die Zelladhäsion nicht ganz spezifisch zu sein, denn auch auf den mit *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Acryloyl beschichteten Oberflächen fand eine erhöhte Zelladhäsion statt. In einer FACS-Analyse wurde darauf hin nochmals bestätigt, dass die Zellen nicht die  $\beta 3$ -Untereinheit exprimieren und daher auch nicht an die RGD-Peptide binden sollten. Hier besteht noch weiterer Klärungsbedarf, evtl. auch mit anderen Zelllinien und einer anderen Detektion.



**Abbildung 3.9.2** Adhäsion von 38- $\beta 7$  Zellen an mit ACL1 und ACL2 beschichteten Polystyroloberflächen.

#### 3.9.3 Zyklische RGD-Peptide als Thrombocyten-Liganden

Von M. Gurrath wurden zyklische Hexapeptide identifiziert, die die RGD-Sequenz enthalten und an das  $\alpha \text{IIb} \beta 3$ -Integrin binden. Als eines der aktiven Peptide fiel dabei die Verbindung *cyclo*(-RGDfVG-) auf.<sup>[458]</sup> Bereits beim  $\alpha \text{v} \beta 3$ -Liganden *cyclo*(-RGDfV-) führte der Austausch von Valin gegen Lysin oder Glutamat zu Verbindungen, die mit einem *Linker* an Oberflächen angebunden werden können,<sup>[459]</sup> daher wurde diese Strategie auch in diesem Fall angewendet. Das resultierende Hexapeptid *cyclo*(-R(Pbf)GD(*t*Bu)fKG-) **Z7\*** kann dann durch Fragmentkupplung an bestehende Linkersysteme (**I1**, **A4**) gekuppelt werden. Nach Entschützung und HPLC-Reinigung wurden folgende Verbindungen erhalten:

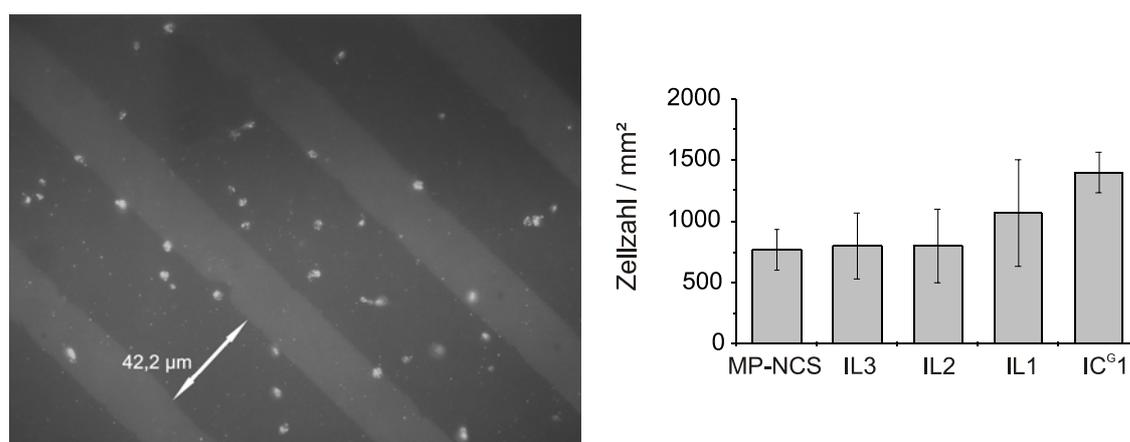
**IC<sup>G1</sup>** *cyclo*(-RGDfKG-)-Ahx-Ahx-Ahx- PDIT

**AC<sup>G1</sup>** *cyclo*(-RGDfKG-)-Ahx-Ahx-Ahx-Acryloyl

Mit **IC<sup>G1</sup>** wurden von A. Schambony (TH Karlsruhe, Institut f. Zoologie II) Zelladhäsionstests mit primären, humanen Thrombocyten durchgeführt. Die Immobilisierung des Peptids erfolgte dabei auf den in Kapitel 3.7 benutzten mic-

rostrukturierten, aminofunktionalisierten Glasoberflächen. Als Vergleich dienten die linearen RGD-Peptide **IL1**, **IL2** und **IL3**.

Wie in Abbildung 3.9.3 zu erkennen ist, zeigt sich bei den mit **IC<sup>G1</sup>** beschichteten Oberflächen eine verstärkte Adhäsion der Thrombocyten. Die starke Hintergrundaktivität sowohl der mit Methoxyphenylisothiocyanat (MP-NCS) als auch mit den **IL1** - **IL3** beschichteten Oberflächen kommt zum einen durch die Verwendung primärer Zellen, zum anderen durch das ausgeprägte Adhäsionsverhalten von Thrombocyten, welches sich durch ihre biologische Funktion erklären lässt.



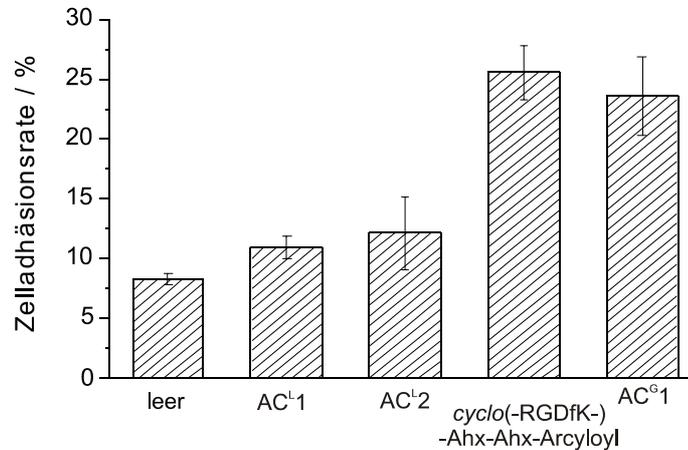
**Abbildung 3.9.3** Adhäsion von primären, humanen Thrombocyten an strukturierten Glasoberflächen nach 1,5h. Die Zellen im linken Bild wurden mit Anti-Phosphopaxillin gefärbt.

#### 3.9.4 Selektivitätsvergleich der verschiedenen Adhäsionssequenzen

PMMA-Oberflächen wurden mit Peptiden mit unterschiedlicher Integrinspezifität beschichtet. Zur Verankerung wurde jeweils der Acrylatanker gewählt. Als  $\alpha v \beta 3$  /  $\alpha v \beta 5$ -selektiver Ligand diente die von M. Kantlehner entwickelte Verbindung *cyclo*(-RGDfK)-Ahx-Ahx-Arcyloyl.<sup>[30]</sup> Daneben wurden die, die LDT-Sequenz enthaltenden,  $\alpha 4 \beta 7$ -aktiven Peptide **AC<sup>L1</sup>** und **AC<sup>L2</sup>** sowie das  $\alpha IIb \beta 3$ -aktive Peptid **AC<sup>G1</sup>** benutzt. Auf den beschichteten PMMA-Oberflächen wurde ein Zelladhäsionstest mit Mausosteoblasten durchgeführt.

MC3T3-E1 Mausosteoblasten, die vor allem die  $\alpha v \beta 3$  und  $\alpha v \beta 5$ -Integrine exprimieren,<sup>[460]</sup> zeigen an Oberflächen, die mit den RGD-haltigen Peptiden *cyclo*(-RGDfK)-Ahx-Ahx-Arcyloyl und **AC<sup>G1</sup>** beschichtet wurden, eine verstärkte Adhäsion (Abbildung 3.9.4). **AC<sup>G1</sup>** ist dabei zwar etwas weniger aktiv, jedoch hätte der große Unterschied in den Bindungsaffinitäten der gelösten Substanzen an isolierten Integrinrezeptoren ( $IC_{50}$   $2 \mu M_{\alpha v \beta 3}$ ,  $20 nM_{\alpha IIb \beta 3}$  für **AC<sup>G1</sup>**;  $9,9 nM_{\alpha v \beta 3}$ ,  $10$

$\mu\text{M}_{\alpha\text{IIb}\beta_3}$  für *cyclo(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Arcyloyl*) einen deutlicheren Unterschied erwarten lassen. An mit **AC<sup>L</sup>1** und **AC<sup>L</sup>2** beschichtetem PMMA liegt der Wert, wie zu erwarten war, im Bereich der unbeschichteten PMMA-Probe.



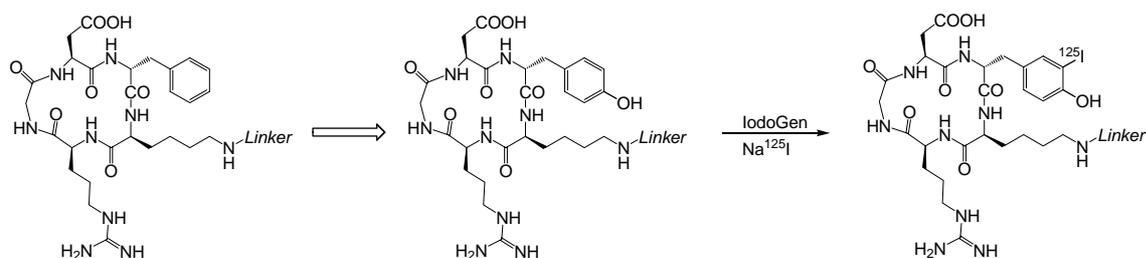
**Abbildung 3.9.4** Adhäsion von MC3T3-E1 Mausosteoblasten an modifizierten PMMA-Oberflächen mit Liganden mit unterschiedlicher Integrinspezifität. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  in der Beschichtungslösung eingesetzt.

Diese Experimente verdeutlichen auf ein Neues, dass die erhöhte Zelladhäsion auf einer spezifischen Wechselwirkung der Integrine mit ihren jeweiligen Liganden zurückzuführen ist und nicht durch eine unspezifische Wechselwirkung mit oberflächengebundenen Peptiden entsteht.

### 3.10 Bestimmung der Oberflächenbelegung

Bei allen in den vorangegangenen Kapiteln aufgeführten Oberflächenbeschichtungen stellte sich das Problem, dass nie genau quantifiziert werden konnte, wie groß die oberflächengebundene Peptidmenge ist. Auch mit dem von *Biomet* benutzten ELISA ist nur eine semiquantitative Bestimmung der Oberflächenbelegung möglich. Für drei Oberflächen-Peptid-Systeme wurde diese dann mit Hilfe einer Radiomarkierung des Peptides bestimmt. Dazu wurde im Lysinzyklus das D-Phenylalanin durch D-Tyrosin ausgetauscht (**Z6\***). Dieser Austausch ermöglicht die Einführung von Iod-125 ( $T_{1/2} = 60$  d) nach der IodoGen<sup>®</sup> (1,3,4,6-Tetrachlor-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphenylglycoluril)-Methode (Abbildung 3.10.1).<sup>[461, 462]</sup>

### 3 Peptidische Integrinliganden



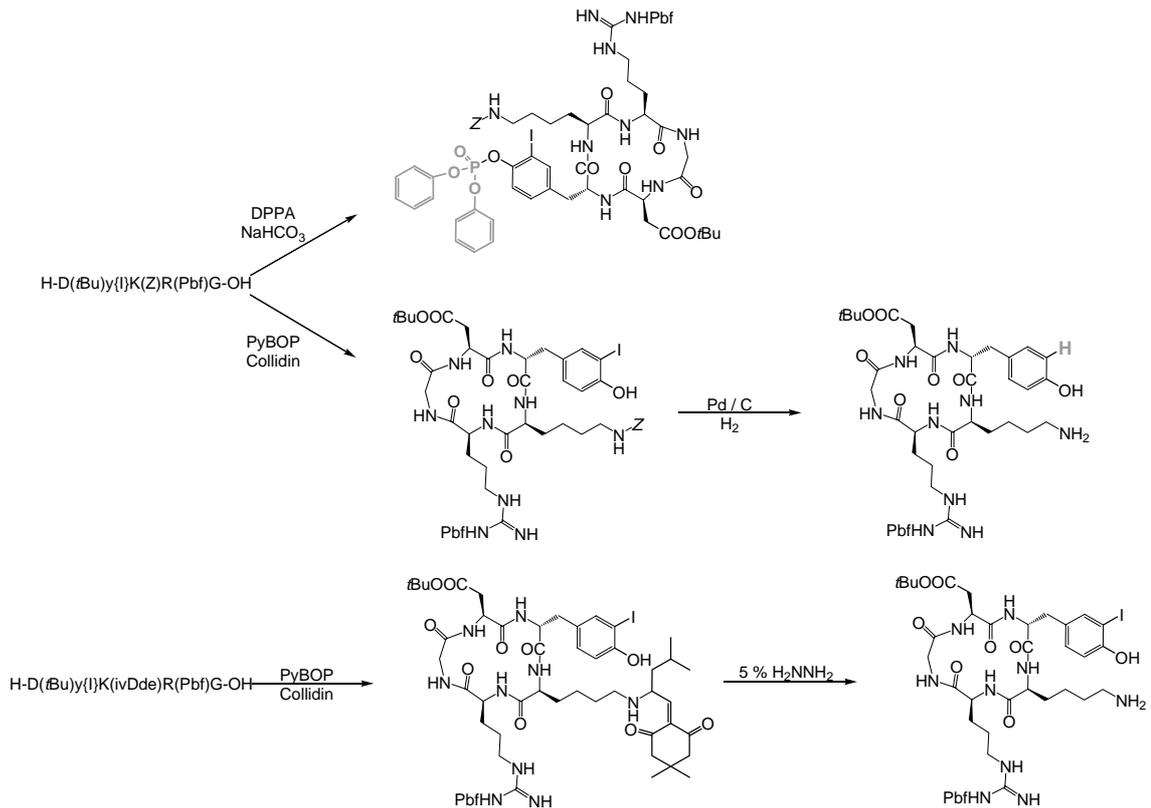
**Abbildung 3.10.1** Schematische Darstellung der Synthese der radiomarkierten Peptide.

Als Referenzverbindung und zur Verdünnung wurden zusätzlich auch die kalten Iodverbindungen synthetisiert (Austausch von D-Phe gegen D-3-Iodtyrosin **15**). Dazu wurde D-Tyrosin in ammoniakalischer Lösung mit elementarem Iod iodiert (**15**) und anschließend Fmoc-geschützt (**16**).<sup>[463]</sup> Die Phenolgruppe blieb in der weiteren Synthese ungeschützt. Dadurch ergab sich bei der Zyklisierung das Problem, dass mit DPPA als Aktivierungsreagenz die Hydroxylgruppe zum Diphenylphosphorsäureester umgesetzt wurde. Dieser kann nach Literatur nur mit HF gespalten werden.<sup>[464]</sup> Die Zyklisierung gelang schließlich mit PyBOP und Collidin. Damit die Konzentration an aktivierter Spezies möglichst gering bleibt, wurde das PyBOP in drei Portionen über 10 h zugegeben, wodurch keine Dimerisierung festgestellt werden konnte. Bei der anschließenden partiellen Entschützung des Lysins zeigte sich, dass unter den Standardbedingungen für die Z-Entschützung (Pd/C, Wasserstoff) auch das Iod durch Wasserstoff ersetzt wird. Abhilfe konnte durch den Einsatz von Fmoc-K(ivDde)-OH anstatt Fmoc-K(Z)-OH geschaffen werden. Unter den Bedingungen für die ivDde-Entschützung (5 % Hydrazin / DMF) war das Iodtyrosin stabil (Abbildung 3.10.2). Anschließend wurde das partiell geschützte Zyklopeptid **Z5\*** mit dem für die jeweilige Oberfläche passenden *Linker* konjugiert (HATU / HOAt / Collidin in DMF), entschützt und HPLC-gereinigt.

Die entsprechenden tyrosinhaltigen Verbindungen für die Radiomarkierung wurden durch Fragmentkupplungen (HATU / HOAt / Collidin in DMF) der jeweiligen *Linker* mit dem Zyklopeptid **Z6\*** und anschließender Entschützung und HPLC-Reinigung erhalten.

- AC<sup>y</sup>1**     *cyclo*(-RGDyK-)-Ahx-Ahx-Acryloyl
- AC<sup>y</sup>11**    *cyclo*(-RGDy{I}K-)-Ahx-Ahx-Acryloyl
- AC<sup>y</sup>2**     *cyclo*(-RGDyK-)-Ahx-Ahx-Ahx-Pentenoyl
- AC<sup>y</sup>12**    *cyclo*(-RGDy{I}K-)-Ahx-Ahx-Ahx-Pentenoyl
- PC<sup>y</sup>1**     *cyclo*(-RGDyK-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub>
- PC<sup>y</sup>11**    *cyclo*(-RGDy{I}K-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

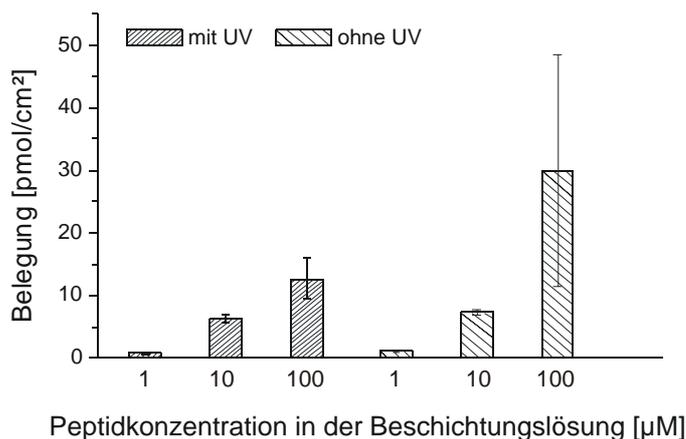
### 3 Peptidische Integrinliganden



**Abbildung 3.10.2** Synthese von  $\text{cyclo-(R(Pbf)GD}(t\text{Bu})y\{I\}K\text{-}) \mathbf{Z5^*}$  und die dabei auftretenden Schwierigkeiten; Bildung des Phosphorsäureesters mit DPPA, Verlust des Halogens durch Hydrierung.

#### 3.10.1 PMMA-Oberflächen

Für PMMA-Plättchen ( $\varnothing$  6 mm) wurden Peptide mit Acrylat-Linker **A2** verwendet. Für die Beschichtung wurden kaltes (**ACy1**) und heißes Peptid im Verhältnis 625 : 1 gemischt und auf die Konzentrationen 100, 10 und 1  $\mu\text{M}$  eingestellt. Eine Messung mit reinem heißem Peptid war aufgrund des Messbereichs des  $\gamma$ -Counters nicht möglich. Die anschließende Beschichtung erfolgte nach dem Standardprotokoll von *Biomet* und außerdem ohne UV-Bestrahlung.



**Abbildung 3.10.3** Belegung von PMMA-Plättchen nach Beschichtung mit radiomarkiertem *cyclo(-RGDγ{I}K)-Abx-Abx-Acryloyl ACy11*. Pro Plättchen wurden 10 µL Peptidlösung aufgetragen.

Wie aus Abbildung 3.10.3 ersichtlich ist, liegt die Belegungsdichte von PMMA mit dem Acrylatpeptidanalogen zwischen 0,8 und 30 pmol/cm<sup>2</sup>. Wie sich auch schon in den Versuchen mit dem Benzophenonanker (Kapitel 3.3) gezeigt hat, ist die radikalische Beschichtung auch in Abwesenheit von UV-Licht möglich.

#### 3.10.2 Siliziumoberflächen

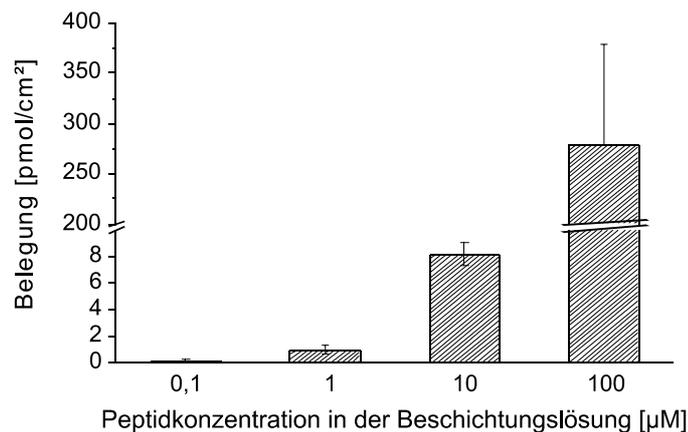
Monokristalline und amorphe Siliziumoberflächen können mit Peptiden mit Pentenoylanker beschichtet werden.<sup>[400]</sup> Um eine evtl. vorhandenen Oxidschicht zu entfernen, wurden die Plättchen vor der Beschichtung in HF-Dampf angeätzt. Anschließend wurden die Proben in einer Lösung des Peptids (**ACy12**) (1 mg/mL, kalt : heiß 9,7 : 1) in NMP über Nacht bei 80 °C gelagert. Danach wurde die Aktivität der Proben im  $\gamma$ -Counter bestimmt.

Für die Belegung von monokristallinem Silizium wurde ein Wert von 19,7 fmol/cm<sup>2</sup> bestimmt. Da nur zwei Proben (Leerwert und Beschichtung) zur Verfügung standen, konnte nur eine einzige Messung durchgeführt werden. Bei amorphem Silizium, das auf Glas aufgebracht ist, ergab sich eine Belegung von  $0,42 \pm 0,024$  pmol/cm<sup>2</sup>. Diese Werte sind deutlich geringer als bei PMMA. Verglichen mit einer Monolage sind diese Werte um 10 bis 12 Größenordnungen geringer.

#### 3.10.3 Titanoberflächen

Für Titanplättchen ( $\varnothing$  10 mm, 2 mm hoch) wurden Peptide mit Phosphonatanker und drei Aminohexansäuren als *Spacer* (**P1\***) verwendet. Für die Beschichtung wurden kaltes (**PC<sup>1</sup>I**) und heißes Peptid im Verhältnis 83 : 17 gemischt und auf die Konzentrationen 100, 10, 1 und 0,1  $\mu\text{M}$  mit PBS eingestellt. Eine Messung mit reinem heißem Peptid war aufgrund des Messbereichs des  $\gamma$ -Counters nicht möglich. Die anschließende Beschichtung erfolgte nach dem Standardprotokoll von *Biomet*. Nach diesem Protokoll sind die Formkörper von allen Seiten mit der Beschichtungslösung umgeben, es wurde daher angenommen, dass auch auf der gesamten Oberfläche Peptid anbindet.

Die Oberflächenbelegung von Titan mit dem Analogon **PC<sup>1</sup>I** zum Phosphonatpeptid **PC1** liegt im Bereich von 0,2 pmol/cm<sup>2</sup> bis 278 pmol/cm<sup>2</sup> und ist damit deutlich höher als mit den entsprechenden Peptiden auf PMMA und Silizium (Abbildung 3.10.4).



**Abbildung 3.10.4** Belegung von Titanplättchen nach Beschichtung mit radiomarkiertem cyclo(-RGD $\gamma$ {I}K)-Abx-Abx-Abx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> **PC<sup>1</sup>I**. Pro Plättchen wurden 300  $\mu\text{L}$  Peptidlösung aufgetragen.

Mit der Radiomarkierung wurde eine einfache und sehr gut quantifizierbare Methode gefunden, um die Oberflächenbelegung der verschiedenen Materialien mit den entsprechend modifizierten RGD-Peptiden zu bestimmen. Jedoch wird bei diesem Verfahren davon ausgegangen, dass der Austausch des D-Phenylalanins gegen D-3-Iodtyrosin keinen Einfluss auf die Belegungsichte hat.



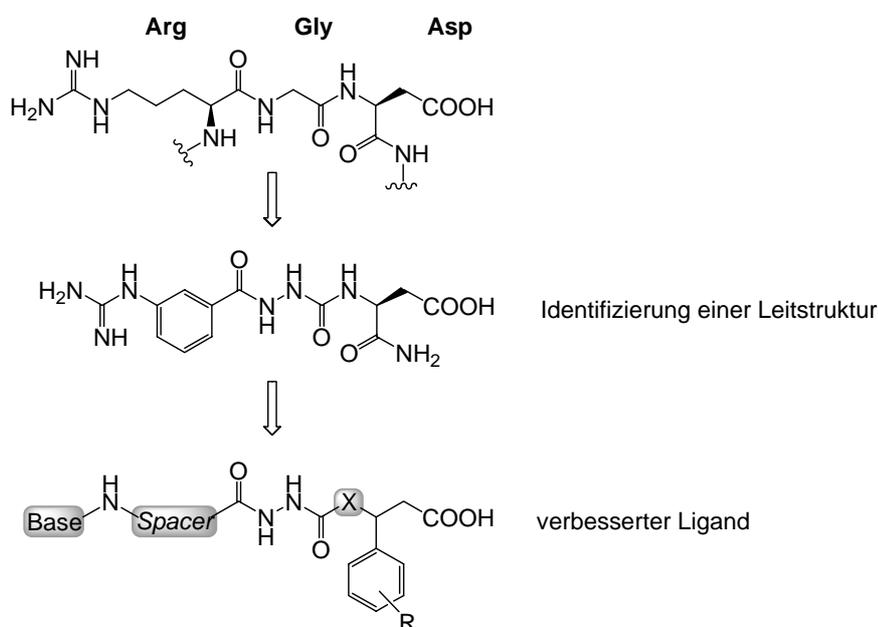
# 4 Nichtpeptidische Integrinliganden: Synthese und biologische Evaluierung

Neben den in Kapitel 3 beschriebenen peptidischen oberflächenadhäsiven Integrinliganden wurden im Rahmen dieser Arbeit auch nicht-peptidische  $\alpha v \beta 3$ -Integrinliganden zur Stimulierung der Zelladhäsion auf Oberflächen synthetisiert. Wirtschaftlich betrachtet, stellen RGD-Peptidmimetika eine gute Alternative gegenüber den zyklischen RGD-Liganden dar. Aufgrund ihrer auf ein Minimum reduzierten Struktur sind sie durch weniger Syntheseschritte, auch in Lösung, aus z. T. sehr einfachen Bausteinen zugänglich. Pharmakokinetische Faktoren oder die Erhöhung der Bioverfügbarkeit, wie sie für die Entwicklung der peptidähnlichen (Peptidomimetika) oder nicht-peptidischen Integrinliganden ausschlaggebend waren (Kapitel 2.2), spielen bei den oberflächenadhäsiven Verbindungen eine weitgehend untergeordnete Rolle. Die immobilisierten Mimetika sollen *in vivo*, ähnlich wie die peptidischen Liganden, im Anschluss an eine schnelle Einheilung des Implantates ohne negative Wechselwirkungen mit dem Organismus ausgeschieden werden.

Der Erhalt der Integrinaffinität und -selektivität der hergestellten nicht-peptidischen Liganden wurde im Labor von Dr. S. L. Goodman bei der Firma *Merck KGaA*, Darmstadt geprüft. Die Oberflächenbeschichtung sowie die biologische Charakterisierung der modifizierten Materialien wurden bei der Firma *Biomet Deutschland GmbH*, Darmstadt unter der Leitung von Dr. A. Enderle durchgeführt.

## 4.1 Allgemeine Strategie

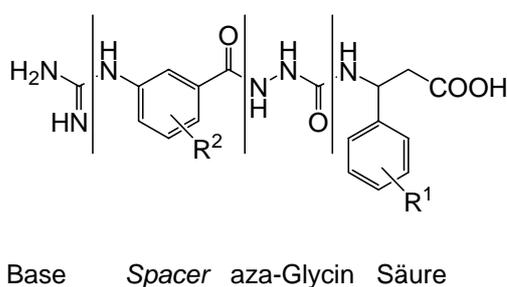
In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von nicht-peptidischen  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinliganden mit hoher Rezeptoraffinität und meist biselektivem Charakter ( $\alpha_v\beta_3 / \alpha_v\beta_5$  oder  $\alpha_v\beta_3 / \alpha_v\beta_6$ ) synthetisiert worden (Kapitel 2.2).<sup>[46, 48, 465, 466]</sup> Die von C. Gibson aus der RGD-Sequenz entwickelte Leitstruktur wurde von G. Sulyok im Hinblick auf  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinaffinität und Bioverfügbarkeit weiter optimiert (Abbildung 4.1.1). Eine Affinitätssteigerung konnte dabei durch die Substitution der C-terminalen Amidbindung durch verschieden substituierte Phenylreste erreicht werden.<sup>[465]</sup> Der Austausch des Glycins durch aza-Glycin ist nicht zwingend notwendig, die höhere enzymatische Stabilität der Azapeptide gegenüber den Peptiden ist aber von pharmakologischem Interesse.<sup>[467]</sup> Eine postulierte Affinitätserhöhung durch die strukturinduzierende Wirkung der aza-Gruppe, wie sie beim Einbau von aza-Aminosäuren in andere peptidische Strukturen beschrieben wurde,<sup>[468, 469]</sup> konnte von C. Gibson bei der RGD-Sequenz nicht generell bestätigt werden. Es wird als Diversifikation induzierendes Strukturtemplat beschrieben.<sup>[470]</sup> Der aromatische Abstandshalter *m*-Aminobenzoessäure, der bereits von C. Gibson verwendet wurde, erwies sich gegenüber flexiblen aliphatischen *Spacer* in sonst analogen Mimetika als vorteilhaft. Die Variation der Base sollte lediglich der Erhöhung der Bioverfügbarkeit dienen, die für oberflächenimmobilisierte Mimetika nicht von Belang ist.



**Abbildung 4.1.1** Ausgehend von der linearen RGD-Sequenz wurde durch kombinatorische Festphasensynthese eine neue Leitstruktur identifiziert.<sup>[466, 470]</sup> Anschließende Substitution des C-terminalen Amids durch einen substituierten Phenylrest erzielt eine Verbesserung der Ligandenaffinität.<sup>[465]</sup> ( $X = \text{CH}_2, \text{NH}$ )

## 4 Nichtpeptidische Integrinliganden

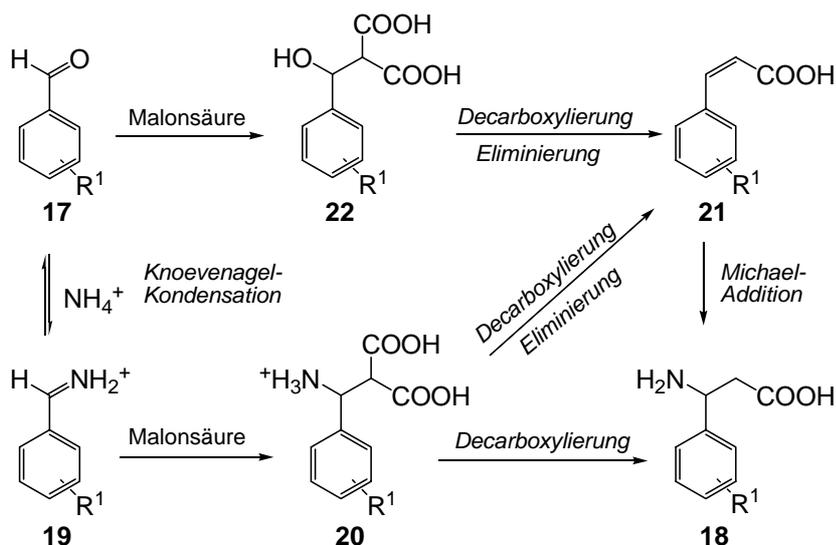
Hiervon ausgehend entwickelte C. Dahmen zwei Mimetika, in die eine zusätzliche funktionelle Gruppe eingeführt wurde, an der ein oberflächenadhäsives *Linker*-system angebunden werden kann, ohne dass die  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinaffinität oder -selektivität gegenüber  $\alpha_{IIb}\beta_3$  beeinträchtigt wird. Die minimierte Struktur bot hierfür nur wenige Möglichkeiten. Bereits die *N*-Alkylierung des aza-Glycins führt zum Verlust der Integrinaffinität.<sup>[470]</sup> Da terminale Base und Säure für die Rezeptorwechselwirkung ebenso essentiell sind wie deren Abstand voneinander (Kapitel 2.2), wurde die Anbindung von *Linkern* an den aromatischen Bausteinen realisiert. Die Substituenten R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> stellen SPPS-kompatible Funktionalitäten wie CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> und COOH dar (Abbildung 4.1.2).



**Abbildung 4.1.2** Retrosynthetische Zerlegung der aza-RGD-Mimetika in Säurebaustein, aza-Glycin, aromatischen Spacerbaustein und Basenbaustein. Die Substituenten R<sup>1</sup> oder R<sup>2</sup> sollen zur Anbindung von oberflächenadhäsiven Linkersystemen verwendet werden.

Die Synthese der zur Immobilisierung befähigten RGD-Mimetika erfolgte an der Festphase. Sie wurden aus je einem Säurebaustein, aza-Glycin-*precursor*, aromatischen *Spacer*baustein und Basenbaustein nach Fmoc-Strategie am TCP-Harz aufgebaut.

Der Säurebaustein repräsentiert die Asparaginsäure der RGD-Sequenz und wurde als Fmoc-geschützte  $\beta$ -Aminosäure zur Belegung des Harzes eingesetzt. Die Herstellung erfolgte in einer Eintopfreaktion aus dem entsprechend substituierten Benzaldehyd **17** mit 1 eq. Malonsäure bzw. Malonsäuremono-*tert*-butylester und 2 eq. Ammoniumacetat in 90-%igem Ethanol unter Rückfluss,<sup>[471]</sup> wobei die Aminosäure **18** racemisch anfiel. Anschließend wurde der *N*-Terminus Fmoc-geschützt.<sup>[472]</sup>

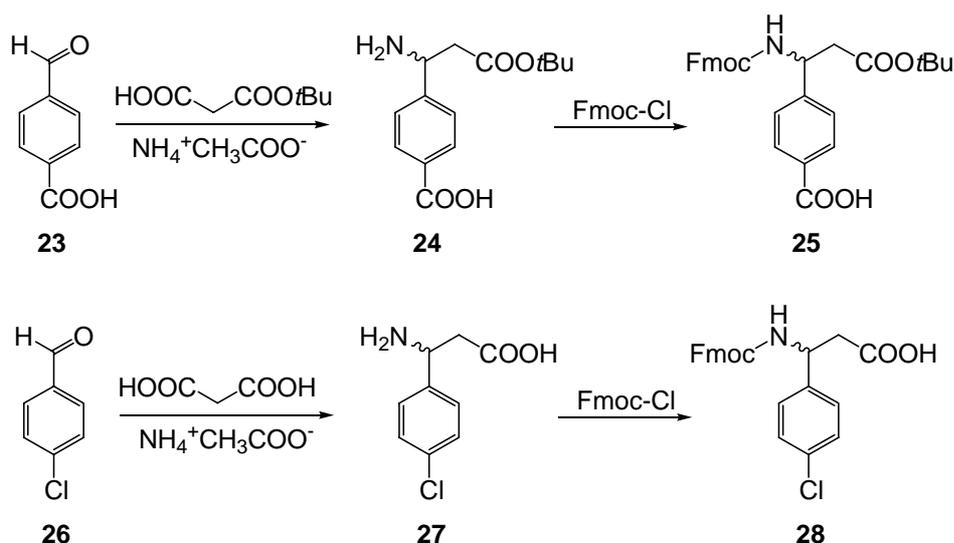


**Abbildung 4.1.3** Mögliche Reaktionswege zur Darstellung der racemischen  $\beta$ -Aminosäure **18** aus  $R^1$ -substituiertem Benzaldehyd **17**, Ammoniumacetat und Malonsäure.

Für die Darstellung der  $\beta$ -Aminosäure **18** werden verschiedene Reaktionswege diskutiert (Abbildung 4.1.3).<sup>[473, 474]</sup> In einer Gleichgewichtsreaktion bildet sich aus dem substituierten Benzaldehyd **17** und Ammoniumacetat das Iminiumion **19**, welches als Elektrophil in einer Knoevenagel-Kondensation mit Malonsäure reagiert. Die racemische  $\alpha$ -Carboxy- $\beta$ -aminosäure **20** wird durch Decarboxylierung direkt oder über die Zimtsäure **21** durch konzertierte Eliminierung / Decarboxylierung und anschließende Michael-Addition mit Ammoniak gebildet. Als Konkurrenzreaktion verläuft möglicherweise die Knoevenagel-Kondensation des Benzaldehyds **17** mit der Malonsäure. Die  $\beta$ -Aminosäure **18** kann auf diesem Weg nur über die Zimtsäure **21** dargestellt werden.

Zum einen sollte die aromatische Seitenkette der  $\beta$ -Aminosäure 3-Amino-3-phenylpropionsäure in *para*-Stellung substituiert werden, um in dieser Position *Linkermoleküle* durch Knüpfung einer Amidbindung zu verankern. Als erfolgreichste Substitutionsmöglichkeit stellte sich ein Carboxylrest heraus. Um Nebenreaktionen bei der Harzbelegung zu umgehen, wurde Malonsäuremono-*tert*-butylester für die Umsetzung mit kommerziell erhältlichem *p*-Carboxybenzaldehyd **23** verwendet. Die erhaltene 4-(2-Amino-1-*tert*-butoxycarbonyl)ethyl)-benzoesäure **24** wurde Fmoc-geschützt (**25**) und über den freien C-Terminus an die Festphase gebunden (Abbildung 4.1.4).

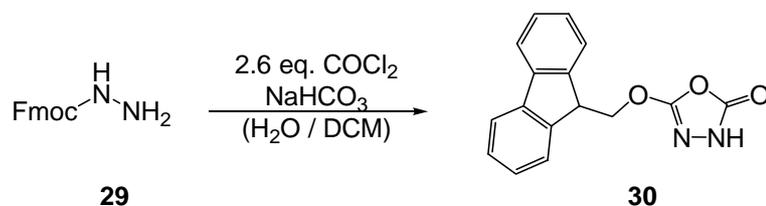
#### 4 Nichtpeptidische Integrinliganden



**Abbildung 4.1.4** Säurebausteine 4-(2-(N-Fmoc)-Amino-1-tert-butoxycarbonylethyl)-benzoesäure **25** und 3-(N-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)propionsäure **28**.<sup>[138, 465]</sup>

Für die Synthese der Mimetika, die am *Spacer* eine zusätzliche funktionelle Gruppe zur *Linkeranbindung* enthalten, wurde die 3-(N-Fmoc)-Amino-3-(4-chlorphenyl)propionsäure **28** (Abbildung 4.1.4) verwendet. In den Arbeiten von G. Sulyok stellte sie einen der aktivsten Säurebausteine in  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin-selektiven Mimetika dar.<sup>[138, 465]</sup>

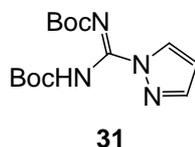
Aza-Glycin wurde anstelle des Glycins in die RGD-Mimetika integriert. Als *precursor* wurde 5-(9-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-1,3,4-oxadiazol-2-on **30** eingesetzt, das sich aus Fmoc-Hydrazin **29** und Phosgen in guten Ausbeuten herstellen ließ (Abbildung 4.1.5).<sup>[475]</sup> Die Suspension aus **29** in DCM und wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1:1) wurde bei 0 °C mit einem dreifachen Überschuss an Phosgen (1,9 M in Toluol) versetzt. Das zunächst entstandene Hydrazinsäurechlorid reagiert sofort in einer intramolekularen Zyklisierung zum 5-(9-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-1,3,4-oxadiazol-2-on **30**<sup>[468]</sup> und wurde ohne weitere Aktivierung an die festphasenimmobilisierte  $\beta$ -Aminosäuren mit freiem N-Terminus gekoppelt.



**Abbildung 4.1.5** Synthese des Fmoc-geschützten aza-Glycin-precursors 5-(9-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-1,3,4-oxadiazol-2-on **30** aus Fmoc-Hydrazin **29**.<sup>[475]</sup>

Als *Spacer*baustein wurde *m*-Aminobenzoesäure oder verschiedene ihrer Derivate verwendet. Ihre Synthese ist in Kapitel 4.2 näher beschrieben. Die Kupplung an den vorangehenden entschützten Baustein erfolgte mit HATU / Collidin. Eine Fmoc-Schützung der Aminofunktion ist unter diesen Kupplungsbedingungen nicht erforderlich, da mit HATU nicht an anilinische Amine gekuppelt werden kann.<sup>[400]</sup>

Danach wurde die Guanylierung mit *N,N'*-Bis-Bocguanylpyrazol **31** (Abbildung 4.1.6) durchgeführt,<sup>[476]</sup> welches die Seitenkette des Arginins in der RGD-Sequenz repräsentiert. Die Umsetzung am Harz erfolgte in 10fachem Überschuss von **31** in abs. Chloroform bei 50 °C für 24 Stunden. Nicht umgesetztes Guanylierungsreagenz konnte durch Fällung der Essigesterlösung mit Hexan in ausreichend hoher Reinheit zurückgewonnen werden, um es in weiteren Reaktionen einzusetzen.



**Abbildung 4.1.6** Guanylierungsreagenz *N,N'*-Bis-Bocguanylpyrazol **31**.<sup>[476]</sup>

Im Fall des *verlinkerten* *Spacer*bausteins wurde die Guanylfunktion in Lösung mit *N,N'*-Bis-Boc-Thioharnstoff **32** während der Bausteinsynthese eingeführt.

Nach der Abspaltung der Mimetika vom TCP-Harz (20 % HFIP / DCM) unter Erhalt der säurelabilen Schutzgruppen erfolgte die Entfernung der permanenten Schutzgruppen in 50 % TFA / DCM in Gegenwart von TIPS. Anschließend wurden die Verbindungen HPLC-gereinigt.

Für die Integration eines oberflächenadhäsiven *Linkers* in die potentiell Zelladhäsion vermittelnden Mimetika wurden aufgrund der Reaktionsverläufe zwei verschiedene Methoden verwendet. Der Einbau des *Linkers* wurde entweder durch Fragmentkupplung des RGD-Mimetikums mit dem *Linker* am Harz oder durch den Einbau eines *Linker*fragments in den entsprechenden Mimetikumbaustein erreicht.

## 4.2 Synthese substituierter *Spacer*bausteine

### 4.2.1 *Spacer*bausteine zum Anbinden an Oberflächen

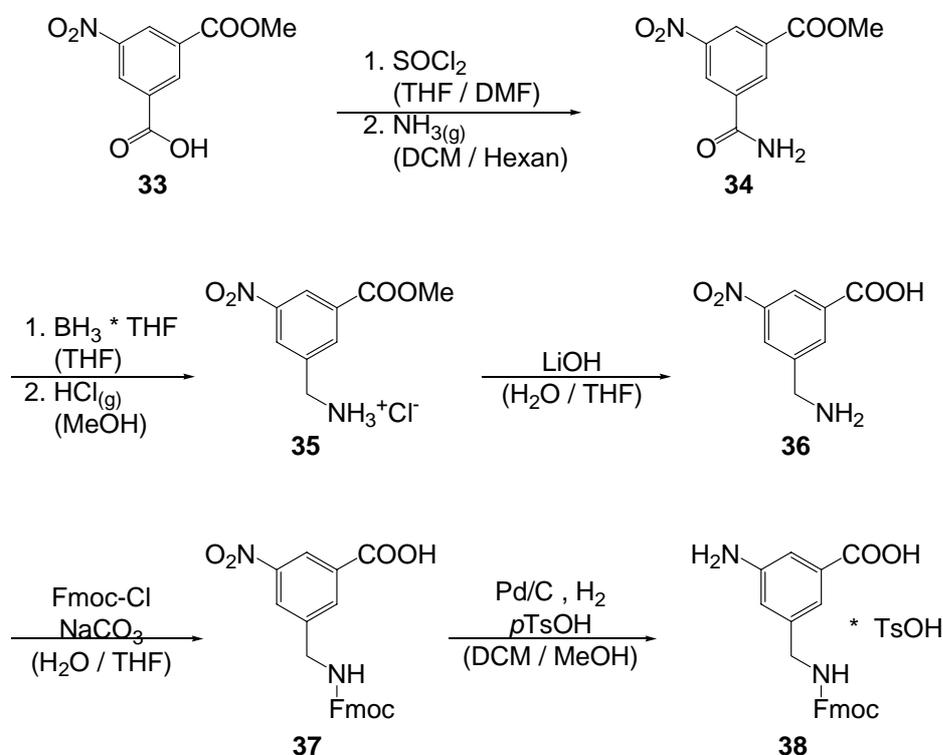
Der *Spacer*baustein *m*-Aminobenzoesäure wurde von C. Dahmen durch den Einbau von Amino- und Aminomethylsubstituenten zur *Linker*anbindung befähigt. <sup>[400]</sup> Die Substitution erfolgte vorrangig in der sterisch weniger anspruchsvollen *meta*-Stellung. Die neue Funktionalität sollte Fmoc-geschützt eingebaut werden, was eine

## 4 Nichtpeptidische Integrinliganden

vollständige Synthese des oberflächenadhäsiven Mimetikums an der Festphase ermöglichen sollte. Im Anschluss an die Einführung der Guanylfunktion sollte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgen. Am freien N-Terminus wären dann der schrittweise Aufbau des *Linkermoleküls* oder die Einführung des *Linkers* durch Fragmentkupplung möglich.

Wird als *Spacerbaustein* 3-Amino-5-(*N*-Fmoc)-Aminobenzoesäure benutzt, so ergibt sich das Problem, dass nach Guanylierung und anschließender Fmoc-Entschützung die anilinische Aminofunktion nur noch sehr schwer für Kupplungen zugänglich ist. Aus diesem Grund wurde von C. Dahmen die Substitution mit einer Aminomethyl-Gruppe weiterverfolgt.<sup>[400]</sup> In Anlehnung an Hamilton<sup>[477]</sup> und Neustadt<sup>[478]</sup> wurde von ihr 3-Amino-5-(*N*-Fmoc)-aminomethylbenzoesäure **38** hergestellt (Abbildung 4.2.1).

Aus kommerziell erhältlichem Monomethyl-5-nitro-isophthalat **33** wurde über das Säurechlorid durch Einleiten von gasförmigem Ammoniak das Amid **34** generiert. Dieses wurde durch Reduktion in 1 M  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  in THF nach saurer Aufarbeitung in 3-Carboxy-5-nitrobenzylaminhydrochlorid **35** überführt.<sup>[477]</sup> An die Verseifung (**36**) schlossen sich das Schützen des Amins (**37**) und die Reduktion der Nitroseitenkette zum Amin an **38**.<sup>[478]</sup>



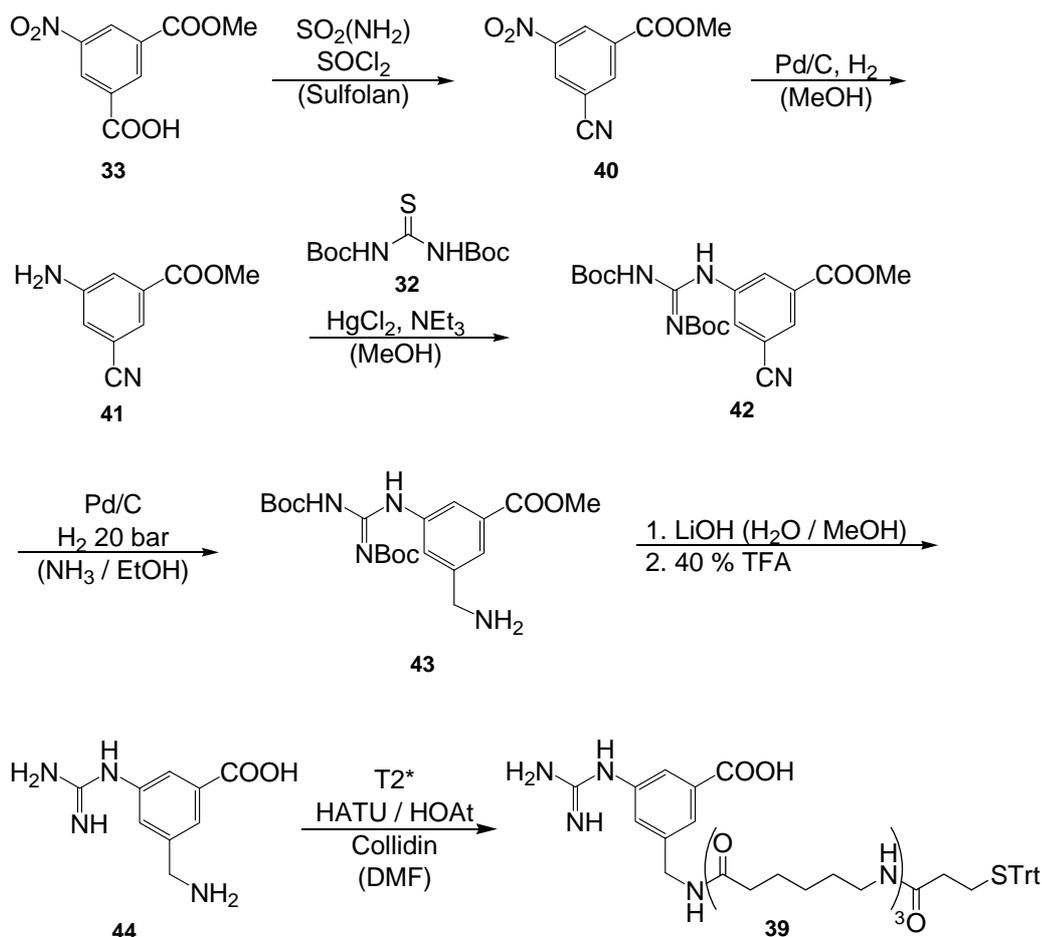
**Abbildung 4.2.1** Darstellung des Spacers 3-Amino-5-(*N*-Fmoc)-Aminomethylbenzoesäure **37** aus Monomethyl-5-nitro-isophthalat **33**.<sup>[477, 478]</sup>

Jedoch konnte nach Kupplung des *Spacer*bausteins und anschließender Guanylierung die Aminomethyl-Gruppe nur mit 2 % DBU / 2 % Piperidin / NMP Fmoc-entschützt werden. Im Anschluss an die Fragmentkupplung mit dem *Linker* 3-(*S*-Trt)-Mercaptopropionyl-Ahx3-OH mit HATU / HOAt / Collidin konnte die Masse von **MT3'**\* im ESI-MS nur in Spuren beobachtet werden. Selbst die Kupplung des ersten *Linker*bausteins  $\epsilon$ -(*N*-Fmoc)-Aminohexansäure mit TBTU / HOBt / DIPEA führte nur unzureichend zum erwarteten Produkt. Welche Nebenreaktionen ablaufen, konnte nicht im Detail geklärt werden.<sup>[400, 479]</sup>

Aus diesem Grund wurde ein *Spacer*baustein (analog **39**) mit integriertem Oberflächenspacer synthetisiert. Er wurde an entsprechend belegtes Harz (**28**, **30**) gebunden und anschließend mit **31** guanyliert. Die Fmoc-Entschützung konnte mit 20 % Piperidin in DMF durchgeführt werden. Die Kupplung mit 3-(*S*-Trt)-Mercaptopropionsäure und nachfolgende Abspaltung vom Harz sowie Entschützung der säurelabilen Schutzgruppen (50 % TFA / Wasser / TIPS) resultierte in **MT3** (Abbildung 4.3.1), welches mittels HPLC gereinigt wurde.<sup>[400]</sup> Jedoch gelang es C. Dahmen auf diesem Weg nur so viel Substanz zu synthetisieren, dass ein Strukturnachweis durch NMR und die Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Werts möglich war. Substanzmengen, die für einen Zelladhäsionstest nötig sind, waren auf diesem Weg nicht zugänglich. Der Schlüsselschritt in der Synthese ist die Bildung des Amids **34** mit 76 % Ausbeute und die anschließende Reduktion mit BF<sub>3</sub>•THF mit einer Ausbeute von max. 17 %. Letztere führt außerdem zu einer sehr komplexen Produktmischung die sich chromatographisch nur sehr ungenügend reinigen lässt.

Um von **MT3** genügend Substanz für einen Zelladhäsionstest zu bekommen wurde die Synthese des *Spacer*bausteins komplett umgestellt. Ausgegangen wurde wieder von Monomethyl-5-nitro-isophthalat **33** welches mit Sulfamid und Thionylchlorid in Gegenwart von Sulfolan in das Cyanid **40** überführt wird.<sup>[480]</sup> Nach Reduktion der Nitrofunktion mit Wasserstoff erfolgt die Guanylierung mit *N,N'*-Bis-Boc-Thioharnstoff **32** und Quecksilber(II)chlorid (**42**).<sup>[481]</sup> Anschließend werden die Cyanofunktion bei 30 bar und 50 °C in Gegenwart von Ammoniak zur Aminomethyl-Gruppe hydriert (**43**) und die Schutzgruppen abgespalten (**44**) (Abbildung 4.2.2).

## 4 Nichtpeptidische Integrinliganden



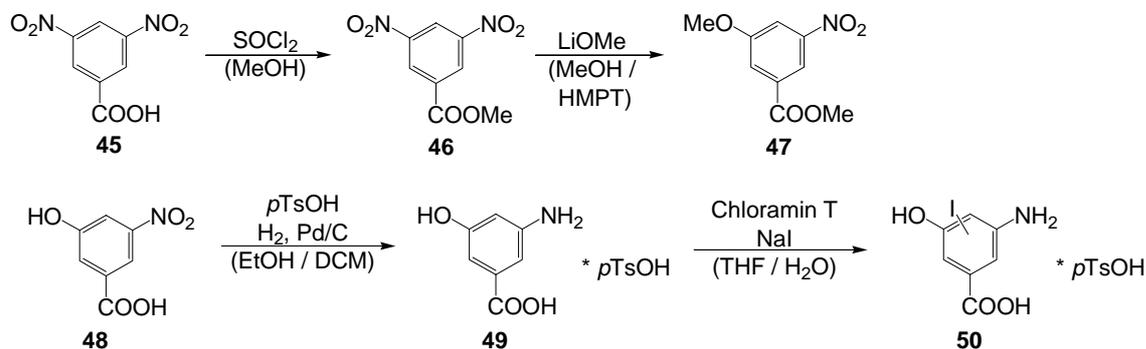
**Abbildung 4.2.2** Darstellung von 3-Aminomethyl-5-(*N,N'*-bis-Boc)-guanylbenzoesäure **44**<sup>480, 481]</sup> und des kombinierten Spacer-Linker-Bausteins **39**.

### 4.2.2 Spacerbausteine zur Radiomarkierung

Um die Belegungsdichte von Oberflächen mit Mimetika mit Hilfe von I-125-Radiomarkierung bestimmen zu können, muss einer der beiden Aromaten ( $\beta$ -Aminosäure oder *Spacerbaustein*) mit einer Hydroxylgruppe aktiviert werden. Der *Spacerbaustein* schien hierfür geeigneter zu sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass Amino-hydroxybezoensäuren mit Chloramin T<sup>®</sup> iodiert werden können. Dabei darf die Aminogruppe allerdings nicht in *para*-Stellung zur Hydroxygruppe stehen.<sup>[482]</sup> Somit konnte die kommerziell erhältliche 5-Aminosalicylsäure nicht eingesetzt werden.

Nach Herlt<sup>[483]</sup> wurde 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **49** synthetisiert. Ausgegangen wurde von 3,5-Dinitrobenzoesäure **45**, die nach Überführung in den Methyl-ester **46**, mit Lithiummethoxid substituiert wurde (**47**). Anschließend wurden die Ether- und Estergruppe mit Bromwasserstoffsäure gespalten (**48**) und die Nitro-

gruppe reduziert (**49**). Die Iodierung zur kalten Verbindung **50** wurde mit Chloramin T<sup>®</sup> und Natriumiodid in Wasser / THF durchgeführt (Abbildung 4.2.3).



**Abbildung 4.2.3** Darstellung von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure **49**<sup>[483]</sup> und ihre Iodierung zu **50**.

### 4.3 Oberflächenadhäsive Mimetika

Die in Kapitel 4.2 vorgestellten Bausteine mit zusätzlicher funktioneller Gruppe wurden in RGD-Mimetika integriert. Der Aufbau erfolgte festphasenunterstützt am TCP-Harz auf die in Kapitel 4.1 beschriebene Weise. Die Mimetika **MT1** und **MT2** wurden von C. Dahmen zur Verfügung gestellt.

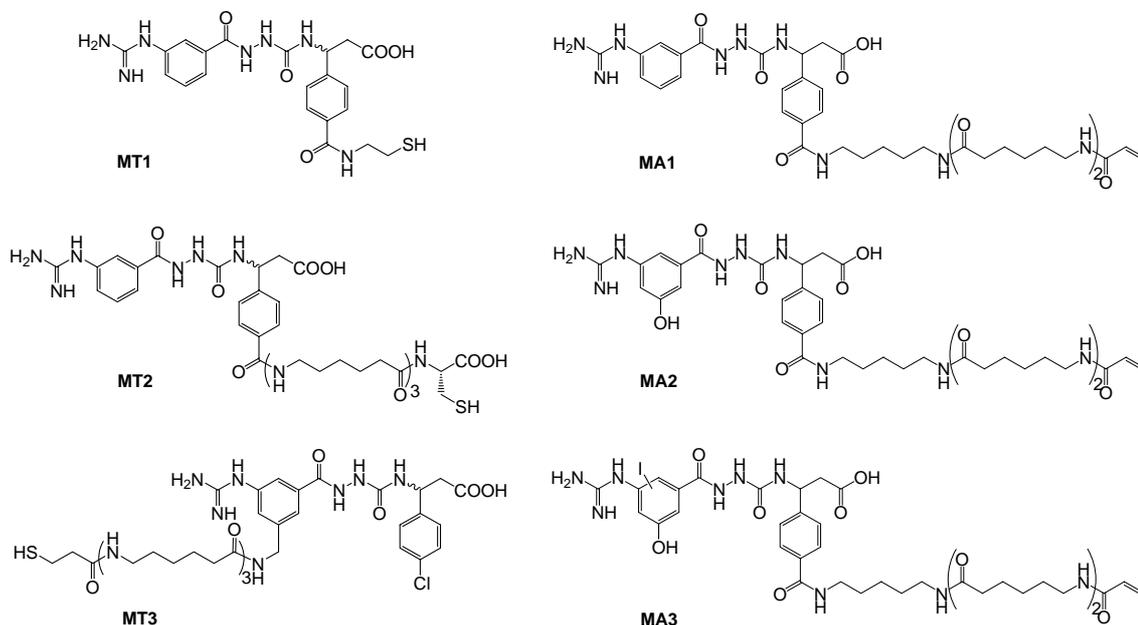
Nach vollständiger Entschützung erfolgte die Kupplung des *Spacerbausteins* **40** mit dem *Linkerfragment* **T2\*** mit HATU / HOAt / Collidin. Die resultierende Verbindung **39** wurde ohne Isolierung durch Aktivierung mit einem weiteren Äquivalent HATU an die harzgebundene Einheit aus aza-Glyzin und  $\beta$ -Aminosäure (**28**, **30**) gekuppelt. Durch nachfolgende Abspaltung vom Harz mit HFIP sowie Entschützung der Trityl-Schutzgruppe (40 % TFA / DCM / TIPS) resultierte **MT3**, welches mittels HPLC gereinigt wurde.

Das acrylatfunktionalisierte Mimetikum **MA1** wurde durch Fragmentkupplung des geschützten Mimetikums **M1\*** mit dem *Linker* **A3** erhalten. Die Entschützung erfolgte mit 50 % TFA / DCM / TIPS bei 4 °C.

Für das Mimetikum zur Radiomarkierung wurde an die harzgebundene Einheit aus aza-Glyzin und  $\beta$ -Aminosäure (**25**, **30**) der modifizierte *Spacerbaustein* **49** mit HATU gekuppelt. Auch hier waren weder für das Amin noch für die Hydroxylgruppe Schutzgruppen nötig. Anschließend wurde das geschützte Mimetikum mit HFIP vom Harz abgespalten und mit dem *Linker* **A3** in Lösung gekuppelt (HATU /

## 4 Nichtpeptidische Integrinliganden

HOAt / Collidin in DMF). Die Schutzgruppen wurden mit 40 % TFA / DCM / TIPS abgespalten und die resultierende Verbindung **MA2** HPLC-gereinigt.



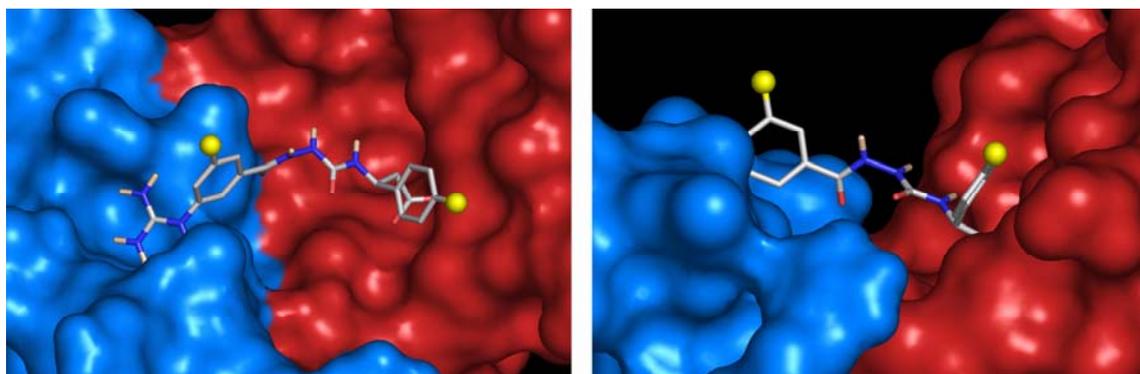
**Abbildung 4.3.1** Übersicht über die oberflächenadhäsiven RGD-Mimetika.

Das iodhaltige Mimetikum **MA3** sollte in analoger Weise zu **MA2** unter Verwendung des *Spacerbausteins* **50** synthetisiert werden. Jedoch misslang die Kupplung von **50**. Wurde **50** ohne Fmoc-Schutzgruppe mit HATU als Aktivierungsreagenz gekuppelt, so wurde sowohl das aza-Glycin als auch **50** in die Tetramethylguanidinspezies überführt. Mit TBTU als Aktivierungsreagenz fand überhaupt keine Umsetzung statt, andere Kupplungsreagenzien wie TOTU führten zu komplexen Produktgemischen, die nicht näher analysiert wurden. Wurde **50** Fmoc-geschützt eingesetzt, führte sowohl die Verwendung von HATU als auch von TOTU zu komplexen Produktgemischen, während mit TBTU kein Umsatz festzustellen war.

Ein anderer Weg zu **MA3** ist die Iodierung von **MA2**. Dies wurde mit Chloramin T<sup>®</sup> und IodoGen<sup>®</sup> versucht, da eines der beiden Reagenzien dann auch für die Radiomarkierung benutzt werden muss. Im ESI-MS konnten jeweils nur Moleküle mit kleineren Massen als **MA2** detektiert werden. Eine Radiomarkierung des Mimetikums mit Oberflächenanker ist am *Spacerbaustein* also auf die hier versuchte Weise nicht möglich.

## 4.4 Biologische Evaluierung

Die Dicarboxyverbindung **M1** erwies sich im nanomolaren Bereich als  $\alpha v\beta 3$ -integrinaffin, wohingegen die Verbindungen mit Anker biselektiv für  $\alpha v\beta 3$ - und  $\alpha v\beta 6$ -Integrine sind (Tabelle 4.3.1), wie es auch für andere Mimetika vom Diacylhydrazin-Typ beschrieben wurde.<sup>[466]</sup> Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den *Docking*-Resultaten von A. Meyer. Die beiden modifizierten Mimetika mit angedeuteten Ankern an R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> wurden mit AutoDock3<sup>[484, 485]</sup> in die Kristallstruktur des  $\alpha v\beta 3$ -Cilengtide-Komplexes<sup>[156]</sup> eingepasst, nachdem daraus das Peptid entfernt worden war. Es zeigte sich, dass die Bindungsmodi identisch mit denen der Mimetika ohne Anker (R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H) sind (Abbildung 4.3.2),<sup>[486]</sup> außerdem konnten keine störenden Interaktionen der Anker mit dem Integrin festgestellt werden.

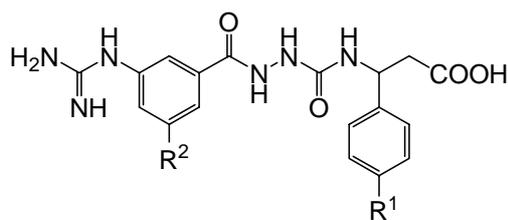


**Abbildung 4.3.2** Ergebnisse der Docking-Studien: Zwei Diacylhydrazine mit Ankern an den aromatischen Resten (als gelbe Kugeln angedeutet) docken an die Kopfgruppe der  $\alpha v\beta 3$ -Integrinstruktur an.<sup>[156]</sup>

Für die hohe  $\alpha v\beta 3$ -Selektivität von **M1** kommen sterische Effekte nicht infrage, da **51** und **52** sterisch ähnlich anspruchsvoll sind. In Übereinstimmung mit theoretischen Untersuchungen an  $\alpha v\beta 5$ -Homologiemodellen<sup>[486]</sup> können die Aminosäurereste Lys180 und Asp252 des SDL (*selectivity determining loop*) in der Nähe der MIDAS-Region des Integrins durch elektrostatische Wechselwirkungen zu einer Umorientierung des Liganden **M1** in der Bindungstasche führen. Da sich in der  $\beta 3$ -Untereinheit in diesem Bereich ungeladene Reste befinden, kann dies den starken Einfluss der Carboxygruppe in **M1** auf die Affinität zu  $\alpha v\beta 5$  erklären.

## 4 Nichtpeptidische Integrinliganden

**Tabelle 4.3.1** Übersicht über die Affinität und Selektivität der RGD-Mimetika gegenüber den Integrinen  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$  und  $\alpha\text{IIb}\beta3$ .



	Verbindung		IC <sub>50</sub> <sup>a)</sup> [nM]; Inhibition bei Ligandenkonzentration [nM]			
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	$\alpha\beta3$	$\alpha\beta5$	$\alpha\beta6$	$\alpha\text{IIb}\beta3$
<b>M1</b>	COOH	H	16	10 <sup>4</sup> (65 %)	10 <sup>3</sup> (54 %)	10 <sup>4</sup> (22 %)
<b>MT1</b>	CONH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -SH	H	5,7	200	0,24	3,20 × 10 <sup>3</sup>
<b>MT2</b>	COAhx <sub>3</sub> Cys	H	0,72	310	2,35	3,15 × 10 <sup>3</sup>
<b>MT3</b>	Cl	CH <sub>2</sub> NHAhx <sub>3</sub> CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -SH	0,84	245	0,089	4,15 × 10 <sup>3</sup>
<b>51</b> <sup>[465]</sup>	H	H	0,8	n. b. <sup>b)</sup>	n. b. <sup>b)</sup>	8500
<b>52</b> <sup>[465]</sup>	Cl	H	0,1	n. b. <sup>b)</sup>	n. b. <sup>b)</sup>	5500
	<i>cyclo</i> (-RGDFK[3-mercaptopropionyl]-) <sup>[487]</sup>		0,4	n. b. <sup>b)</sup>	n. b. <sup>b)</sup>	> 10 <sup>4</sup>

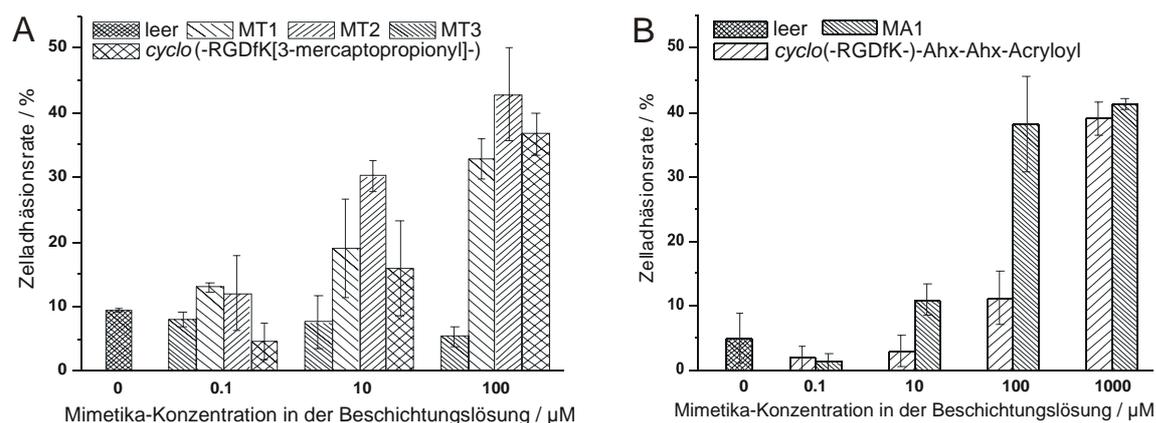
<sup>a)</sup> Mittelwert mehrerer unabhängiger IC<sub>50</sub> Messungen; die durchschnittliche Fehlerbreite dieser Messungen liegt im Bereich des Messwertes selbst.<sup>[48]</sup> <sup>b)</sup> n. b.: nicht bestimmt.

Die Zelladhäsionseigenschaften auf Titanoberflächen wurden für **MT1**, **MT2** und **MT3** getestet. Die Thiol-Anker ermöglichten die Immobilisierung. MC3T3-E1-Mausosteoblasten, die das  $\alpha\beta3$ -Integrin exprimieren,<sup>[403]</sup> wurden auf die modifizierten Titanplättchen (Ti6Al4V, Ø 1 cm) aufgetragen, und nach 1 h wurde die Anzahl an adhären Zellen durch die Hexaminidaseaktivität bestimmt.<sup>[391]</sup> In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Mausosteoblasten auf mit **MT1** oder **MT2** beschichteten Oberflächen adhäreren (Abbildung 4.3.3 A). Dabei konnte die Zelladhäsionsrate auf 42,9 % (100 µm **MT2**) gegen über 9,4 % bei unmodifiziertem Titan erhöht werden und ist damit genauso gut wie bei Beschichtungen mit dem aus der Literatur bekannten Peptid *cyclo*(-RGDFK[3-mercaptopropionyl]-).<sup>[311, 487]</sup> Die niedrigere Aktivität von **MT1** liegt wahrscheinlich daran, dass der Anker bedeutend kürzer und damit der Ligand für das Integrin nicht mehr so gut zugänglich ist. Auf mit **MT3** beschichteten Titanoberflächen konnte auch in wiederholten Tests keine Zelladhäsion stimuliert werden, obwohl die Verbindung im Bindungsassay an isoliertem  $\alpha\beta3$ -Integrin (Tabelle 4.3.1) vergleichbare Aktivitäten zeigt. Der Grund könnte sein, dass der immobilisierte Ligand für das Integrin trotz seiner enormen *Spacerlänge* ungünstig ausgerichtet ist. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass **MT3** nicht auf Titan immobilisiert wird, da in der Vergangenheit viele Peptid-Derivate von

## 4 Nichtpeptidische Integrinliganden

*cyclo*(-RGDfK[3-mercaptopropionyl]-) getestet wurden, die alle sehr gut auf Titan immobilisiert wurden (dies wurde sowohl mit ELISA als auch mit Zelladhäsionsassays überprüft; die Ergebnisse sind hier nicht gezeigt).<sup>[300]</sup> Im Falle der hier beschriebenen RGD-Mimetika konnte die Immobilisierung nicht über einen ELISA-Assay überprüft werden, da der verwendete Antikörper nur das cyclische RGD-Peptid erkennt und nicht das Mimetikum.

**MA1** wurde im Vergleich zum Acrylatpeptid *cyclo*(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Acryloyl<sup>[333]</sup> auf PMMA-Oberflächen getestet. Dabei konnte die Zelladhäsionsrate auf 41,3 % (1000  $\mu\text{M}$  **MA1**) gegen über 4,9 % bei unmodifiziertem PMMA erhöht werden und ist damit ebenso gut wie die Beschichtungen mit dem entsprechend funktionalisierten Zyklopeptid (Abbildung 4.3.3 B). Jedoch ist zu erkennen, dass auch bei 100  $\mu\text{M}$  **MA1** die Zelladhäsionsrate fast genauso hoch ist wie bei 1000  $\mu\text{M}$ . **MA1** ist also in der Lage auch bei einer geringeren Konzentration in der Beschichtungslösung die Zelladhäsion effektiv zu steigern.



**Abbildung 4.3.3** Adhäsion von MC3T3-E1-Mausosteoblasten auf unbeschichteten und beschichteten Titanoberflächen (A) und PMMA-Oberflächen (B). Die Mittelwerte stammen von Dreifachmessungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die in Kapitel 4.4 beschriebenen RGD-Mimetika mit oberflächenadhäsivem *Linker* zeigten, dass eine Integration von oberflächenadhäsiven Molekülen am aromatischen Säurebaustein als auch *Spacer*baustein zu keinem Verlust der  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinaffinität führt. Untersuchungen zur Stimulierung der Zellanbindungsrate mit Mausosteoblasten auf Titan zeigten, dass Zelladhäsion nur mit am Säurebaustein *verlinkerten* Mimetika hervorgerufen werden kann. Bei gleicher Steigerung der Zelladhäsion sind synthetischer und materieller Aufwand für oberflächenadhäsive Mimetika vom beschriebenen Typ gegenüber zyklischen Peptiden *cyclo*(-RGDfK-) geringer und damit als wirtschaftlicher einzuschätzen.

# 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung hochaffiner und selektiver Integrinliganden und deren Immobilisierung auf verschiedensten künstlichen Oberflächen. Die entwickelten peptidischen und nicht-peptidischen Liganden dienen der Erhöhung der Zelladhäsion auf den beschichteten Templaten. Dadurch werden diese Template unter anderem für Anwendungen in der Implantationsmedizin befähigt oder ermöglichen Untersuchungen von molekularbiologischen Phänomenen der Zelladhäsion.

Die hergestellten Moleküle bestehen aus einem **(zyklischen) Peptid**, welches eine Integrinerkennungssequenz enthält, zumeist RGD oder ein nichtpeptidisches **RGD-Mimetikum** und einen **Anker**, der auf die Anforderungen der jeweiligen zu beschichtenden Oberfläche zugeschnitten ist. Ein **Spacer** sorgt für den nötigen Abstand zwischen Oberfläche und Integrinliganden.

An einem Konjugat mit **Phosphonatanker** wurden durch Veränderung der *Spacerlänge* Auswirkungen auf die Osteoblastenadhäsion an Titan untersucht. Um die Synthese der Phosphonatpeptide zu vereinfachen, wurde darüber hinaus ein **Ankerbaustein mit Benzylschutzgruppen** entwickelt. Durch die Verwendung eines Benzoessäure-Grundgerüsts wurde gleichzeitig eine weitere Verzweigungseinheit geschaffen. Dieser neue Anker ist dem alten hinsichtlich der Zelladhäsionseigenschaften als gleichwertig anzusehen.

Durch die Beschichtung von Oberflächen mit Peptiden, welche photosensitive Einheiten enthalten, konnte eine **photoregulierte Zelladhäsion** erreicht werden. Zyklische RGD-Peptide mit **Benzophenonanker** konnten durch Bestrahlung mit UV-Licht auf PMMA-Oberflächen angebunden werden. Durch die Verwendung von **photolabilen Spacern** gelang die UV-induzierte Abspaltung der RGD-Peptide von Titanoberflächen. Die Zelladhäsionseigenschaften von PMMA-Oberflächen konnten durch die Verwendung von *Spacern* mit einer **Azabenzol**-Einheit durch **UV-Licht geschaltet** werden.

Mit der **Isothiocyanatanker**gruppe wurde ein neuer Ankertyp etabliert, der eine simple, kovalente Funktionalisierung von aminoterminierten Oberflächen erlaubt. Die Anbindung erfolgt durch die Reaktion der Peptide in einer wässrigen, basisch gepufferten Lösung mit der Oberfläche zu einem Thioharnstoffderivat. Die Zelladhäsionseigenschaften wurden mit linearen RGD-Peptiden auf entsprechend funktionalisierten und strukturierteren Glasoberflächen untersucht.

Einblicke in die **Mechanismen der integrinvermittelten Zelladhäsion** sollten Untersuchungen mit zyklischen RGD-Peptiden mit **Biotinanker** liefern. Auch die Verwendung von **multimeren, gemischten RGD/R $\beta$ AD-Peptiden** kann zum mechanistischen Verständnis beitragen, insbesondere könnte hierdurch ein weiterer Hinweis auf die Trimerisierung der  $\beta$ -Untereinheit in den fokalen Adhäsionspunkten gewonnen werden. Beide Untersuchungen sind im Moment aber noch nicht abgeschlossen.

Um die Adhäsion von Zellen mit anderen Integrinen als  $\alpha v \beta 3$  anzusprechen, wurden diverse weitere Liganden zur Immobilisierung auf Oberflächen mit *Linkern* versehen. Durch ein zyklisches RGD-Hexapeptid konnte die **Adhäsion von Thrombocyten** über das  $\alpha IIb \beta 3$ -Integrin verstärkt werden. Ein zyklisches LDT-Peptid spricht Lymphozyten über das  $\alpha 4 \beta 7$ -Integrin an. Peptide zur Stimulierung der **Keratinocytenadhäsion** auf Wundabdeckungsfolien konnte allerdings nicht gefunden werden.

Die **Oberflächenbelegung** mit zyklischen RGD-Peptiden auf **PMMA, Titan** und **Silizium** konnte durch eine Markierung analoger, tyrosinhaltiger Peptide mit radioaktivem  $^{125}\text{I}$  bestimmt werden.

Weiter wurden **Diacylhydrazine als RGD-Mimetika** entwickelt. Sie enthalten neben der für die Wechselwirkung mit dem  $\alpha v \beta 3$ -Integrin essentiellen, terminalen Säure- und Guanylfunktion zusätzlich eine funktionelle Gruppe, die das Anbringen eines Oberflächen*linkers* ermöglicht. Zwei verschiedene Positionen ( $\beta$ -Aminosäure

und *Spaceraminosäure*) zur Anbindung von oberflächenadhäsiven *Linkersystemen* wurden identifiziert, ohne dass die Integrinaffinität bzgl. des  $\alpha v \beta 3$ -Integrins abnimmt. Dieses Ergebnis wurde auch durch *Dockingstudien* bestätigt, durchgeführt von A. Meyer. Jedoch zeigte sich in Zelladhäsionsstudien, dass nur die  $\beta$ -Aminosäure zum Anknüpfen des *Linkers* geeignet ist. Auf PMMA-Oberflächen kann durch das Mimetikum die Zelladhäsion weit effektiver stimuliert werden, als mit dem entsprechenden zyklischen RGD-Peptid.

Peptidische und nicht-peptidische Integrinliganden wurden durch unterschiedliche Modifizierungen auf verschiedenen Materialien immobilisiert. Wenn dies auch zu einer Steigerung der Anzahl adhärrierender Zellen führt, so sind die beschichteten Oberflächen nicht zwangsläufig Biomaterialien als solche. Um die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse für Anwendungen nutzbar zu machen, die im Bereich der Medizin oder der Molekularbiologie angesiedelt sein können, sind noch viele weitere Untersuchungen nötig.



# 6 Experimenteller Teil

## 6.1 Material und Methoden

Alle technischen **Lösungsmittel** wurden vor Gebrauch destilliert und bei Bedarf nach gängigen Methoden absolutiert. *N*-Methylpyrrolidon (NMP) wurde von der Firma *BASF-AG* gestiftet und ohne weitere Destillation eingesetzt. Falls erforderlich, wurden wasserfreie Lösungsmittel von den Firmen *Alrich* und *Fluka* bezogen. Die verwendeten **Reagenzien** wurden von den Firmen *Aldrich*, *Sigma*, *Acros*, *ABCR*, *Lancaster*, *Fluka* und *Merck* bezogen und entsprachen mindestens der Qualität „zur Synthese“. Geschützte Aminosäuren, soweit nicht selbstständig synthetisiert, wurden von den Firmen *NovaBiochem*, *IRIS Biotech*, *Alexis* und *Neosystems* bezogen. TCP-Harz wurde von der Firma *PepChem* (Tübingen) bezogen. TBTU, HOAt und HOBt stammten von *IRIS Biotech*, HATU von *PerSeptive Biosystems*. Palladium / Aktivkohle war eine Stiftung der Firma *Degussa*.

Die **Festphasensynthesen** wurden in Schüttelgefäßen aus Glas (> 1,2 g Harz) oder in Kunststoffspritzen (2, 5, 10 oder 20 mL) mit PE-Fritten der Firma *Vetter-Laborbedarf* (Tübingen) durchgeführt. Die Durchmischung der Harze erfolgte durch Rotieren der Spritzen oder Schütteln von Glasreaktoren in Geräten der Firma *IKA*, KS 125 oder KS 130 basic (mit Temperaturkontrolleinheit).

**Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrollen** wurden auf mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichteten Aluminiumplatten der Firma *Merck* durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit unterschiedlichen Laufmittelgemischen. Die Detektion der einzelnen Substanzflecke wurde anhand der UV-Absorption bei 254 nm und / oder ethanolische Ninhydrin-Lösung (0,3 g Ninhydrin, 3 g Essigsäure in 100 mL Ethanol) und / oder ein wässriges Cer-

(IV)-sulfat/Molybdänsäurebad (6,25 g Phosphormolybdänsäurehydrat, 2,5 g Cer-(IV)-sulfat, 15 mL konz. Schwefelsäure in 235 mL Wasser) und anschließender Wärmebehandlung ermöglicht.

**Flashsäulenchromatographische Trennungen** wurden mit 50 - 100 fachem Überschuss an Kieselgel 60 (Korngröße 0,040 - 0,063 mm, 230 - 400 mesh ASTM) der Firma *Merck* durchgeführt. Sowohl feste als auch flüssige Rohsubstanzen wurden auf Kieselgel 60 der Firma *Merck* aufgezogen. Die Trennungen erfolgten bei 0,8 bis 1,2 bar Überdruck.

Analytische, semi- und präparative **HPLC** wurde an folgenden Geräten (Beckman, Amersham Pharmacia Biotech) und Säulen (*YMC Europe GmbH*) durchgeführt:

(A) Gerät Beckman System Gold, Programmable Solvent Module 125, Programmable Detector Module 166; Säulenmaterial: (1) YMC-ODS-A 120 5-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  20 mm) semipräparativ.

(B) Gerät Pharmacia Basic 10 F, Pumpensystem P-900, Detektionssystem UV-900, Autosampler A 900, Steuerungssoftware: Unicorn, Version 3.00; Säulenmaterial: YMC-ODS-A 120 5-C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm) analytisch.

(C) Gerät Pharmacia Basic 100 F, Pumpensystem P-900, Detektionssystem UV-900, Steuerungssoftware: Unicorn, Version 3.00; Säulenmaterial: (1) YMC-ODS-A 120 10-C18 (10  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  20 mm) semipräparativ; (2) YMC-ODS 120 11-C18 (11  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  30 mm) präparativ.

Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0,1 % TFA) und ACN (+ 0,1 % TFA) im linearen Gradientenbetrieb. Im Falle der Anlage (C) wurden gerätebedingt Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0,1 % TFA) und ACN / Wasser (90 % ACN / 10 % bidest. Wasser + 0,1 % TFA) statt reinem ACN (+ 0,1 % TFA) verwendet. Die Flussraten betragen 1 mL/min (analytisch), 8 mL/min (semipräparativ) und 25 mL/min (präparativ). Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 254 nm.

**Massenspektren** wurden durch Laser-Desorption (MALDI), ESI oder EI erhalten. **HPLC-ESI-MS** Untersuchungen wurden an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ LCQ ggf. in Kombination mit dem HPLC-System *Hewlett Packard* HP 1100 (Säulenmaterial: YMC ODS-A 120-3C18 (3  $\mu\text{m}$ , 125 mm  $\times$  2 mm), Flussrate 0,3 mL/min) durchgeführt. Als Eluent dienten Laufmittelgemische aus Wasser (bidest. + 0,1 % Ameisensäure) und ACN (+ 0,1 % Ameisensäure) im linearen Gradientenbetrieb (15 Minuten). **EI-MS** Messungen erfolgten durch H. Krause an einem Gerät der Firma *Finnigan* vom Typ MAT 8200 (Direkteinlass, 70 eV), ebenso wie die **MALDI-MS** Untersuchungen am *Bruker* BILFEX III im *reflector mode* ( $\alpha$ -Cyanohydroxymizsäure).

Die Massenspektren werden in der Form „X [m+Y]<sup>+</sup>“ angegeben. Dies entspricht der Detektion der Molekülmasse X, die dem Anlagerungsprodukt des untersuchten Moleküls mit dem Kation Y<sup>+</sup> entspricht.

## 6 Experimenteller Teil

---

Die **NMR-Spektren** wurden mit den Geräten AC250 oder DMX500 der Firma *Bruker* bei 300 K in deuterierten Lösungsmitteln ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ , oder  $\text{DMSO-d}_6$ ) aufgenommen. Interner Standard für chemische Verschiebungen von  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  waren die Lösungsmittelsignale von  $\text{DMSO-d}_5$  für  $^1\text{H}$  ( $\delta = 2,49$  ppm),  $\text{CHCl}_3$  für  $^1\text{H}$  ( $\delta = 7,26$  ppm) oder TMS.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektren wurden mit  $^1\text{H}$  Breitbandentkopplung aufgenommen. Sie wurden auf 85 %ige Phosphorsäure als externen Standard ( $\delta = 0$  ppm) kalibriert.

## 6.2 Liste der synthetisierten Verbindungen

### Aminosäuren, Reagenzien und Anker(bausteine)

7-Aza-1-hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol, HOAt	53	
2-(7-Azabenzotriazolyl-1-oxy)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphat, HATU	54	
3,5-Bis(brommethyl)benzoesäuremethylester	2	
Tribenzylphosphit	3	
5-Methoxycarbonyl- <i>m</i> -xylene-bisphosphonsäure-tetrabenzylester		4
5-Carboxy- <i>m</i> -xylene-bisphosphonsäure-tetrabenzylester		5
20-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure- <i>tert.</i> -butylester		9
20-( <i>O-p</i> -Tosyl)-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure- <i>tert.</i> -butylester		55
20-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure- <i>tert.</i> -butylester		56
20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure- <i>tert.</i> -butylester		10
20-( <i>N</i> -Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure, Fmoc-Hegas-OH		11
[2 <i>R</i> ]-2-Amino-3-(4-hydroxy-3-iod-phenyl)-propionsäure, H-D-Tyr{I}-OH		16
[2 <i>R</i> ]-2-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-Hydroxy-3-iod-phenyl)-propionsäure, Fmoc-D-Tyr{I}-OH	17	
3-Amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure- <i>tert.</i> -butylester		24
3-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure- <i>tert.</i> -butylester	25	
3-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure	27	
3-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure		28
9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethylcarbazat	29	
5-(9 <i>H</i> -Fluoren-9-ylmethoxy)-3 <i>H</i> -[1,3,4]oxadiazol-2-on		30
<i>N,N'</i> -Bis-Boc-1 <i>H</i> -pyrazol-1-carbonsäureamidin		31
<i>N,N'</i> -Bis-Boc-thioharnstoff	32	
3-Cyano-5-nitro-benzoesäure-methylester	40	
5-Amino-3-cyano-benzoesäure-methylester	41	
3-Cyano-5-( <i>N,N'</i> -bis-Boc)-guanidino-benzoesäure-methylester		42
3-Aminomethyl-5-( <i>N,N'</i> -bis-Boc)-guanidino-benzoesäure-methylester		43
3-Aminomethyl-5-guanidino-benzoesäure	44	
5-Guanidino-3-(3-( <i>S</i> -Trt)-Mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx)-aminomethylbenzoesäure	39	
3-5-Dinitrobenzoesäuremethylester	46	
3-Methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester	47	
3-Hydroxy-5-nitrobenzoesäure	48	
3-Amino-5-hydroxybenzoesäure	49	

2-Iod-3-hydroxy-5-aminobenzoessäure 50

**Zyklopeptide**

<i>cyclo</i> [-R(Pbf)GD(O <i>t</i> Bu)fK-]	<b>Z1*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf) $\beta$ AD(O <i>t</i> Bu)fK-]	<b>Z2*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf)GD(O <i>t</i> Bu)fE-]	<b>Z3*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf) $\beta$ AD(O <i>t</i> Bu)fE-]	<b>Z4*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf)D(O <i>t</i> Bu)GfK-]	<b>Z10*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf)GD(O <i>t</i> Bu) $\gamma$ {I}K-]	<b>Z5*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf)GD(O <i>t</i> Bu) $\gamma$ ( <i>t</i> Bu)K-]	<b>Z6*</b>
<i>cyclo</i> [-R(Pbf)GD(O <i>t</i> Bu)fKG-]	<b>Z7*</b>
<i>cyclo</i> [-LD(O <i>t</i> Bu)T( <i>t</i> Bu)DpF-]	<b>Z8*</b>
<i>cyclo</i> [-LD <i>t</i> TDpF-]	<b>Z8</b>
<i>cyclo</i> [-LD(O <i>t</i> Bu)T( <i>t</i> Bu)KpF-]	<b>Z9*</b>
<i>cyclo</i> [-LD <i>t</i> TKpF-]	<b>Z9</b>
<i>cyclo</i> [-LD <i>t</i> TK(Ac)pF-]	<b>C<sup>L</sup>1</b>

**Linker**

Acryloyl-Ahx-OH	<b>A1</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-OH	<b>A2</b>
PDIT-Ahx-Ahx-OH	<b>I1</b>
Biotinyl-Ahx-Ahx-OH	<b>Bi1</b>
(3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-OH	<b>P2*</b>
(3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-OH	<b>P3*</b>
(3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-Ahx-OH	<b>P4*</b>
((3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl) <sub>2</sub> -K) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-Ahx-OH	<b>P5*</b>
HO-Ahx-K-(K-(PPA*) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<b>P6*</b>
HO-Ahx-Ahx-K-(K-(PPA*) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<b>P7*</b>
HO-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-(PPA*) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<b>P1*</b>
HO-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-(PPA*) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<b>P8*</b>

**(Zyklo)peptide mit Linker**

(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>PC2</b>
(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>PC3</b>
(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>PC4</b>
((3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl) <sub>2</sub> -K) <sub>2</sub> -K-Ahx-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>PC5</b>

## 6 Experimenteller Teil

---

$((3,5\text{-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl})_2\text{-K})_2\text{-K-Ahx-Ahx-cyclo(-R}\beta\text{ADfK-})$	<b>PC6</b>
$\text{cyclo(-RGDfK-)-Ahx-K-(K-PPA}_2)_2$	<b>PC7</b>
$\text{cyclo(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-K-(K-PPA}_2)_2$	<b>PC8</b>
$\text{cyclo(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA}_2)_2$	<b>PC9</b>
$\text{cyclo(-RDGfK-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA}_2)_2$	<b>PC10</b>
Biotinyl- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>BiC1</b>
Biotinyl-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>BiC2</b>
Biotinyl- <i>cyclo</i> (-R $\beta$ ADfK-)	<b>BiC3</b>
Biotinyl-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-R $\beta$ ADfK-)	<b>BiC4</b>
PDIT-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDfK-)	<b>IC1</b>
PDIT-Ahx-Ahx-GRGDS-OH	<b>IL1</b>
PDIT-Ahx-Ahx-GRGDSP-OH	<b>IL2</b>
PDIT-Ahx-Ahx-GR $\beta$ ADSP-OH	<b>IL3</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-YIGSR-OH	<b>AL1</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-PDSGR-OH	<b>AL2</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-SIKVAV-OH	<b>AL3</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-LGTIPG-OH	<b>AL4</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-IKVAV-OH	<b>AL5</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-SEIKLLIS-OH	<b>AL6</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-EIKLLIS-OH	<b>AL7</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-IGSR-OH	<b>AL8</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-KQNCLS-OH	<b>AL9</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-EPDIM-OH	<b>AL10</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-NKDIL-OH	<b>AL11</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-NKDIL-OH	<b>AL12</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-EPDIL-OH	<b>AL13</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx-YIGSR-NH <sub>2</sub>	<b>AL14</b>
$\text{cyclo(-LDTKpF-)-Ahx-Ahx-Ahx-Acryloyl}$	<b>AC<sup>L</sup>1</b>
$\text{cyclo(-LDTDpF-)-Diamin-Ahx-Ahx-Acryloyl}$	<b>AC<sup>L</sup>2</b>
$\text{cyclo(-RGDfKG-)-Ahx-Ahx-Ahx-PDIT}$	<b>IC<sup>G</sup>1</b>
$\text{cyclo(-RGDfKG-)-Ahx-Ahx-Acryloyl}$	<b>IA<sup>G</sup>1</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDy {I} K-)	<b>AC<sup>y</sup>1</b>
Acryloyl-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDyK-)	<b>AC<sup>y</sup>1</b>
Pent-4-enoyl-Ahx-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDy {I} K-)	<b>AC<sup>y</sup>2</b>
Pent-4-enoyl-Ahx-Ahx-Ahx- <i>cyclo</i> (-RGDyK-)	<b>AC<sup>y</sup>2</b>
$\text{cyclo(-RGDy \{I\} K-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA}_2)_2$	<b>PC<sup>y</sup>1</b>
$\text{cyclo(-RGDyK-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA}_2)_2$	<b>PC<sup>y</sup>1</b>

### Mimetika (mit *Linker*)

- 4-(2- {N-[N'-(3-(N,N'-Bis-Boc)-guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-  
*tert*-butoxycarbonylethyl)-benzoesäure **M1\***
- 4-(2- {N-[N'-(3-(N,N'-Bis-Boc)-guanidino-5-hydroxy-benzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-  
amino-1-*tert*-butoxycarbonylethyl)-benzoesäure **M2\***
- 4-(2- {N-[N'-(3-(N,N'-Bis-Boc)-guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-  
*tert*-butoxycarbonylethyl)-benzoylcysteamin **MT1\***
- 4-(2- {N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-carboxyethyl)-  
benzoylcysteamin **MT1**
- 3- {N-[N'-(3-Guanidino-5-(4-(*S*-Trt)-mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx-aminomethyl) ben-  
zoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorophenyl)-propionsäure **MT3\***
- 3- {N-[N'-(3-Guanidino-5-(4-mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx-aminomethyl)benzoyl)-  
hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorophenyl)-propionsäure **MT3**
- 4-(2- {N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-carboxyethyl)-benzoyl-  
diaminopentyl-Ahx-Ahx-Acryloyl **MA1**

### 6.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

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

1 - 10 g TCP-Harz (Beladung ca. 0,9 - 1,0 mmol Chlor / g Harz) werden in ein tariertes Schüttelgefäß eingewogen. Pro Gramm Harz werden 1,1 eq. *N*-Fmoc-Aminosäure in 15 - 20 mL trockenem DCM gelöst. Als Base werden 2,5 eq. DIPEA, bezogen auf eingesetzte *N*-Fmoc-Aminosäure, verwendet. Diese Lösung gibt man direkt zum trockenen TCP-Harz. Nach weiteren 60 min Schütteln werden pro Gramm Harz 0,5 - 1,0 mL Methanol zugegeben, um unumgesetzte Tritylchlorid-Gruppen zu *cappen*. Das Harz wird nach weiteren 15 - 20 min abgefrittet, einmal mit DCM, dreimal mit NMP und dreimal mit DCM gewaschen. Danach wäscht man zweimal mit reinem Methanol, wobei sich das Harz zusammenballt. Nach Trocknen des Harzes im Exsikkator über Blaugel lässt sich die Harzbeladung ungefähr gravimetrisch nach folgender Formel bestimmen:

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

$n$	Belegungsdichte [mmol AS / g belegtes Harz]
$m_1$	Einwaage des unbeladenen Harzes [g]
$m_2$	Einwaage des beladenen Harzes [g]
$M_{AS}$	Molmasse der Fmoc-AS [g / mol]
$M_{HCl}$	36,46 g / mol

#### AAV 2 (Festphasensynthese des linearen Peptids)

2,0 eq. *N*-Fmoc-Aminosäure (bezogen auf freien *N*-Terminus an der Festphase im Schüttelgefäß), 2,0 eq. HOBt, 2,0 eq. TBTU und 5,6 eq. DIPEA werden in 10 - 15 mL NMP / g Harz gelöst und in das Schüttelgefäß gegeben.

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

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

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

### AAV 3 (Kaiser-Test)

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

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

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

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

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

#### Schema 2: *Abspalten des Peptids vom Harz*

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

**a:** Die Abspaltung des Peptids erfolgt nach Schema 2.

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

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

### AAV 5 (Cyclisierung)

Das lineare Peptid-Acetat wird in hoher Verdünnung ( $c = 5 \cdot 10^{-3}$  M) in trockenem DMF gelöst. Nach Zugabe von 3 eq. DPPA und 5 eq.  $\text{NaHCO}_3$  als feste Base wird 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des  $\text{NaHCO}_3$  wird die Lösung bei 40 °C im Hochvakuum stark eingeeengt, das Cyclopeptid in Wasser gefällt und so lange mit Wasser gewaschen, bis die Diphenylphosphorsäure komplett entfernt ist (keine Schaumbildung mehr an der Frittenunterseite). Das Peptid wird im Hochvakuum getrocknet.

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

1 mmol Z-geschütztes Peptid wird in 30 mL *N,N*-Dimethylacetamid gelöst. Nach Zugabe von 0,5 - 1 g Katalysator (5 % Pd / C) wird die Suspension 4 h unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bei 40 °C im Hochvakuum wird der Rückstand in 50 mL Acetonitril / Wasser 9 / 1 aufgenommen und der Katalysator zunächst durch eine Fritte der Porosität 4, anschließend durch ein Mikrofilter der Porengröße 0,45 µm abfiltriert. Nach Einengen des Filtrates wird das Peptid lyophilisiert.

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

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

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

### **AAV 8 (Kupplung von Aminobenzoesäuren)**

Das harzgebundene freie Amin wird mit einer Lösung aus 2 eq. Aminobenzoesäure, 2 eq. HATU und 2,8 eq. DIPEA in NMP versetzt. Nach 2 h wird das Harz fünfmal mit NMP gewaschen.

### **AAV 9 (Fmoc-Entschützung an fester Phase)**

Zur Fmoc-Entschützung wird das mit NMP gewaschene Harz zweimal 10 min mit 1 mL / 0,1 g (Harz) einer Lösung aus NMP und Piperidin (8:2, v/v) geschüttelt und anschließend fünfmal mit NMP gewaschen.

### **AAV 10 (Fragmentkupplung in Lösung)**

0,2 mmol Carbonsäurefragment, 0,97 eq. HATU, 1,1 eq. HOAt und 10 eq. 2,4,6-Collidin werden in 1,0 mL DMF gelöst. Nach 2 h werden 0,2 mmol des Aminfragments zugegeben. Man lässt 12 Stunden rühren, zieht das Lösungsmittel im Hochvakuum ab und fällt das Peptid in Wasser. Der Niederschlag wird im Exsikkator getrocknet.

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

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

## 6 Experimenteller Teil

### Schema 3: Abspalten des Peptids vom Harz und Entfernung der Schutzgruppen

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

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

### AAV 12 (Einbau von Fmoc-azaGly an der Festphase)

Das harzgebundene freie Amin wird mit einer Lösung von 4 eq. 5-(9H-Fluoren-9-ylmethoxy)-1,3,4-oxadiazol-2(-3H)-on **30** in trockenem DMF (ca. 0,1 M Lösung) versetzt. Nach ca. 90 Minuten wird die Reaktion durch Waschen des Harzes mit NMP (5 x 3 min) abgebrochen.

### AAV 13 (Guanylierung von harzgebundenen Anilinen)

Das harzgebundene freie Anilin wird mit trockenem Chloroform gewaschen und in ein Schraubdeckelglas passender Größe überführt. Dazu wird eine Lösung von 10 eq. *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpirazol **31** in trockenem Chloroform (ca. 0,45 M Lösung) gegeben. Für 24 Stunden wird das Gemisch bei 50 °C im Schüttler geschüttelt. Anschließend wird das Harz über einer Fritte in eine Spritze abfiltriert und mehrmals mit DCM gewaschen.

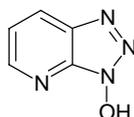
Nicht umgesetztes *N,N'*-Bis-Boc-1-guanylpirazol **31** kann aufgereinigt und für weitere Guanylierungen verwendet werden, indem die Lösungsmittel bis zur Trockne eingengt werden, der Rückstand in wenig Essigsäureethylester aufgenommen und mit dem zehnfachen Volumen an Hexan versetzt wird. Bei ca. -20 °C im Tiefkühler kristallisiert **31** langsam aus oder bleibt als amorpher Niederschlag am Kolbenboden liegen.

### AAV 14 (Markierung mit <sup>125</sup>I)

300 µg Peptid werden mit 150 µg IodoGen in 150 µL PBS-Puffer gelöst. Anschließend werden 1,32 mCi <sup>125</sup>I als Na<sup>125</sup>I in 10 µL 0,05 M NaOH zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten wird die iodierter Verbindung mittels HPLC abgetrennt.

## 6.4 Arbeitsvorschriften Peptide

### 7-Aza-1-hydroxy-1*H*-benzotriazol, HOAt (53)



C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O  
Exact Mass: 136,04  
Mol. Wt.: 136,11

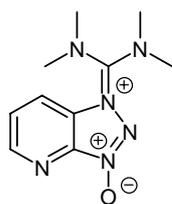
13,6 g (88,2 mmol) 3-Methoxy-2-nitropyridin werden mit 26,4 mL (6,2 eq.) Hydrazinhydrat in 10,4 mL Wasser und 15,3 mL DMF für 1,5 h auf 80 °C erwärmt. Nach 1 h werden noch einmal 2 mL Hydrazinhydrat zugegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur 20 h nachgerührt. Nachdem so viel Lösungsmittel wie möglich abgezogen wurde, wird die tief orange Lösung im Eisbad mit conc. HCl auf pH 2,5 angesäuert. Das Produkt wird abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Es werden 5,5 g (45,8 %) weiße Nadeln erhalten.

**HPLC** (10 – 90%): 6,21 min.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 13,80 (1H, s, OH); 8,78 (1H, dd, J = 4,3 Hz, J = 1,5 Hz, Aromat); 8,55 (1H, dd, J = 1,5 Hz, J = 8,5 Hz, Aromat); 7,53 (1H, q, J = 4,2 Hz, Aromat).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 62,9 MHz): δ(ppm) = 151,1; 139,6; 134,6; 128,8; 120,7.

### 2-(7-Azabenzotriazolyl-1-oxy)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphat, HATU (54)



C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>F<sub>6</sub>N<sub>6</sub>OP  
Exact Mass: 380.095  
Mol. Wt.: 380.23

Zu einer eisgekühlten Lösung aus 25,0 g (89,31 mmol) Chlor-*N,N,N',N'*-tetramethylformamidinium hexafluorophosphat und 12,2 g (1,0 eq.) 7-Aza-1-hydroxy-1*H*-benzotriazol **53** in 400 mL trockenem DCM werden unter Rühren 12,45 mL (1,0 eq.) Triethylamin langsam zugetropft. Nach 30 min wird das Eisbad entfernt. Nach 12 h wird der Niederschlag abgetrennt und mit DCM nachgewaschen. Anschließend wird der Niederschlag in 200 mL Acetonitril aufgelöst, unlösliche Bestandteile werden abfiltriert. Nach

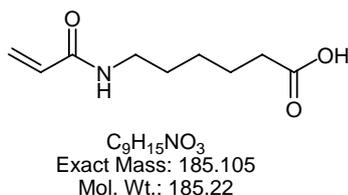
## 6 Experimenteller Teil

Einengen der Lösung auf das Halbevolumen wird das Produkt durch Zugabe von 350 mL DCM wieder ausgefällt und im Exikator getrocknet (30,3 g, 89 %).

**ESI-MS**  $m/z = 235,1$  [m-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>; 614,9 [2m-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>; 994,8 [3m-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>; 1374,9 [4m-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 8,87 (1H, d,  $J = 4,5$  Hz, H<sup>6Ar</sup>); 8,42 (1H, d,  $J = 9,8$  Hz, H<sup>4Ar</sup>); 8,04 (1H, m, H<sup>5Ar</sup>); 3,40 (6H, s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3,07 (6H, s, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

### Acryloyl-Ahx-OH (A1)



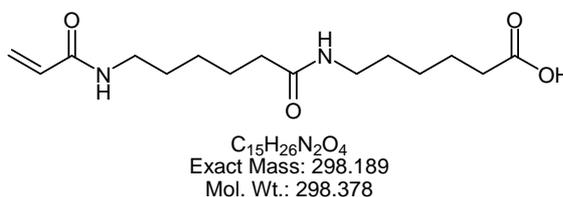
Zu einer Lösung aus 10,0 g (76 mmol)  $\epsilon$ -Aminohexansäure und 10,0 g (1,78 eq.) Ca(OH)<sub>2</sub> in 150 mL Wasser werden unter Rühren innerhalb von 10 min 7,0 mL (1,13 eq.) Acryloylchlorid bei 0 °C zugetropft. Nach weiteren 10 min wird das ungelöste Ca(OH)<sub>2</sub> abfiltriert. Das Produkt wird durch Ansäuern auf pH 2 mit conc. HCl bei 0 °C ausgefällt, abgesaugt und im Exikator getrocknet (10,2 g, 72,4 %).

**Smp.:** 79 – 85 °C (Zers.);

**HPLC** (20 – 80%): 5,34 min.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 8,03 (1H, m, NH); 6,18 (1H, dd,  $J = 10$  Hz, 17 Hz, CH<sub>2</sub>=CH); 6,03 (1H, dd,  $J = 2,5$  Hz, 17 Hz; CH<sub>2</sub>=CH); 5,53 (1H, dd,  $J = 2,5$  Hz, 10 Hz, CH<sub>2</sub>=CH); 3,08 (2H, m, NCH<sub>2</sub>); 2,17 (2H, t,  $J = 7$  Hz, CH<sub>2</sub>COOH); 1,55 - 1,15 (6 H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

### Acryloyl-Ahx-Ahx-OH (A2)



Zu einer Suspension aus 5,0 g (27 mmol) **A1** und 3,4 g (1,1 eq.) *N*-Hydroxysuccinimid in 80 mL trockenem DCM werden bei 0 °C 6,7 g (1,3 eq.) EDCI • HCl zugegeben. Nach 1 h werden 0,2 mL Eisessig zugefügt und die Mischung für weitere 10 min gerührt. Anschließend wird die Reaktionsmischung mit ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg. und Wasser gewaschen. Der Aktivester (4,2 g, 55,2 %) fällt nach Abzug des Lösungsmittels als weiße Kristalle an. 4,0 g

## 6 Experimenteller Teil

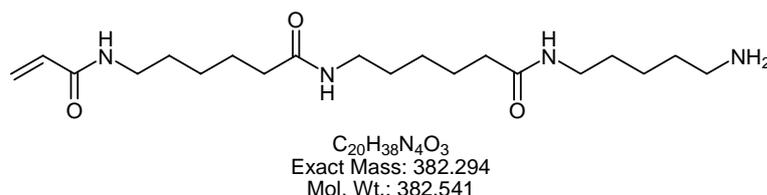
(14,2 mmol) des Aktivesters werden in EtOH:CHCl<sub>3</sub> (4:3) gelöst und langsam zu einer Lösung aus 8,9 g (4,8 eq.)  $\epsilon$ -Aminohexansäure und 3,8 g Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> • 12 H<sub>2</sub>O in 100 mL Wasser getropft. 30 min nach der Zugabe werden die organischen Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die wässrige Phase wird mit conc. HCl auf pH 2 angesäuert und das ausfallende Produkt wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Exikator getrocknet (3,17 g, 75 %).

**HPLC** (20 – 80%): 6,46 min;

**ESI-MS**  $m/z = 299,3 [m+H]^+$ ; 321,3  $[m+Na]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 8,03 (1H, m, NH); 7,70 (1H, m, NH); 6,16 (1H, dd,  $J = 10$  Hz, 17 Hz, CH<sub>2</sub>=CH); 6,03 (1H, dd,  $J = 2,5$  Hz, 17 Hz; CH<sub>2</sub>=CH); 5,53 (1H, dd,  $J = 2,5$  Hz, 10 Hz, CH<sub>2</sub>=CH); 3,15 - 2,95 (4H, m, NCH<sub>2</sub>); 2,17 (2H, t,  $J = 7$  Hz, CH<sub>2</sub>COOH); 2,02 (2H, t,  $J = 7$  Hz, CH<sub>2</sub>CON); 1,55 - 1,15 (12H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

### Acryloyl-Ahx-Ahx-Diamin-H (A3)

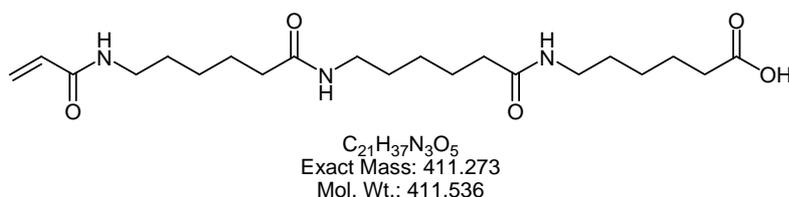


79 mg **A2** werden nach AAV 10 mit 100 mg *N*-Boc-Diaminopentan *p*-Tosylat gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird die Boc-Gruppe mit 40 % TFA in DCM abgespalten. Nach Abzug des Lösungsmittels wird das Produkt in Ether gefällt und im Exikator getrocknet. Ausbeute 80 mg (78 %).

**HPLC** (10 – 70%): 9,55 min;

**ESI-MS**  $m/z = 383,4 [m+H]^+$ ; 405,5  $[m+Na]^+$ .

### Acryloyl-Ahx-Ahx-Ahx-OH (A4)



1,0 g TCP-Harz werden nach AAV 1 mit *N*-Fmoc- $\epsilon$ -Aminohexansäure belegt, anschließend werden nach AAV 2 zwei weitere *N*-Fmoc- $\epsilon$ -Aminohexansäuren und **A1** ge-

kuppelt. Der *Linker* wird mit 10 % TFA in DCM vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert.

**ESI-MS**  $m/z = 412,4 [m+H]^+$ .

### Synthese der Zyklopeptide

#### *cyclo*[-R(Pbf)GD(O*t*Bu)fK-] (**Z1\***)

(C<sub>44</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 911,45)

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

**HPLC** (10 - 90 %): 19,00 min;

**ESI-MS**  $m/z = 856,4 [m-tBu+2H]^+$ ; 912,3  $[m+H]^+$ ; 934,3  $[m+Na]^+$ .

#### *cyclo*[-R(Pbf) $\beta$ AD(O*t*Bu)fK-] (**Z2\***)

(C<sub>45</sub>H<sub>67</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 925,47)

**Z2\*** wird analog zu Verbindung **Z1\*** synthetisiert. Ausbeute **Z2\***: 59 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (10 - 90 %): 19,30 min;

**ESI-MS**  $m/z = 870,6 [m-tBu+2H]^+$ ; 926,5  $[m+H]^+$ ; 948,5  $[m+Na]^+$ .

#### *cyclo*[-R(Pbf)GD(O*t*Bu)fE-] (**Z3\***)

(C<sub>43</sub>H<sub>60</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 912,40)

**Z3\*** wird durch eine kombinierte Festphasen-Lösungssynthese hergestellt. **Z3\*** wird analog zu Verbindung **Z1\*** mit folgenden Modifikationen synthetisiert: Die Fmoc-Entschützung des Glutamats wird auf 2 x 5 min verkürzt und die Kupplung von Fmoc-D-Phe-OH wird nach AAV2c durchgeführt. Ausbeute **Z3\***: 58 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (10 - 90 %): 21,30 min;

**ESI-MS**  $m/z = 857,5 [m-tBu+2H]^+$ ; 913,4  $[m+H]^+$ ; 935,5  $[m+Na]^+$ .

### *cyclo*[-R(Pbf)βAD(O*t*Bu)fE-] (Z4\*)

(C<sub>44</sub>H<sub>62</sub>N<sub>8</sub>O<sub>12</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 926,42)

**Z4\*** wird analog zu Verbindung **Z3\*** synthetisiert. Ausbeute **Z4\***: 48 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (10 - 90 %): 21,30 min;

**ESI-MS** m/z = 857,5 [m-*t*Bu+2H]<sup>+</sup>; 913,4 [m+H]<sup>+</sup>; 935,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### *cyclo*[-R(Pbf)GD(O*t*Bu)y{I}K-] (Z5\*)

(C<sub>44</sub>H<sub>64</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>S<sub>1</sub>I<sub>1</sub>, Exact Mass: 1053,35)

**Z5\*** wird analog zu Verbindung **Z1\*** mit folgenden Modifikationen synthetisiert: statt N-Fmoc-L-Lys(Z)-OH wird N-Fmoc-L-Lys(*iv*Dde) eingesetzt, die Cyclisierung erfolgt mit 1,0 eq. PyBOP und 10 eq. Collidin in trockenem DMF, die *iv*Dde-Schutzgruppe wird durch dreimalige Behandlung mit 2 %igem Hydrazin in DMF abgespalten. Ausbeute **Z5\***: 40 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (20 - 80 %): 27,16 min;

**ESI-MS** m/z = 998,3 [m-*t*Bu+2H]<sup>+</sup>; 1054,3 [m+H]<sup>+</sup>.

### *cyclo*[-R(Pbf)GD(O*t*Bu)y(*t*Bu)K-] (Z6\*)

(C<sub>48</sub>H<sub>73</sub>N<sub>9</sub>O<sub>11</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 983,52)

**Z6\*** wird analog zu Verbindung **Z1\*** synthetisiert. Ausbeute **Z6\***: 79 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (20 - 80 %): 20,47 min;

**ESI-MS** m/z = 928,5 [m-*t*Bu+2H]<sup>+</sup>; 984,4 [m+H]<sup>+</sup>; 1006,4 [m+Na]<sup>+</sup>.

### *cyclo*[-R(Pbf)GD(O*t*Bu)fKG-] (Z7\*)

(C<sub>46</sub>H<sub>68</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 968,48)

**Z7\*** wird durch eine kombinierte Festphasen-Lösungssynthese hergestellt. Dazu wird nach AAV 1 und AAV 2 das lineare Peptid H-D(O*t*Bu)fK(Z)GR(Pbf)G-OH an der Festphase hergestellt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt nach AAV 4. Das lineare Peptid wird nach AAV5 in Lösung cyclisiert, die Z-Schutzgruppe wird nach AAV 6 abgespalten. Ausbeute **Z7\***: 70 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (20 - 80 %): 25,90 min;

**ESI-MS** m/z = 913,6 [m-*t*Bu+H]<sup>+</sup>; 969,6 [m+H]<sup>+</sup>.

### *cyclo*[-LD(O*t*Bu)T(*t*Bu)DpF-] (Z8\*)

(C<sub>40</sub>H<sub>60</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>, Exact Mass: 800,43)

**Z8\*** wird durch eine kombinierte Festphasen-Lösungssynthese hergestellt. Dazu wird nach AAV 1 und AAV 2 das lineare Peptid H-D(OBn)pFLD(OtBu)T(tBu)-OH an der Festphase hergestellt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt nach AAV 4. Das lineare Peptid wird nach AAV5 in Lösung cyclisiert, die OBn-Schutzgruppe wird nach AAV 6 abgespalten. Ausbeute **Z8\***: 68 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (20 - 80 %): 25,10 min;

**ESI-MS** m/z = 801,3 [m+H]<sup>+</sup>; 823,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### *cyclo*[-LD(O*t*Bu)T(*t*Bu)KpF-] (Z9\*)

(C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>, Exact Mass: 813,50)

**Z9\*** wird durch eine kombinierte Festphasen-Lösungssynthese hergestellt. Dazu wird nach AAV 1 und AAV 2 das lineare Peptid H-K(Z)pFLD(OtBu)T(tBu)-OH an der Festphase hergestellt. Die Abspaltung des Peptids vom Harz erfolgt nach AAV 4. Das lineare Peptid wird nach AAV5 in Lösung cyclisiert, die Z-Schutzgruppe wird nach AAV 6 abgespalten. Ausbeute **Z9\***: 68 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (20 - 80 %): 16,93 min;

**ESI-MS** m/z = 814,5 [m+H]<sup>+</sup>; 836,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### *cyclo*[-R(Pbf)D(O*t*Bu)GfK-] (Z10\*)

(C<sub>44</sub>H<sub>65</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 911,45)

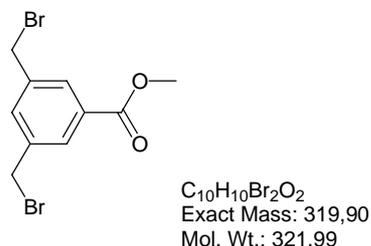
**Z10\*** wird analog zu Verbindung **Z1\*** synthetisiert. Ausbeute **Z10\***: 59 % (bezogen auf die Harzbelegung).

**HPLC** (10 - 80 %): 18,63 min;

**ESI-MS** m/z = 912,6 [m+H]<sup>+</sup>.

### Peptide mit Phosphonatanker

#### 3,5-Bis(brommethyl)benzoesäuremethylester (2)



5,0 g (30 mmol) Methyl-3,5-(bismethyl)benzoat werden in 50 mL  $CCl_4$  gelöst. Nach der Zugabe von 10,6 g (2 eq.) *N*-Bromsuccinimid und 150 mg Benzoylperoxid wird die Mischung 3 h refluxiert. Die erkaltete Mischung wird filtriert und das Lösungsmittel abgezogen. Das Produkt fällt als Öl an, welches durch überschichten mit 100 mL Hexan zur Kristallisation gebracht werden kann. Es werden 2,9 g (29,4 %) blassgelber Feststoff erhalten.

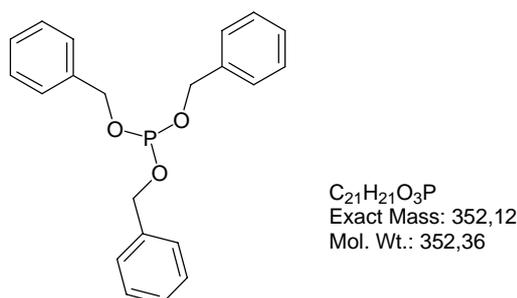
**HPLC** (10 – 90%): 19,46 min;

**MS (EI)**:  $m/z = 321,8 M^+$ ; 290,8  $[M-OMe]^+$ ; 162,0  $[M-2Br]^+$ .

**$^1H$ -NMR** (DMSO, 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 7,97 (2H, s, Aromat); 7,79 (1H, s, Aromat); 4,78 (4H, s,  $BrCH_2C$ ); 3,87 (3H, s,  $COOCH_3$ );

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO, 125 MHz):  $\delta$ (ppm) = 165,33 ( $COOMe$ ); 139,44 134,45 130,51 120,62 ( $^{Arom}C$ ); 52,32 ( $OOCH_3$ ); 32,87 ( $CH_2Br$ ).

#### Tribenzylphosphit (3)



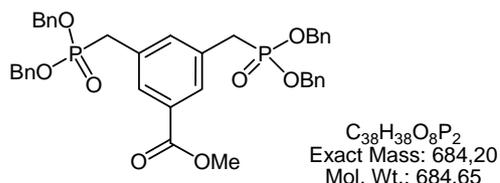
Eine Lösung von 5,0 mL (57,3 mmol) Phosphortrichlorid in 300 mL trockenem Ether wird bei  $-70\text{ }^\circ C$  mit 24,8 mL (3,1 eq.) wasserfreiem Triethylamin versetzt. Anschließend werden 17,8 mL (3,0 eq.) Benzylalkohol in 60 mL trockenem Ether innerhalb von 15 min zugetropft. Nach 2 h wird auf Raumtemperatur erwärmt und 20 h nachgerührt. Das entstandene Triethylammoniumhydrochlorid wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird an Aluminiumoxid 90 basisch chromatographisch ge-

## 6 Experimenteller Teil

reinigt (Eluent: Ethylacetat/Hexan/Triethylamin 30:69:1). Es werden 9,2 g (45 %) farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7,37 - 7,37$  (15 H, m, Aromat); 5,05 (2H, d,  $J = 9,25$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ).

### 5-Methoxycarbonyl-*m*-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester (4)



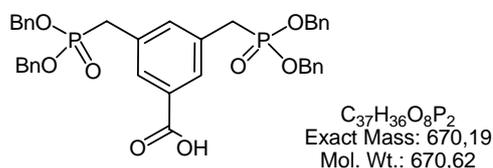
1,5 g (4,7 mmol) 3,5-Bis(bromomethyl)benzoesäuremethylester **2** werden in 4,9 g (3 eq.) Tribenzylphosphit **3** suspendiert. Die Mischung wird für 3 h im 140 °C heißen Ölbad erhitzt, während das entstehende Benzylbromid im Hochvakuum abgezogen wird. Der Rückstand wird nach dem Erkalten an 250 g Kieselgel mit Ethylacetat als Eluent chromatographisch getrennt. Das Produkt fällt als Öl an (1,76 g, 54,7%).

**HPLC** (40 – 100%): 21,07 min.

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 500 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7,77$  (2H, s, Arom.); 7,39 (1H, s, Arom.); 7,29 (20H, m,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ ); 4,94 (8H, m,  $\text{PhCH}_2\text{O}$ ); 3,81 (3H, s,  $\text{COOCH}_3$ ); 3,38 (4H, d,  $J = 21,8$  Hz,  $\text{PCH}_2$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO, 125 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 165,85$  ( $\text{CCOOCH}_3$ ); 136,4 ( $^{\text{Arom.4}}\text{C}$ ); 129,86 ( $^{\text{Arom.2/5}}\text{C}$ ); 128 (m,  $^{\text{Arom.Bn}}\text{C}$ ); 66,77 ( $\text{PhCH}_2\text{O}$ ); 31,91 (d,  $\text{PCH}_2\text{C}$ ,  $J = 134,1$  Hz), 53,2 ( $\text{COOCH}_3$ ).

### 5-Carboxy-*m*-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester (5)



1,0 g (1,5 mmol) 5-Methoxycarbonyl-*m*-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester **4** werden in Methanol und Wasser 2:1 gelöst und mit 53 mg (1,5 eq.) Lithiumhydroxid für vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der pH-Wert der Lösung mit 1 M Salzsäure auf 2,5 eingestellt und das Methanol abgezogen. Das Produkt wird mit Ethylacetat extrahiert. Nach Abzug des Lösungsmittels werden 0,97 g (96,4 %) Öl erhalten.

**HPLC** (10 – 80%): 28,51 min;

**ESI-MS**  $m/z = 671,3 [m+H]^+$ ;  $693,3 [m+Na]^+$ ;  $1340,9 [2m+H]^+$ ;  $1363,0 [2m+Na]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 7,80 (2H, s, Aromat); 7,26 (1H, s, Aromat); 7,31 – 7,27 (20 H, m, AromatBn); 4,94 (8H, m, BnCH<sub>2</sub>O); 3,37 (4H, dd, J = 5,6; 21,6 Hz, PCH<sub>2</sub>).

### **HO-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-(PPA\*)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (P1\*)**

(C<sub>104</sub>H<sub>139</sub>N<sub>9</sub>O<sub>23</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 2005,89)

100 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden zwei weitere Fmoc-Ahx-OH und zwei Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird Dibenzoxyphosphonopropionsäure (6 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten, präperativ HPLC-gereinigt (56 - 100; 30 min) und aus Dioxan lyophilisiert (73 mg).

**HPLC** (10 – 80%): 29,30 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1004,8 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1015,7 [(m+H+Na)/2]^+$ .

### **(3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-Ahx-OH (P2\*)**

(C<sub>104</sub>H<sub>126</sub>N<sub>6</sub>O<sub>20</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1902,8)

150 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden drei weitere Fmoc-Ahx-OH und Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird 5-Carboxy-m-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester **5** (3 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert (144 mg).

**HPLC** (20 – 90%): 27,54 min;

**ESI-MS**  $m/z = 952,8 [(m+2H)/2]^{2+}$ ;  $1903,8 [m+H]^+$ ;  $1926,6 [m+Na]^+$ .

### **(3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-OH (P3\*)**

(C<sub>92</sub>H<sub>104</sub>N<sub>4</sub>O<sub>18</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1676,63)

150 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 wird Fmoc-Ahx-OH und Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird 5-Carboxy-m-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester **5** (3 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert (171 mg).

**ESI-MS**  $m/z = 1677,4 [m+H]^+$ ;  $1699,5 [m+Na]^+$ ;  $1715,4 [m+K]^+$ .

### **(3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-Ahx-OH (P4\*)**

(C<sub>98</sub>H<sub>115</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1789,71)

150 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden zwei weitere Fmoc-Ahx-OH und Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird 5-Carboxy-m-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester **5** (3 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert (161 mg).

**ESI-MS**  $m/z = 1790,5 [m+H]^+$ ;  $1812,5 [m+Na]^+$ .

### **((3,5-Bis(benzylphosphonomethyl)-benzocarbonyl)<sub>2</sub>-K)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-Ahx-OH (P5\*)**

(C<sub>184</sub>H<sub>207</sub>N<sub>9</sub>O<sub>35</sub>P<sub>8</sub>, Exact Mass: 3350,26)

100 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden zwei weitere Fmoc-Ahx-OH und zwei Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird 5-Carboxy-m-xylen-bisphosphonsäure-tetrabenzylester **5** (6 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert (309 mg).

**HPLC** (60 – 100%): 27,16 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1676,7 [(m+2H)/2]^+$ ;  $11687,4 [(m+H+Na)/2]^+$ .

### **HO-Ahx-K-(K-(PPA\*)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (P6\*)**

(C<sub>92</sub>H<sub>117</sub>N<sub>7</sub>O<sub>21</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1779,73)

300 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden zwei Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird Dibenzoxypyphosphonopropionsäure (6 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten, präperativ HPLC-gereinigt (56 - 100; 30 min) und aus Dioxan lyophilisiert (164 mg).

**HPLC** (10 – 80%): 30,63 min;

**ESI-MS**  $m/z = 891,1 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1780,6 [m+H]^+$ ;  $1802,6 [m+Na]^+$ .

### **HO-Ahx-Ahx-K-(K-(PPA\*)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (P7\*)**

(C<sub>98</sub>H<sub>128</sub>N<sub>8</sub>O<sub>22</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1892,81)

300 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden Fmoc-Ahx-OH und zwei Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird Dibenzoxypyphosphonopropionsäure (6 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten, präperativ HPLC-gereinigt (56 - 100; 30 min) und aus Dioxan lyophilisiert (147 mg).

**HPLC** (10 – 80%): 29,99 min;

**ESI-MS**  $m/z = 947,7 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1893,6 [m+H]^+$ ;  $1915,7 [m+Na]^+$ .

### **HO-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-(PPA\*)<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (P8\*)**

(C<sub>110</sub>H<sub>150</sub>N<sub>10</sub>O<sub>24</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 2118,98)

300 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden drei weitere Fmoc-Ahx-OH und zwei Fmoc-Lys(Fmoc)-OH gekuppelt. Abschließend wird Dibenzoxyphosphonopropionsäure (6 eq.) gekuppelt. Mit HFIP wird der Anker nach AAV 4b vom Harz abgespalten, präperativ HPLC-gereinigt (56-100; 30 min) und aus Dioxan lyophilisiert (189 mg).

**HPLC** (10 – 80%): 28,84 min;

**ESI-MS** m/z = 1061,5 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 1072,1 [(m+H+Na)/2]<sup>+</sup>.

### **(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) (PC2)**

(C<sub>75</sub>H<sub>117</sub>N<sub>15</sub>O<sub>26</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1767,72)

**P2\*** wird mit 82 mg **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10 - 60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 22 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 70%): 13,07 min;

**ESI-MS** m/z = 883,3 [(m-2H)/2]<sup>-</sup>.

### **(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) (PC3)**

(C<sub>63</sub>H<sub>95</sub>N<sub>13</sub>O<sub>24</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1541,56)

88 mg **P3\*** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (5 - 60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 10 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 70%): 12,10 min;

**ESI-MS** m/z = 770,4 [(m-2H)/2]<sup>-</sup>.

### **(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) (PC4)**

(C<sub>69</sub>H<sub>106</sub>N<sub>14</sub>O<sub>25</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1654,64)

185 mg **P4\*** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10 - 60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 16 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 70%): 12,58 min;

**ESI-MS** m/z = 826,9 [(m-2H)/2]<sup>-</sup>.

### **((3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl)<sub>2</sub>-K)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) (PC5)**

(C<sub>103</sub>H<sub>166</sub>N<sub>18</sub>O<sub>41</sub>P<sub>8</sub>, Exact Mass: 2558,94)

309 mg **P5\*** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10 - 60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 23 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 70%): 11,90 min;

**ESI-MS** m/z = 644,5 [(m-5H+Na)/4].

### **(3,5-Bisphosphonomethylbenzocarbonyl)<sub>2</sub>-K-Ahx-Ahx-cyclo(-RβADfK-) (PC6)**

(C<sub>64</sub>H<sub>97</sub>N<sub>13</sub>O<sub>24</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1555,57)

88 mg **P3\*** werden mit **Z2\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10 - 60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 11 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 70%): 11,71 min;

**ESI-MS** m/z = 777,3 [(m-2H)/2].

### **cyclo(-RGDfK-)-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PC7)**

(C<sub>63</sub>H<sub>108</sub>N<sub>16</sub>O<sub>27</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1645,52)

63 mg **P6\*** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (15-26; 13 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 19 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (15 – 50%): 8,83 min;

**ESI-MS** m/z = 1644,1 [m-H]<sup>-</sup>; 1668,0 [m-2H+Na].

### **cyclo(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PC8)**

(C<sub>69</sub>H<sub>119</sub>N<sub>17</sub>O<sub>28</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1758,68)

65 mg **P7\*** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (15-26; 13 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 18 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 60%): 12,39 min;

**ESI-MS** m/z = 878,6 [(m-2H)/2]; 1757,1 [m-H].

### ***cyclo(-RGDfK-)-Ahx-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PC9)***

(C<sub>81</sub>H<sub>141</sub>N<sub>19</sub>O<sub>30</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1984,99)

75 mg **P8\*** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (15-26; 13 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 25 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (20 – 40%): 8,91 min;

**ESI-MS** m/z = 991,6 [(m-2H)/2]; 1983,4 [m-H].

### ***cyclo(-RDGfK-)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PC10)***

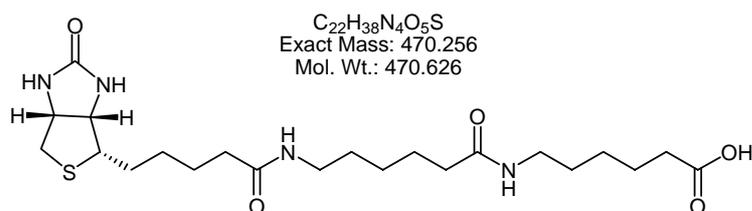
(C<sub>75</sub>H<sub>130</sub>N<sub>18</sub>O<sub>29</sub>P<sub>4</sub>, Exact Mass: 1871,83)

50 mg **P1\*** werden mit **Z10\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (17-50; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 20 mg weißem Feststoff.

**ESI-MS** m/z = 934,8 [(m-2H)/2]; 1870,6 [m-H].

## Peptide mit Biotin-Anker

### **Biotinyl-Ahx-Ahx-OH (Bi1)**



220 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 werden Fmoc-Ahx-OH und Biotin gekuppelt. Mit HOAc wird der Anker nach AAV 4c vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert (108 mg).

**HPLC** (10 – 80%): 10,91 min;

**ESI-MS** m/z = 471,4 [m+H]<sup>+</sup>; 493,5 [m+Na]<sup>+</sup>; 509,4 [m+K]<sup>+</sup>.

### **Biotinyl-*cyclo(-RGDfK-)* (BiC1)**

(C<sub>37</sub>H<sub>55</sub>N<sub>11</sub>O<sub>9</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 829,39)

30 mg Biotin werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (30-50; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 24 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 60%): 15,15 min;

**ESI-MS**  $m/z = 416,3 [(m+2H)/2]^+$ ;  $830,6 [m+H]^+$ .

### **Biotinyl-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) (BiC2)**

( $C_{49}H_{77}N_{13}O_{11}S_1$ , Exact Mass: 1055,56)

58 mg **Bi1** werden mit **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (30-50; 30 min) und lyophilisieren aus Dioxan führt zu 27 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 50%): 18,47 min;

**ESI-MS**  $m/z = 529,2 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1056,8 [m+H]^+$ .

### **Biotinyl-cyclo(-RβADfK-) (BiC3)**

( $C_{38}H_{57}N_{11}O_9S_1$ , Exact Mass: 843,41)

30 mg Biotin werden mit **Z2\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (20-60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 52 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 80%): 12,50 min;

**ESI-MS**  $m/z = 844,7 [m+H]^+$ .

### **Biotinyl-Ahx-Ahx-cyclo(-RβADfK-) (BiC4)**

( $C_{50}H_{79}N_{13}O_{11}S_1$ , Exact Mass: 1069,57)

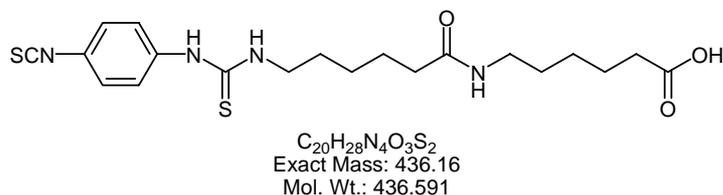
38 mg **Bi1** werden mit **Z2\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (20-60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 20 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 80%): 13,28 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1070,8 [m+H]^+$ ;  $1092,7 [m+Na]^+$ .

### Peptide mit Isothiocyanat-Anker

#### PDIT-Ahx-Ahx-OH (I1)

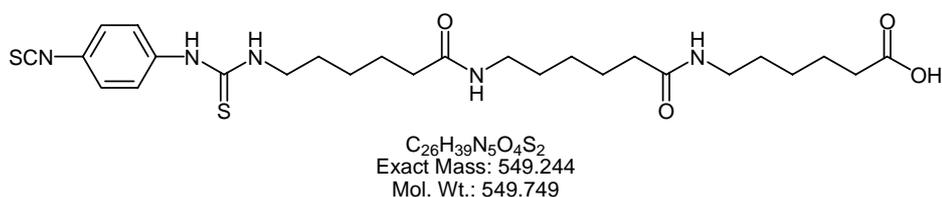


1,0 g TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 wird Fmoc-Ahx-OH gekuppelt. Nach der Fmoc-Entschützung (AAV 9) wird das Harz mit DCM gewaschen und nach AAV 15 die Isothiocyanatfunktion eingeführt. Mit HOAc wird der Anker nach AAV 4c vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert (240 mg).

**HPLC** (10 – 80%): 23,46 min;

**ESI-MS**  $m/z = 437,1 [m+H]^+$ .

#### PDIT-Ahx-Ahx-Ahx-OH (I2)



TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-Ahx-OH belegt. Nach AAV 9 und AAV 2 wird zweimal Fmoc-Ahx-OH gekuppelt. Nach der Fmoc-Entschützung (AAV 9) wird das Harz mit DCM gewaschen und nach AAV 15 die Isothiocyanatfunktion eingeführt. Mit HOAc wird der Anker nach AAV 4c vom Harz abgespalten und aus Dioxan lyophilisiert.

**HPLC** (10 – 80%): 22,63 min;

**ESI-MS**  $m/z = 550,3 [m+H]^+$ ; 572,4  $[m+Na]^+$ .

#### PDIT-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDfK-) (IC1)

( $C_{47}H_{67}N_{13}O_9S_2$ , Exact Mass: 1021,46)

**I1** wird mit 100 mg **Z1\*** nach AAV 10 gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (35-55; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 36 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 70%): 26,99 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1022,6 [m+H]^+$ ;  $1044,5 [m+Na]^+$ .

### PDIT-Ahx-Ahx-GRGDS-OH (IL1)

( $C_{37}H_{56}N_{12}O_{11}S_2$ , Exact Mass: 908,36)

200 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Ser(tBu)-OH belegt. Danach werden die weiteren *N*-Fmoc-Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt. Die letzte Amino-hexansäure wird nach AAV 9 entschützt, anschließend wird nach AAV 15 die Isothiocyanatfunktion eingeführt. Das fertige Peptid wird nach AAV 11 vom Harz abgespalten und HPLC-gereinigt (38-70; 30 min). Ausbeute: 57 mg.

**HPLC** (10 – 90 %): 16,72 min;

**ESI-MS**  $m/z = 909,5 [m+H]^+$ .

**$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO):  $\delta$ (ppm) = 12,65 (1H, bs, COOH); 12,36 (1H, bs, COOH); 9,72 (1H, s, CHNCS); 8,26 (1H, t,  $J = 5,74$  Hz,  $NH^{G6}$ ); 8,18 (1H, d,  $J = 8,02$  Hz,  $NH^{D7}$ ); 8,03 (1H, d,  $J = 7,89$  Hz,  $NH^{\alpha R5}$ ); 8,01 (1H, t,  $J = 5,71$  Hz,  $NH^{G4}$ ); 7,92 (1H, d,  $J = 7,85$  Hz,  $NH^{S8}$ ); 7,74 (1H, t,  $J = 5,54$  Hz,  $NH^{Ahx3}$ ); 7,54 (2H, d,  $J = 8,81$  Hz, PDIT); 7,41 – 7,33 (6H, m, PDIT,  $NH^{ER5}$ ,  $NH^{GuanylR5}$ ); 4,95 (1H, bs,  $OH^{S8}$ ); 4,66 (1H, dt,  $J = 7,90, 5,27$  Hz,  $H\alpha^{D7}$ ); 4,29 (1H, m,  $H\alpha^{R5}$ ); 4,23 (1H, dt,  $J = 7,78, 4,75$  Hz,  $H\alpha^{S8}$ ); 3,77 – 3,67 (6H, m,  $H\alpha^{G4}$ ,  $H\alpha^{G6}$ ,  $H\beta^{S8}$ ); 3,43 (2H, m,  $H\epsilon^{Ahx2}$ ); 3,09 (2H, dt,  $J = 6,38, 6,11$  Hz,  $H\delta^{R5}$ ); 3,00 (2H, dt,  $J = 6,66, 6,19$  Hz,  $H\epsilon^{Ahx3}$ ); 2,69 (1H, dd,  $J = 11,51, 5,15$  Hz,  $H\beta^{D7}$ ); 2,52 – 2,45 (1H, m,  $H\beta^{D7}$ ); 2,12 (2H, t,  $J = 7,43$  Hz,  $H\alpha^{Ahx3}$ ); 2,05 (2H, t,  $J = 7,39$  Hz,  $H\alpha^{Ahx2}$ ); 1,75 – 1,66 (2H, m,  $H\gamma^{R5}$ ); 1,56 – 1,42 (6H, m,  $H\beta^{R5}$ ,  $H\delta^{Ahx3}$ ,  $H\delta^{Ahx2}$ ); 1,40 – 1,34 (2H, m,  $H\beta^{Ahx3}$ ); 1,30 – 1,19 (6H, m,  $H\beta^{Ahx2}$ ,  $H\gamma^{Ahx2}$ ,  $H\gamma^{Ahx3}$ ).

### PDIT-Ahx-Ahx-GRGDSP-OH (IL2)

( $C_{42}H_{63}N_{13}O_{12}S_2$ , Exact Mass: 1005,41)

200 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Pro-OH belegt. Danach werden die weiteren *N*-Fmoc-Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt. Die letzte Amino-hexansäure wird nach AAV 9 entschützt, anschließend wird nach AAV 15 die Isothiocyanatfunktion eingeführt. Das fertige Peptid wird nach AAV 11 vom Harz abgespalten und HPLC-gereinigt (40-70; 30 min). Ausbeute: 39 mg.

**HPLC** (10 – 90 %): 16,87 min;

**ESI-MS**  $m/z = 503,9 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1006,6 [m+H]^+$ .

**$^1H$  NMR** (500 MHz, DMSO):  $\delta$ (ppm) = 12,35 (2H, bs, COOH); 9,69 (1H, s, CHNCS); 8,25 (1H, t,  $J = 5,71$  Hz,  $NH^{G6}$ ); 8,13 (1H, d,  $J = 7,98$  Hz,  $NH^{D7}$ ); 8,02 (1H, d,  $J = 7,76$  Hz,  $NH^{\alpha R5}$ ); 8,00 (1H, t,  $J = 5,79$  Hz,  $NH^{G4}$ ); 7,95 (1H, d,  $J = 7,64$  Hz,  $NH^{S8}$ ); 7,72 (1H, t,  $J = 5,49$  Hz,  $NH^{Ahx3}$ ); 7,54 (2H, d,  $J = 8,77$  Hz, PDIT); 7,45 (1H, t,  $J = 5,54$  Hz,  $NH^{ER5}$ ); 7,36

(2H, d, J = 8,77 Hz, PDIT); 4,60 (1H, dt, J = 7,77, 5,72, H $\alpha^{D7}$ ); 4,52 (1H, dt, J = 7,17, 5,79 Hz, H $\alpha^{S8}$ ); 4,27 (1H, m, H $\alpha^{R5}$ ); 4,22 (1H, dd, J = 9,00, 4,35 Hz, H $\alpha^{P9}$ ); 3,77 – 3,65 (6H, m, H $\alpha^{G4}$ , H $\alpha^{G6}$ , H $\beta^{S8}$ ); 3,65 – 3,57 (2H, m, H $\delta^{P9}$ ); 3,44 (2H, m, H $\epsilon^{Ahx2}$ ); 3,09 (2H, dt, J = 6,11, 6,05 Hz, H $\delta^{R5}$ ); 2,99 (2H, dt, J = 6,70, 6,19 Hz, H $\epsilon^{Ahx3}$ ); 2,65 (1H, dd, J = 17,00, 5,47 Hz, H $\beta^{D7}$ ); 2,50 – 2,43 (1H, m, H $\beta^{D7}$ ); 2,14 – 2,07 (4H, m, H $\beta^{P9}$ , H $\alpha^{Ahx3}$ ); 2,04 (2H, t, J = 7,42 Hz, H $\alpha^{Ahx2}$ ); 1,92 – 1,80 (2H, m, H $\gamma^{P9}$ ); 1,74 – 1,66 (2H, m, H $\gamma^{R5}$ ); 1,56 – 1,42 (6H, m, H $\beta^{R5}$ , H $\delta^{Ahx3}$ , H $\delta^{Ahx2}$ ); 1,39 – 1,32 (2H, m, H $\beta^{Ahx3}$ ); 1,29 – 1,18 (6H, m, H $\beta^{Ahx2}$ , H $\gamma^{Ahx2}$ , H $\gamma^{Ahx3}$ ).

### PDIT-Ahx-Ahx-GR $\beta$ ADSP-OH (IL3)

(C<sub>43</sub>H<sub>65</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>, Exact Mass: 1019,43)

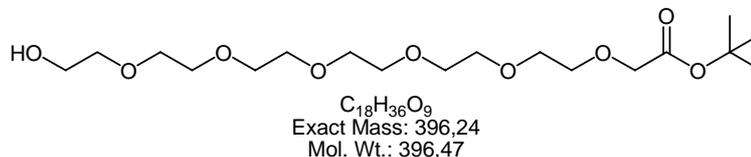
400 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit Fmoc-Pro-OH belegt. Danach werden die weiteren *N*-Fmoc-Aminosäuren nach AAV 2 gekuppelt. Die letzte Aminohexansäure wird nach AAV 9 entschützt, anschließend wird nach AAV 15 die Isothiocyanatfunktion eingeführt. Das fertige Peptid wird nach AAV 11 vom Harz abgespalten und HPLC-gereinigt (30-65; 30 min). Ausbeute: 71 mg.

**HPLC** (10 – 90 %): 16,97 min;

**ESI-MS** m/z = 511,0 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>, 1020,5 [m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO):  $\delta$ (ppm) = 12,35 (2H, bs, COOH); 9,69 (1H, s, CHNCS); 8,19 (1H, d, J = 7,87 Hz, NH<sup>D7</sup>); 8,04 (1H, t, J = 5,57 Hz, NH<sup>G4</sup>); 8,02 – 7,95 (3H, m, NH <sup>$\beta$ A6</sup>, NH <sup>$\alpha$ R5</sup>, NH<sup>S8</sup>); 7,73 (1H, t, J = 5,36 Hz, NH<sup>Ahx3</sup>); 7,55 (2H, d, J = 8,71 Hz, PDIT); 7,46 (1H, m, NH<sup>ER5</sup>); 7,38 (2H, d, J = 8,72 Hz, PDIT); 5,11 (1H, bs, OH<sup>S8</sup>); 4,60 (1H, dt, J = 7,80, 5,77, H $\alpha^{D7}$ ); 4,53 (1H, m, H $\alpha^{S8}$ ); 4,24 – 4,18 (2H, m, H $\alpha^{R5}$ , H $\alpha^{P9}$ ); 3,74 – 3,68 (2H, m, H $\alpha^{G4}$ ); 3,68 – 3,58 (4H, m, H $\beta^{S8}$ , H $\delta^{P9}$ ); 3,48 – 3,40 (2H, m, H $\epsilon^{Ahx2}$ ); 3,28 – 3,22 (2H, m, H $\beta^{ $\beta$ A6}$ ); 3,07 (2H, dt, J = 6,23, 6,15 Hz, H $\delta^{R5}$ ); 3,00 (2H, dt, J = 6,59, 6,22 Hz, H $\epsilon^{Ahx3}$ ); 2,65 (1H, dd, J = 16,40, 5,30 Hz, H $\beta^{D7}$ ); 2,47 – 2,41 (1H, m, H $\beta^{D7}$ ); 2,32 – 2,22 (2H, m, H $\alpha^{ $\beta$ A6}$ ); 2,14 – 2,08 (4H, m, H $\beta^{P9}$ , H $\alpha^{Ahx3}$ ); 2,05 (2H, t, J = 7,35 Hz, H $\alpha^{Ahx2}$ ); 1,93 – 1,80 (2H, m, H $\gamma^{P9}$ ); 1,72 – 1,62 (2H, m, H $\gamma^{R5}$ ); 1,56 – 1,32 (8H, m, H $\beta^{R5}$ , H $\delta^{Ahx3}$ , H $\beta^{Ahx3}$ , H $\delta^{Ahx2}$ ); 1,30 – 1,20 (6H, m, H $\beta^{Ahx2}$ , H $\gamma^{Ahx2}$ , H $\gamma^{Ahx3}$ ).

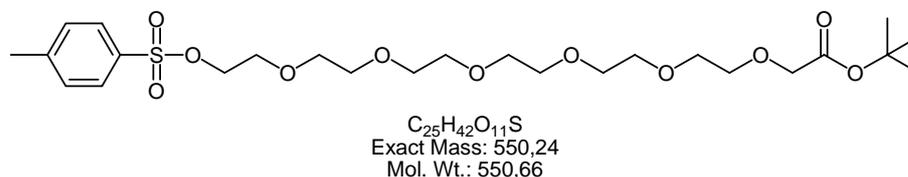
## Multimere RGD-Peptide mit Tricysteinanker

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

Zu einer Suspension von 7,1 g KH 35 % (w/w) in Mineralöl (0,75 eq.) in 300 mL trockenem THF werden 25,0 g (1,25 eq.) Hexaethylenglycol **6** langsam zugetropft. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur werden 10,33 mL (70,84 mmol) Bromessigsäure-*tert.*-butylester **8** zugetropft und über Nacht unter Rückfluss gekocht. Anschließend wird das THF im Vakuum abgezogen und der Rückstand mit EtOAc / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3/1) aufgenommen. Die Lösung wird viermal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach Abzug des Lösungsmittels wird der Rückstand chromatographisch an Kiesigel gereinigt (fünffaches Säulenvolumen Hexan, dann MeOH). Das Produkt ist in der MeOH-Fraktion enthalten. Es werden 20,0 g (95,0 %) gelbes Öl erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 4,01 (2H, s, OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 3,74 – 3,58 (24H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 2,44 (1H, s, OH); 1,47 (9H, s, O*t*Bu).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62,9 MHz): δ(ppm) = 169,65 (CH<sub>2</sub>COO*t*Bu); 81,64 (OCMe<sub>3</sub>); 72,52 – 61,38 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 28,1 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

20-(*O-p*-Tosyl)-Hydroxy-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert.*-butylester (55)

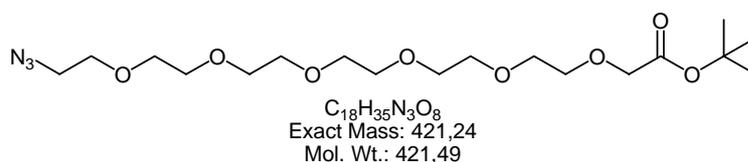
Zu einer Lösung von 22,6 g (57 mmol) Rohprodukt **9**, 1,09 g (0,2 eq.) Trimethylamin•HCl und 23,8 mL (3 eq.) Triethylamin in 150 mL DCM (wasserfrei) werden bei 0 °C 10,87 g (1,0 eq.) *p*-Tosylchlorid in 50 mL DCM innerhalb von 10 min zugetropft. Die Kühlung wird entfernt und man lässt noch 1 h rühren. Danach wird das Lösungsmittel abgezo-

## 6 Experimenteller Teil

gen. Man erhält 20,2 g (64,4 %) Rohprodukt **55** als Öl, welches ohne weitere Reinigung im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt wird.

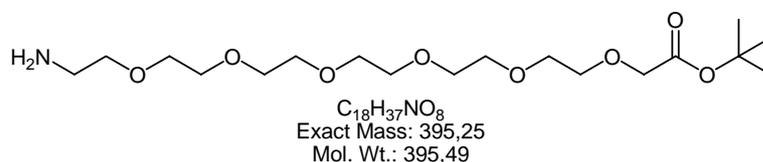
$R_f = 0,48$  (Chloroform/Methanol 20:1)

### 20-Azido-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert.*-butylester (**56**)



Zu einer Lösung von 20,2 g (36 mmol) Tosylat **55** in 100 mL DMF (wasserfrei) werden 4,7 g (2,0 eq.)  $NaN_3$  gegeben und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das DMF wird im Hochvakuum abdestilliert, der Rückstand in 300 mL Essigester aufgenommen und mit dreimal 50 mL ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Das Lösungsmittel wird mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und im Vakuum entfernt. Es werden 14,2 g (93,6 %) Öl erhalten.

### 20-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure-*tert.*-butylester (**10**)



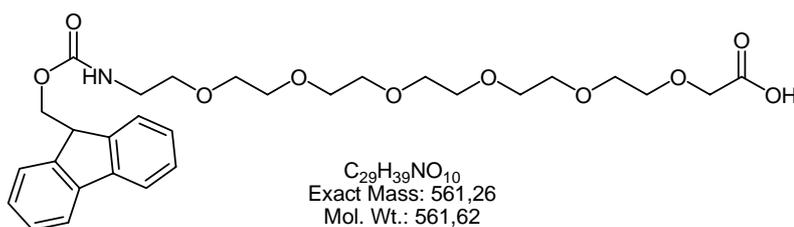
14,2 g (34 mmol) Azid **56** werden in 100 mL Ethanol und 15 mL Chloroform gelöst. Nach Zugabe von 0,5 g Katalysator (5 % Pd/C) wird das Gemisch 12 h unter  $H_2$ -Atmosphäre gerührt. Der Katalysator wird über Celite<sup>®</sup> abfiltriert und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in 200 mL Essigester aufgenommen und einmal mit 100 mL und zweimal mit 50 mL 1 N  $KHSO_4$ -Lsg extrahiert. Die Wasserphase wird mit  $K_2CO_3$  basisch gemacht und einmal mit 100 mL und zweimal mit 50 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit  $Na_2SO_4$  getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 10,3 g (76,6 %) gelbliches Öl.

**ESI-MS**  $m/z = 340,3 [m-tBu+H]^+$ ;  $396,2 [m+H]^+$ ;  $418,2 [m+Na]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3,89 (2H, s, OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 3,60 – 3,42 (20H, m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 3,37 (2H, t, J = 5,2 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 2,72 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>); 1,58 (2H, bs, NH<sub>2</sub>); 1,33 (9H, s, O*t*Bu).

**<sup>13</sup>C-NMR** (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 169,4 (CO<sub>2</sub>*t*Bu), 81,1 (OCMe<sub>3</sub>), 73,1, 70,4 – 70,0, 68,8 (OCH<sub>2</sub>), 41,5 (CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 27,8 (CH<sub>3</sub>).

### 20-(*N*-Fmoc)-Amino-3,6,9,12,15,18-hexaoxa-eicosansäure (11)



Zu einer Lösung von 10,3 g (26 mmol) Amin **10** in 26 mL THF und 78 mL 10 %iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. werden bei 0 °C 6,75 g (1,0 eq.) FmocCl in 39 mL THF innerhalb von 10 min zutropft. Man lässt über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Das THF wird im Vakuum entfernt und die Reaktionslösung mit 200 mL Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mit zweimal 50 mL ges. NaCl-Lsg gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL TFA / Wasser 9 / 1 gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die TFA wird im Hochvakuum entfernt, das Rohprodukt in 200 mL Ether und 100 mL DCM aufgenommen und mit fünfmal 70 mL ges. NaHCO<sub>3</sub>-Lsg ausgeschüttelt. Das Ausschütteln ist wegen der Gefahr der Bildung einer Suspension vorsichtig durchzuführen. Die vereinigten basischen wässrigen Phasen werden unter kräftigem Rühren mit 3 g KHSO<sub>4</sub> und 6 N HCl (ca. 15 mL) angesäuert, bis das Produkt ausfällt. Die wässrige Phase wird mit einer Mischung aus 200 mL Ether und 100 mL DCM extrahiert. Die gesamte Extraktionsprozedur wird wiederholt. Danach wird die organische Phase mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 6,88 g (47,1 %) **11** als schwach gelbes Öl.

**HPLC** (10 – 60 %): 28,1 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 340,4 [m-Fmoc+H]<sup>+</sup>; 562,4 [m+H]<sup>+</sup>; 584,6 [m+Na]<sup>+</sup>; 600,4 [m+K]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 9,72 (1H, bs, CO<sub>2</sub>H); 7,73 (2H, d, J = 7,0 Hz, H<sup>Ar</sup>); 7,58 (2H, d, J = 7,0 Hz, H<sup>Ar</sup>); 7,37 (2H, m, H<sup>Ar</sup>); 7,29 (2H, m, H<sup>Ar</sup>); 5,54 (1H, bs NH); 4,39 (1H,

d, J = 6,8 Hz, CHCH<sub>2</sub>); 4,19 (2H, t, J = 6,8 Hz, CHCH<sub>2</sub>); 4,13 (2H, s, OCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>); 3,62-3,24 (m, 24 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (62,9 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172,2 (CO<sub>2</sub>H); 156,6 (NHCO<sub>2</sub>); 143,9, 141,2, 127,6, 127,0, 125,0, 119,8 (C<sup>α</sup>); 70,9 – 70,2, 68,8, 66,6 (OCH<sub>2</sub>); 47,1 (CH); 40,7 (CH<sub>2</sub>NH).

### ***cyclo(-R(Pbf)GD(tBu)fE-)-Hegas-OH (12)***

(C<sub>57</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>19</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 1233,58)

1,5 g TCP-Harz werden nach AAV 1 mit **11** belegt. Die Fmoc-Schutzgruppe wird nach AAV 9 abgespalten. 694 mg **Z3\*** wird mit 75,2 mg Triphosgen und 400 μL DIPEA in 10 mL trockenem THF für 30 min voraktiviert und anschließend zum Harz gegeben. Nach 24 h wird das Harz mit THF und DCM gewaschen und das Peptid mit 5 % TFA in DCM abgespalten. Das Produkt wird präperativ HPLC-gereinigt (45-100; 30 min). Ausbeute: 245 mg.

**HPLC** (40 – 90 %): 11,70 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 1178,5 [m-tBu+H]<sup>+</sup>; 1234,6 [m+H]<sup>+</sup>; 1256,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### ***cyclo(-R(Pbf)βAD(tBu)fE-)-Hegas-OH (13)***

(C<sub>58</sub>H<sub>89</sub>N<sub>9</sub>O<sub>19</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 1233,58)

1,5 g TCP-Harz werden nach AAV 1 mit **11** belegt. Die Fmoc-Schutzgruppe wird nach AAV 9 abgespalten. 694 mg **Z4\*** werden mit 75,2 mg Triphosgen und 400 μL DIPEA in 10 mL trockenem THF für 30 min voraktiviert und anschließend zum Harz gegeben. Nach 24 h wird das Harz mit THF und DCM gewaschen und das Peptid mit 5 % TFA in DCM abgespalten. Das Produkt wird präperativ HPLC-gereinigt (45-100; 30 min). Ausbeute: 265 mg.

**HPLC** (40 – 90 %): 11,17 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 650,0 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 1248,6 [m+H]<sup>+</sup>; 1270,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### ***cyclo(-R(Pbf)GD(tBu)fE-)-Hegas-K[Hegas-cyclo(-R(Pbf)βAD(tBu)fE-)]-OH (14)***

(C<sub>121</sub>H<sub>188</sub>N<sub>20</sub>O<sub>39</sub>S<sub>2</sub>, Exact Mass: 2591,27)

1,0 g TCP-Harz wird nach AAV 1 mit Fmoc-K(ivDde)-OH belegt. Die Fmoc-Schutzgruppe wird nach AAV 9 abgespalten. 363 mg **11** werden mit 63,8 mg Triphosgen und 400 μL DIPEA in 8 mL trockenem THF für 30 min voraktiviert und anschließend zum Harz gegeben. Nach 24 h wird das Harz mit THF gewaschen und die Fmoc-Gruppe

nach AAV 9 abgespalten. 463 mg **Z3\*** werden mit 63,8 mg Triphosgen und 400  $\mu$ L DIPEA in 8 mL trockenem THF für 30 min voraktiviert und anschließend zum Harz gegeben. Nach 24 h wird das Harz mit THF gewaschen und die ivDde-Schutzgruppe mit  $2 \times 10$  min 5 % Hydrazin in DMF abgespalten. Danach 363 mg **11** werden mit 63,8 mg Triphosgen und 400  $\mu$ L DIPEA in 8 mL trockenem THF für 30 min voraktiviert und zum Harz gegeben. Nach 24 h wird das Harz mit THF gewaschen und die Fmoc-Gruppe nach AAV 9 abgespalten. 463 mg **Z4\*** werden mit 63,8 mg Triphosgen und 400  $\mu$ L DIPEA in 8 mL trockenem THF für 30 min voraktiviert und anschließend zum Harz gegeben. Nach 24 h wird das Harz mit THF und DCM gewaschen und das Peptid mit 5 % TFA in DCM abgespalten. Das Produkt wird präperativ HPLC-gereinigt (55-90; 30 min). Ausbeute: 208 mg.  
**ESI-MS**  $m/z = 865,0 [(m+3H)/3]^+$ ; 872,5  $[(m+2H+Na)/3]^+$ ; 1296,7  $[(m+2H)/2]^+$ ; 1307,6  $[(m+H+Na)/2]^+$ .

### **(*cyclo(-RGDfE)-Hegas*)<sub>2</sub>-K-K[*Hegas-cyclo(-RGDfE-)*]-CCC-OH (D1)**

(C<sub>141</sub>H<sub>224</sub>N<sub>34</sub>O<sub>51</sub>S<sub>3</sub>, Exact Mass: 3305,51)

75 mg TCP-Harz, das nach AAV 1 und AAV 2 mit Fmoc-C(Trt)C(Trt)C(Trt)-OH belegt ist, wird nach AAV 2 mit Fmoc-K(ivDde)-OH und mit Fmoc-K(Fmoc)-OH gekuppelt. Anschließend werden die Fmoc-Schutzgruppen nach AAV 9 und die ivDde-Schutzgruppe mit  $2 \times 10$  min 5 % Hydrazin in NMP abgespalten. 150 mg **12** werden mit 46 mg HATU, 17 mg HOAt und 270  $\mu$ L Collidin in 1 mL trockenem DMF für 2 h voraktiviert und zum Harz gegeben. Nach 96 h wird das Harz mit NMP und DCM gewaschen, das Peptid mit 5 % TFA in DCM abgespalten und nach AAV 7b entschützt. Die HPLC-Reinigung (25-37; 17 min) führt zu 3 mg Produkt.

**HPLC** (25 - 45 %): 13,79 min;

**ESI-MS**  $m/z = 833,6 [(m+3H+Na)/4]^+$ ; 837,4  $[(m+2H+2Na)/4]^+$ ; 1103,5  $[(m+3H)/3]^+$ ; 1110,7  $[(m+2H+Na)/3]^+$ ; 1654,1  $[(m+2H)/2]^+$ ; 1665,3  $[(m+H+Na)/2]^+$ .

### **((*cyclo(-RGDfE)-Hegas*)<sub>2</sub>-K)<sub>2</sub>-K-CCC-OH (D2)**

(C<sub>187</sub>H<sub>297</sub>N<sub>45</sub>O<sub>67</sub>S<sub>3</sub>, Exact Mass: 4341,04)

75 mg TCP-Harz, das nach AAV 1 und AAV 2 mit Fmoc-C(Trt)C(Trt)C(Trt)-OH belegt ist, werden nach AAV 2 zweimal mit Fmoc-K(Fmoc)-OH gekuppelt. Anschließend werden die Fmoc-Schutzgruppen nach AAV 9 abgespalten. 188 mg **12** werden mit 58 mg HATU, 21 mg HOAt und 330  $\mu$ L Collidin in 1 mL trockenem DMF für 2 h voraktiviert und zum Harz gegeben. Nach 96 h wird das Harz mit NMP und DCM gewaschen, das Peptid mit 5 % TFA in DCM abgespalten und nach AAV 7b entschützt. Die HPLC-Reinigung (25-37; 17 min) führt zu 2 mg Produkt.

**HPLC** (25 – 45 %): 14,29 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 869,6 [(m+5H)/5]<sup>+</sup>; 874,4 [(m+4H+Na)/5]<sup>+</sup>; 877,3 [(m+4H+K)/5]<sup>+</sup>; 883,3 [(m+3H+2Na)/5]<sup>+</sup>; 1087,0 [(m+4H)/4]<sup>+</sup>; 1092,3 [(m+3H+Na)/4]<sup>+</sup>; 1448,6 [(m+3H)/3]<sup>+</sup>; 1456,7 [(m+2H+Na)/3]<sup>+</sup>.

### **(*cyclo(-RGDfE)-Hegas*)<sub>2</sub>-K-K[K-(*Hegas-cyclo(-RβADfE-)*)<sub>2</sub>]-CCC-OH (D4)**

(C<sub>189</sub>H<sub>301</sub>N<sub>45</sub>O<sub>67</sub>S<sub>3</sub>, Exact Mass: 4369,07)

75 mg TCP-Harz, das nach AAV 1 und AAV 2 mit Fmoc-C(Trt)C(Trt)C(Trt)-OH belegt ist, werden nach AAV 2 mit Fmoc-K(ivDde)-OH und mit Fmoc-K(Fmoc)-OH gekuppelt. Anschließend werden die Fmoc-Schutzgruppen nach AAV 9 abgespalten. 103 mg **12** werden mit 31 mg HATU, 11 mg HOAt und 110 µL Collidin in 0,42 mL trockenem DMF für 2 h voraktiviert und zum Harz gegeben. Nach 96 h wird das Harz mit NMP gewaschen und die ivDde-Schutzgruppe mit 2 × 10 min 5 % Hydrazin in NMP abgespalten. Anschließend wird nach AAV 2 Fmoc-K(Fmoc)-OH gekuppelt und die Fmoc-Schutzgruppen nach AAV 9 abgespalten. 103 mg **13** werden mit 31 mg HATU, 11 mg HOAt und 110 µL Collidin in 0,42 mL trockenem DMF für 2 h voraktiviert und zum Harz gegeben. Nach 96 h wird das Harz mit NMP und DCM gewaschen, das Peptid mit 5 % TFA in DCM abgespalten und nach AAV 7b entschützt. Die HPLC-Reinigung (25-37; 17 min) führt zu 2 mg Produkt.

**HPLC** (25 – 45 %): 13,19 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 875,2 [(m+3H+2Na)/5]<sup>+</sup>; 880,0 [(m+4H+Na)/5]<sup>+</sup>; 883,3 [(m+3H+2Na)/5]<sup>+</sup>; 1094,2 [(m+4H)/4]<sup>+</sup>; 1099,5 [(m+3H+Na)/4]<sup>+</sup>; 1458,0 [(m+3H)/3]<sup>+</sup>; 1465,5 [(m+2H+Na)/3]<sup>+</sup>.

### **Lamininsequenzen mit Acryloyl-Anker**

Jeweils 100 mg TCP-Harz werden nach AAV1 mit der ersten *N*-Fmoc-Aminosäure belegt. Danach werden die weiteren *N*-Fmoc-Aminosäuren nach AAV2 gekuppelt. Als letzte Säure wird Acryloyl-Ahx-OH gekuppelt. Anschließend wird das Peptid nach AAV11 vom Harz abgespalten und HPLC-gereinigt (20-50; 30 min).

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-YIGSR-OH (AL1)**

(C<sub>41</sub>H<sub>66</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>, Exact Mass: 874,49)

**HPLC** (5 - 60 %): 16,93 min;

**ESI-MS**  $m/z = 438,5 [(m+2H)/2]^+$ ; 875,7  $[m+H]^+$ ; 897,6  $[m+Na]^+$ .

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-PDSGR-OH (AL2)**

( $C_{35}H_{58}N_{10}O_{12}$ , Exact Mass: 810,42)

**HPLC** (5 - 60 %): 13,73 min;

**ESI-MS**  $m/z = 406,5 [(m+2H)/2]^+$ ; 811,6  $[m+H]^+$ ; 833,5  $[m+Na]^+$ .

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-SIKVAV-OH (AL3)**

( $C_{43}H_{77}N_9O_{11}$ , Exact Mass: 895,57)

**HPLC** (5 - 60 %): 18,51 min;

**ESI-MS**  $m/z = 896,7 [m+H]^+$ ; 918,6  $[m+Na]^+$ .

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-LGTIPG-OH (AL4)**

( $C_{40}H_{68}N_8O_{11}$ , Exact Mass: 836,50)

**HPLC** (5 - 60 %): 19,95 min;

**ESI-MS**  $m/z = 837,4 [m+H]^+$ ; 859,7  $[m+Na]^+$ .

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-IKVAV-OH (AL5)**

( $C_{40}H_{72}N_8O_9$ , Exact Mass: 808,54)

**HPLC** (5 - 60 %): 19,70 min;

**ESI-MS**  $m/z = 405,6 [(m+2H)/2]^+$ ; 809,6  $[m+H]^+$ ; 831,6  $[m+Na]^+$ .

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-SEIKLLIS-OH (AL6)**

( $C_{56}H_{99}N_{11}O_{16}$ , Exact Mass: 1181,73)

**HPLC** (5 - 60 %): 22,06 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1182,8 [m+H]^+$ ; 1204,8  $[m+Na]^+$ .

### **Acryloyl-Ahx-Ahx-EIKLLIS-OH (AL7)**

( $C_{53}H_{94}N_{10}O_{14}$ , Exact Mass: 1094,70)

**HPLC** (5 - 60 %): 22,36 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1095,8 [m+H]^+$ .

### Acryloyl-Ahx-Ahx-IGSR-OH (AL8)

(C<sub>32</sub>H<sub>57</sub>N<sub>9</sub>O<sub>9</sub>, Exact Mass: 711,43)

**HPLC** (5 - 60 %): 15,72 min;

**ESI-MS** m/z = 357,0 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 712,6 [m+H]<sup>+</sup>; 734,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### Acryloyl-Ahx-Ahx-KQNCLS-OH (AL9)

(C<sub>42</sub>H<sub>73</sub>N<sub>11</sub>O<sub>13</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 971,51)

**HPLC** (5 - 60 %): 14,57 min;

**ESI-MS** m/z = 487,0 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 972,6 [m+H]<sup>+</sup>; 994,6 [m+Na]<sup>+</sup>.

### Acryloyl-Ahx-Ahx-EPDIM-OH (AL10)

(C<sub>40</sub>H<sub>65</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 883,44)

**HPLC** (5 - 60 %): 19,10 min;

**ESI-MS** m/z = 884,4 [m+H]<sup>+</sup>; 906,6 [m+Na]<sup>+</sup>.

### Acryloyl-Ahx-Ahx-NKDIL-OH (AL11)

(C<sub>41</sub>H<sub>71</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>, Exact Mass: 881,52)

**HPLC** (5 - 60 %): 18,09 min;

**ESI-MS** m/z = 442,0 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 882,6 [m+H]<sup>+</sup>; 904,6 [m+Na]<sup>+</sup>.

### Acryloyl-Ahx-Ahx-NKDIM-OH (AL12)

(C<sub>40</sub>H<sub>69</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub>S<sub>1</sub>, Exact Mass: 899,48)

**HPLC** (5 - 60 %): 16,65 min;

**ESI-MS** m/z = 451,0 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 900,6 [m+H]<sup>+</sup>; 922,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### Acryloyl-Ahx-Ahx-EPDIL-OH (AL13)

(C<sub>41</sub>H<sub>67</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>, Exact Mass: 865,48)

**HPLC** (5 - 60 %): 20,46 min;

**ESI-MS** m/z = 866,4 [m+H]<sup>+</sup>; 888,6 [m+Na]<sup>+</sup>; 1731,5 [2m+H]<sup>+</sup>.

### Acryloyl-Ahx-Ahx-YIGSR-NH<sub>2</sub> (AL14)

(C<sub>41</sub>H<sub>66</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>, Exact Mass: 874,49)

**HPLC** (10 - 60 %): 14,44 min;

**ESI-MS** m/z = 438,2 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 874,7 [m+H]<sup>+</sup>.

### LDT-Peptide

#### *cyclo(-LDTDpF-)* (**Z8**)

(C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub>O<sub>11</sub>, Exact Mass: 688,31)

**Z8\*** wird mit 5 mL TFA / Wasser / TIPS (95:2:3) für 1 h entschützt, nachdem das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen wurde, wird das Peptid in Ether gefällt und anschließend HPLC-gereinigt (25-65; 30 min).

**HPLC** (10 – 90 %): 15,09 min;

**ESI-MS** m/z = 689,4 [m+H]<sup>+</sup>; 711,5 [2m+H]<sup>+</sup>; 1376,6 [2m+H]<sup>+</sup>; 1399,3 [2m+Na]<sup>+</sup>.

#### *cyclo(-LDTKpF-)* (**Z9**)

(C<sub>34</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>, Exact Mass: 701,37)

**Z9\*** wird mit 5 mL TFA / Wasser / TIPS (95:2:3) für 1 h entschützt, nachdem das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen wurde, wird das Peptid in Ether gefällt und anschließend HPLC-gereinigt (25-65; 30 min).

**HPLC** (10 – 90 %): 13,63 min;

**ESI-MS** m/z = 702,4 [m+H]<sup>+</sup>; 724,4 [m+Na]<sup>+</sup>; 1403,4 [2m+H]<sup>+</sup>; 1425,4 [2m+Na]<sup>+</sup>.

#### *cyclo(-LDTK(Ac)pF-)* (**C<sup>L</sup>1**)

(C<sub>36</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>, Exact Mass: 743,39)

80 mg **Z9\*** werden in 2 mL DCM gelöst und mit 350 µL DIPEA und 90 µL Acetanhydrid versetzt. Nach 48 h wird das Lösungsmittel abgezogen und das Peptid nach AAV 7b entschützt und HPLC-gereinigt (30-60; 30 min); 19 mg.

**HPLC** (10 – 90 %): 15,17 min;

**ESI-MS** m/z = 744,4 [m+H]<sup>+</sup>; 766,6 [m+Na]<sup>+</sup>; 1487,4 [2m+H]<sup>+</sup>; 1509,4 [2m+Na]<sup>+</sup>.

#### *cyclo(-LDTKpF-)-Ahx-Ahx-Ahx-Acryloyl* (**AC<sup>L</sup>1**)

(C<sub>55</sub>H<sub>86</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>, Exact Mass: 1094,64)

80 mg **Z9\*** werden nach AAV 10 mit **A4** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. Nach HPLC-Reinigung (35-60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan werden 14 mg weißer Feststoff erhalten.

**HPLC** (10 – 90 %): 15,69 min;

**ESI-MS** m/z = 548,7 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 1095,8 [m+H]<sup>+</sup>; 1117,8 [m+Na]<sup>+</sup>.

### ***cyclo(-LDTDpF-)-Diamin-Ahx-Ahx-Acryloyl (AC<sup>L2</sup>)***

(C<sub>52</sub>H<sub>82</sub>N<sub>10</sub>O<sub>13</sub>, Exact Mass: 1054,61)

80 mg **Z8\*** werden nach AAV 10 mit **A3** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. Nach HPLC-Reinigung (35-60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan werden 13 mg weißer Feststoff erhalten.

**HPLC** (10 – 90 %): 16,09 min;

**ESI-MS** m/z = 528,6 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 1055,7 [m+H]<sup>+</sup>; 1077,7 [m+Na]<sup>+</sup>.

### ***cyclo(-RGDfKG-)-Ahx-Ahx-Ahx-PDIT (IC<sup>G1</sup>)***

(C<sub>55</sub>H<sub>81</sub>N<sub>15</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>, Exact Mass: 1191,57)

**Z7\*** wird nach AAV 10 mit 22,6 mg **I2** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. Nach HPLC-Reinigung (40-65; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan werden 4 mg weißer Feststoff erhalten.

**HPLC** (10 - 80 %): min;

**ESI-MS** m/z = 1192,8 [m+H]<sup>+</sup>; 1214,6 [m+Na]<sup>+</sup>.

### ***cyclo(-RGDfKG-)-Ahx-Ahx-Ahx-Acryloyl (IA<sup>G1</sup>)***

(C<sub>50</sub>H<sub>79</sub>N<sub>13</sub>O<sub>12</sub>, Exact Mass: 1053,60)

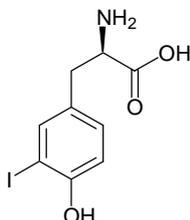
118 mg **Z7\*** werden nach AAV 10 mit **A2** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. Nach HPLC-Reinigung (20-60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan werden 21 mg weißer Feststoff erhalten.

**HPLC** (5 - 60 %): 17,51 min;

**ESI-MS** m/z = 1054,8 [m+H]<sup>+</sup>; 1076,8 [m+Na]<sup>+</sup>.

### Peptide zur Radiomarkierung

#### [2R]-2-Amino-3-(4-hydroxy-3-iod-phenyl)-propionsäure (16), H-D-Tyr{I}-OH



C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>INO<sub>3</sub>  
Exact Mass: 306,97  
Mol. Wt.: 307,09

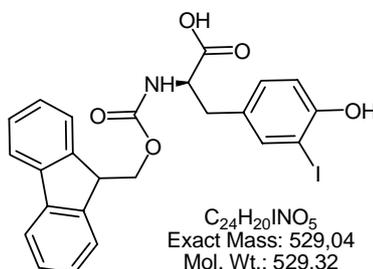
Zu einer Lösung von 4,7 g (26 mmol) D-Tyrosin in 500 mL 25 %iger Ammoniaklösung werden innerhalb von 15 min 6,4 g (1,0 eq.) Iod, in 50 mL Ethanol gelöst, zugetropft. Nach 50-stündigem Rühren wird bis zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird mit 150 mL Wasser umkristallisiert. Es werden 3,15 g (39,5 %) weiße Kristalle erhalten.

**HPLC** (5 – 50%): 13,20 min;

**ESI-MS** m/z = 308,0 [m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 250 MHz): δ(ppm) = 7,55 (1H, d, J = 2,2 Hz, H<sup>2Ar</sup>); 7,01 (1H, dd, J = 2,2 Hz, 8,5 Hz, H<sup>6Ar</sup>); 6,88 (1H, d, J = 8,4 Hz, H<sup>5Ar</sup>); 4,13 (1H, dd, J = 5,7 Hz, 7,6 Hz, H<sup>α</sup>); 3,09 (1H, dd, J = 5,7 Hz, 14,7 Hz, H<sup>β</sup>); 2,98 (1H, dd, J = 7,6 Hz, 14,8 Hz, H<sup>β</sup>).

#### [2R]-2-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-Hydroxy-3-iod-phenyl)-propionsäure (17), Fmoc-D-Tyr{I}-OH



C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>INO<sub>5</sub>  
Exact Mass: 529,04  
Mol. Wt.: 529,32

3,15 g (10,3 mmol) [2R]-2-Amino-3-(4-Hydroxy-3-iod-phenyl)-propionsäure **16**, 3,5 g (1,0 eq.) Fmoc-OSu und 1,18 g (1,4 eq.) NaHCO<sub>3</sub> werden in 90 mL Wasser, 60 mL Aceton und 40 mL THF suspendiert. Nach 16 stündigem Rühren wird mit 1,5 M HCl auf pH 1 angesäuert und die organischen Lösungsmittel werden abgezogen. Anschließend wird

## 6 Experimenteller Teil

---

dreimal mit 100 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit 100 mL 1,5 M HCl und einmal mit 100 mL Wasser gewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels bleibt 5,76 g fester Rückstand, der chromatographisch gereinigt wird (Eluent: Toluol:Essigsäure 4:1). Es werden 3,2 g (58,7 %) Feststoff erhalten.

**Smp.** 134 – 137 °C,

**HPLC** (5 – 50%): 13,20 min;

**ESI-MS**  $m/z = 308,0 [m+H]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 12,50 (1H, bs, COOH); 10,12 (1H, s, NH); 7,87 (2H, d,  $J = 7,5$  Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,69 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,65 – 7,59 (3H, m, <sup>Phe</sup>CH); 7,39 (2H, m, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,30 (2H, m, <sup>Fmoc</sup>CH); 4,20 – 4,15 (3H, m, CHCH<sub>2</sub>O); 4,08 (1H, m, H<sup>α</sup>); 2,94 (1H, dd, H<sup>β</sup>); 2,72 (1H, dd, H<sup>β</sup>).

### Acryloyl-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDy{I}K-) (AC<sup>y</sup>I1)

(C<sub>42</sub>H<sub>64</sub>N<sub>11</sub>O<sub>11</sub>, Exact Mass: 1025,38)

100 mg **Z5\*** werden nach AAV 10 mit **A2** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. Nach HPLC-Reinigung (10-80; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan werden 31 mg weißer Feststoff erhalten.

**HPLC** (5 – 60%): 17,85 min;

**ESI-MS**  $m/z = 514,0 [(m+2H)/2]^+$ ; 1026,5  $[m+H]^+$ ; 1048,5  $[m+Na]^+$ .

### Acryloyl-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDyK-) (AC<sup>y</sup>I)

(C<sub>50</sub>H<sub>80</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>, Exact Mass: 1040,6)

50 mg **Z6\*** werden nach AAV 10 mit **A2** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10-80; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 13 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 60%): 13,51 min;

**ESI-MS**  $m/z = 451,1 [(m+2H)/2]^+$ ; 900,6  $[m+H]^+$ .

### Pent-4-enoyl-Ahx-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDy{I}K-) (AC<sup>y</sup>I2)

(C<sub>50</sub>H<sub>79</sub>N<sub>12</sub>O<sub>12</sub>, Exact Mass: 1166,5)

50 mg **Z5\*** werden nach AAV 10 mit Pent-4-enoyl-Ahx-Ahx-Ahx-OH gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (20-60; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 17 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (5 – 60%): 19,65 min;

**ESI-MS**  $m/z = 584,7 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1167,6 [m+H]^+$ .

### **Pent-4-enoyl-Ahx-Ahx-Ahx-cyclo(-RGDyK-) (ACy2)**

( $C_{50}H_{80}N_{12}O_{12}$ , Exact Mass: 1040,6)

46 mg **Z6\*** werden nach AAV 10 mit Pent-4-enoyl-Ahx-Ahx-Ahx-OH gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (25-50; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 20 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (10 – 60%): 15,80 min;

**ESI-MS**  $m/z = 521,8 [(m+2H)/2]^+$ ;  $1041,8 [m+H]^+$ ;  $1063,8 [m+Na]^+$ ;  $1079,8 [m+K]^+$ .

### **cyclo(-RGDy{I}K)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PCy1)**

( $C_{75}H_{129}IN_{18}O_{30}P_4$ , Exact Mass: 2012,71)

52 mg **Z5\*** werden nach AAV 10 mit **P1\*** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10-35; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 4 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (5 – 50%): 17,98 min;

**ESI-MS**  $m/z = 1005,6 [(m-2H)/2]^-$ .

### **cyclo(-RGDyK)-Ahx-Ahx-Ahx-K-(K-PPA<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (PCy1)**

( $C_{75}H_{130}N_{18}O_{30}P_4$ , Exact Mass: 1886,82)

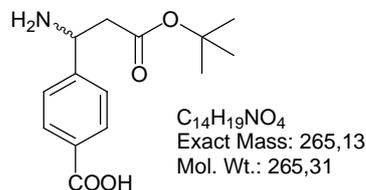
20 mg **Z6\*** werden nach AAV 10 mit **P1\*** gekuppelt. Nach der Aufarbeitung wird nach AAV 7b entschützt. HPLC-Reinigung (10-35; 30 min) und Lyophilisieren aus Dioxan führen zu 18 mg weißem Feststoff.

**HPLC** (5 – 50%): 15,19 min;

**ESI-MS**  $m/z = 942,9 [(m-2H)/2]^-$ ;  $954,8 [(m-3H+Na)/2]^-$ ;  $1885,9 [m-H]^-$ ;  $1909,9 [m-2H+Na]^-$ .

## 6.5 Arbeitsvorschriften RGD-Mimetika

### 3-Amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (24)



Eine Suspension aus 4,69 g (31,2 mmol) 4-Carboxybenzaldehyd **23**, 5,0 g (1 eq.) Mono-*tert*-butylmalonat und 4,81 g (2 eq.) Ammoniumacetat in 95 mL EtOH und 5 mL Wasser wird über Nacht unter Rückfluss gekocht. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit kaltem EtOH gewaschen und im Exikkator getrocknet (2,64 g, 32 %).

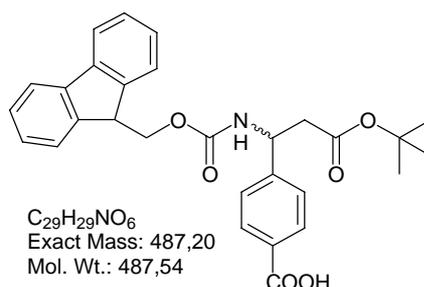
**Smp.** >300 °C (Zers.);

**HPLC** (20 – 80%): 8,2 min;

**ESI-MS**  $m/z = 209,9 [m-tBu+H]^+$ ; 265,9  $[m+H]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** ( $D_2O/LiOH$ , 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 7,85 (2H, d,  $J = 8,25$  Hz, Aromat); 7,43 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz, Aromat); 4,33 (1H, dd,  $J = 7,2$  Hz,  $CHNH_2$ ); 2,76 (2H, m,  $CH_2$ ); 1,29 (9H, s,  $OC(CH_3)_3$ ).

### 3-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester (25)



1,3 g (4,9 mmol) 3-Amino-3-(4-carboxyphenyl)-propionsäure-*tert*-butylester **24** werden in 15 mL THF und 15 mL gesättigter, wässriger  $NaHCO_3$ -Lösung suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Es werden unter Rühren 1,27 g (1 eq.) Fmoc-Cl in 7,5 mL THF gelöst zu getropft und über Nacht nachgerührt. Mit Natriumacetat-Puffer pH 3,5 wird der pH-Wert auf 4 eingestellt. Die geschützte Aminosäure wird mit Essigester extrahiert und die organische Phase dreimal mit wäss. HCl pH 3 und einmal mit Wasser gewaschen. Nach dem

## 6 Experimenteller Teil

Trocknen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des Lösungsmittels werden 2,2 g (92 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

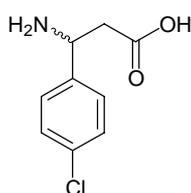
**Smp.** 59 – 60 °C;

**HPLC** (20 – 80%): 26,7 min;

**ESI-MS**  $m/z = 432,1 [m\text{-tBu+H}]^+$ ; 488,0  $[m+H]^+$ ; 510,2  $[m+Na]^+$ ; 997,0  $[2m+Na]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 12,22$  (1H, s, COOH); 8,10 – 7,29 (13H, m, <sup>Fmoc/Phc</sup>C-H, NH); 5,03 – 4,96 (1H, m, NHCH); 4,37 – 4,18 (3H, m, CHCH<sub>2</sub>O); 2,68 (2H, m, CH<sub>2</sub>COO); 1,30 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### 3-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (27)



C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>ClNO<sub>2</sub>  
Exact Mass: 199,04  
Mol. Wt.: 199,63

Eine Suspension aus 7,03 g (50 mmol) 4-Chlorbenzaldehyd **26**, 5,2 g (1 eq.) Malonsäure und 7,2 g (2 eq.) Ammoniumacetat in 95 mL EtOH und 5 mL Wasser wird über Nacht unter Rückfluss gekocht. Das ausgefallene Produkt wird abfiltriert, mit kaltem EtOH gewaschen und im Exikkator getrocknet (7,84 g, 79 %)

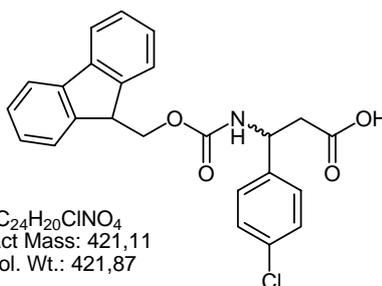
**Smp.** 219 – 221 °C;

**HPLC** (10 – 80%): 9,8 min;

**ESI-MS**  $m/z = 200,0 [m+H]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 250 MHz):  $\delta(\text{ppm}) = 7,49 - 7,33$  (4H, m, <sup>Phc</sup>C-H); 4,60 (1H, t, J = 8,1 Hz, CH); 3,54 (1H, d, J = 8,4 Hz, CH<sub>2</sub>); 2,80 (1H, d, J = 8,1 Hz, CH<sub>2</sub>).

### 3-(9H-Fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure (28)



C<sub>24</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub>  
Exact Mass: 421,11  
Mol. Wt.: 421,87

## 6 Experimenteller Teil

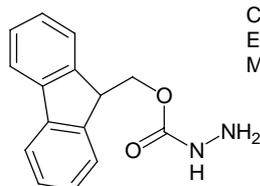
0,91 g (4,6 mmol) 3-Amino-3-(4-chlorphenyl)-propionsäure **27** werden in 15 mL THF und 15 mL gesättigter, wässriger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung suspendiert und auf 0 °C abgekühlt. Es werden unter Rühren 1,19 g (1 eq.) Fmoc-Cl in 7,5 mL THF gelöst zugetropft und über Nacht nachgerührt. Mit Natriumacetat-Puffer pH 3,5 wird der pH-Wert auf 4 eingestellt. Die geschützte Aminosäure wird mit Essigester extrahiert und die organische Phase dreimal mit wäss. HCl pH 3 und einmal mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocken mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Abziehen des Lösungsmittels werden 1,93 g (91 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

**HPLC** (10 – 80%): 25,8 min;

**ESI-MS** m/z = 422,4 [m+H]<sup>+</sup>; 444,4 [m+Na]<sup>+</sup>; 865,0 [2m+Na]<sup>+</sup>; 881,2 [2m+K]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz): δ(ppm) = 12,30 (1H, bs, COOH); 7,93 (1H, d, J = 7,4 Hz, NH); 7,88 (2H, d, J = 7,5 Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,67 (2H, d, J = 7,5 Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,38 – 7,21 (8H, m, <sup>Fmoc/Phe</sup>CH); 4,91 (1H, dt, NHCH); 4,26 – 4,12 (3H, m, CHCH<sub>2</sub>O); 2,76 – 2,56 (2H, m, CH<sub>2</sub>CO).

### 9H-Fluoren-9-ylmethylcarbazat (**29**)



C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Exact Mass: 254,11  
Mol. Wt.: 254,28

5,0 g (37,8 mmol) Hydrazinoameisensäure-*tert*-butylester und 7,9 mL (1,2 eq.) werden in 50 mL abs. THF gelöst. Portionsweise werden 9,78 g (1,0 eq.) Fmoc-Cl hinzugefügt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wird der weiße Niederschlag abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 mL TFA / DCM (1:1) aufgenommen und 30 Minuten gerührt. Danach wird das Lösungsmittel vollständig entfernt und der erhaltene Feststoff in 200 mL Essigester aufgenommen, dreimal mit 100 mL 10 %iger wäss. NaHCO<sub>3</sub> und einmal mit ges. wäss. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Es werden 8,65 g (90 %) weißer Feststoff erhalten.

**Smp.** 168 – 171 °C (Zers.);

**HPLC** (10 – 90%): 16,89 min;

**ESI-MS** m/z = 179,2 [Fmoc-CO<sub>2</sub>+H]<sup>+</sup>; 295,1 [m+H<sub>2</sub>O+Na]<sup>+</sup>; 317,2 [m-H+H<sub>2</sub>O+2Na]<sup>+</sup>; 357,7 [m-2H+2H<sub>2</sub>O+3Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O/LiOH, 250 MHz): δ(ppm) = 8,34 (1H, bs, NH); 7,88 (2H, d, J = 7,3 Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,68 (2H, d, J = 7,3 Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,41 (2H, t, J = 7,3 Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 7,31 (2H, t, J = 7,3 Hz, <sup>Fmoc</sup>CH); 4,28 – 4,20 (3H, m, CHCH<sub>2</sub>); 4,06 (2H, bs, NH<sub>2</sub>).

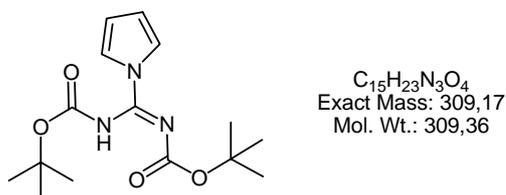
### 5-(9*H*-Fluoren-9-ylmethoxy)-3*H*-[1,3,4]oxadiazol-2-on (30)



Eine Suspension aus **29** (0,33 g, 1,28 mmol) in 25 mL DCM / gesättigter wäss. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (1/1) wird im Eisbad auf 0 °C gekühlt und 5 Minuten kräftig gerührt. Danach wird ca. 5 Minuten auf die Phasentrennung gewartet und 2,0 mL Phosgen (1,9 M in Toluol (ca. 20 %ig), 3,0 eq.) werden in die organische Phase eingespritzt. Es wird 10 Minuten nachgerührt, anschließend die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase zweimal mit wenig DCM gewaschen und die vereinigten organischen Phasen über NaSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Es werden 0,34 g (94 %) eines weißen Feststoffs erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7,75 (2H, m, <sup>Ar</sup>C<sup>5</sup>-H); 7,59 (2H, m, <sup>Ar</sup>C<sup>2</sup>-H); 7,35 (4H, m, <sup>Ar</sup>C<sup>3,4</sup>-H); 4,49 (1H, t, J = 7,4 Hz, CH); 4,38 (2H, d, J = 6.6 Hz, CH<sub>2</sub>).

### *N,N*-Bis-Boc-1*H*-pyrazol-1-carbonsäureamidin (31)



Zu einer Lösung aus 10 g (69 mmol) Pyrazol-1-carbonsäureamidin Hydrochlorid und 29 mL Triethylamin in 90 mL Dichlormethan werden unter Kühlung 16,6 g (1,1 eq.) Di-*tert.*-butyldicarbonat in 18 mL Dichlormethan innerhalb von 30 min. zugetropft. Anschließend wird 21 h bei RT nachgerührt. Nach der Zugabe von 100 mL Wasser werden die Phasen getrennt, die org. Phase dreimal mit Wasser gewaschen und mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Abzug des Lösungsmittels erhält man 13,0 g (89,5 %) weiße Kristalle.

Zu einer Suspension von 6 g (2,4 eq.) NaH 60 % in 70 mL trockenem THF werden unter Argonatmosphäre 13,0 g (62 mmol) *N*-Boc-pyrazol-1-carbonsäureamidin in 45 mL trockenem THF bei 0 °C zugetropft. Es werden 5 min. bei 0 °C und 20 min. bei RT nachgerührt. Anschließend werden 15,0 g (1,1 eq.) Di-*tert.*-butyldicarbonat in 300 mL trockenem THF langsam zugetropft. Die sich bildende Suspension wird anschließend 4 h refluxiert und nach Abkühlen auf 0 °C mit 60 mL Eisessig versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und die gelbe Lösung mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf pH 8 eingestellt. Nach 20 min werden 200 mL Wasser zugegeben und die Phasen getrennt. Die wäss. Phase wird zweimal mit Ether extrahiert.

## 6 Experimenteller Teil

Die vereinigten org. Phasen werden mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Abzug des Lösungsmittels wird der Rückstand chromatographisch gereinigt (Eluent: Hexan / EtOAc, 2 / 1). Es werden 13,0 g (67,7 %) weiße Kristalle erhalten.

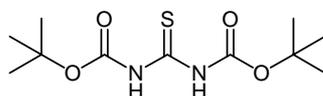
**Smp.** 87,9 °C;

**HPLC** (10 – 90%): 26,24 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 155,0 [m-tBu-Boc+H]<sup>+</sup>; 210,9 [m-Boc+H]<sup>+</sup>; 254,9 [m-tBu+Na]<sup>+</sup>; 311,0 [m+H]<sup>+</sup>; 333,0 [m+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 8,93 (1H, s, NH); 8,33 (1H, d,  $J$  = 2,7 Hz, NCH); 7,64 (1H, m, NCH); 6,43 (2H, m, NCHCH); 1,57 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); 1,52 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

### ***N,N'*-Bis-Boc-thioharnstoff (32)**



$\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$   
Exact Mass: 276,11  
Mol. Wt.: 276,35

1,0 g (13,2 mmol) Thioharnstoff werden in 600 mL trockenem THF gelöst. Bei 0 °C werden 2,4 g (4,5 eq.) Natriumhydrid 60 % zugegeben, anschließend wird 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach erneutem Kühlen auf 0 °C werden 6,0 g (2,1 eq.)  $\text{Boc}_2\text{O}$  zugegeben und die Lösung erst 30 Minuten bei 0 °C und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von 30 mL gesättigter  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und 500 mL Wasser wird dreimal mit je 200 mL Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 100 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und auf etwa 20 mL aufkonzentriert. Nach der Zugabe von 300 mL Hexan wird das Produkt über Nacht im Kühlschrank auskristallisiert. Es werden 2,8 g (78 %) weiße Kristalle erhalten.

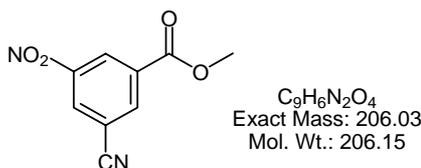
**Smp.** 128 – 130 °C;

**EI-MS**  $m/z$  = 57 [ $\text{C}_4\text{H}_9$ ]<sup>+</sup>; 76 [M-2Boc]<sup>+</sup>; 103 [M-Boc-OtBu]<sup>+</sup>; 176 [M-Boc]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 1,48 (18 H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR** ( $\text{CDCl}_3$ , 62,9 MHz):  $\delta$ (ppm) = 177,9 (CO); 150,4 (CS); 84,1 ( $\text{OCMe}_3$ ); 28,1 ( $\text{CH}_3$ ).

## 3-Cyano-5-nitro-benzoessäure-methylester (40)



Eine Lösung aus 5,48 g (24,3 mmol) Monomethyl-5-nitroisophtalat **33**, 2,81 g (1,2 eq.) Sulfamid, 4,4 mL (2,5 eq.) Thionylchlorid in 26,8 g Sulfolan wird 17 Stunden unter Rückfluss gekocht. Nach der Zugabe von weiteren 0,6 mL (0,57 eq.) Thionylchlorid wird nochmals 8,5 Stunden refluxiert, weitere 0,6 mL (0,57 eq.) Thionylchlorid zugegeben und 16 Stunden refluxiert. Nach dem Abkühlen wird die Reaktionsmischung in 200 mL Eiswasser gegossen und der Niederschlag abfiltriert. Nach dem Trocknen werden 4,71 g (94 %) gelbe Kristalle erhalten.

**Smp.** 123 – 126 °C;

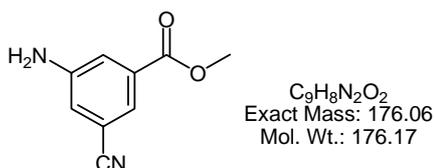
**HPLC** (20 – 80%): 19,67 min;

**EI-MS**  $m/z$  = 59,0 [COOMe]<sup>+</sup>; 75,0 [M-NO<sub>2</sub>-COOMe-CN]<sup>+</sup>; 101,0 [M-NO<sub>2</sub>-COOMe]<sup>+</sup>; 129,0 [M-NO<sub>2</sub>-OMe]<sup>+</sup>; 175,1 [M-OMe]<sup>+</sup>; 206,1 M<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 9,01 (1H, s, Aromat); 8,78 (1H, s, Aromat); 8,74 (1H, s, Aromat); 3,94 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (DMSO, 62,9 MHz):  $\delta$ (ppm) = 163,4 (COOMe); 138,4 (CNO<sub>2</sub>); 133,5, 130,7, 128,3 (<sup>Aromat</sup>C); 115,9 (CN); 114,7 (CCN); 53,6 (OCH<sub>3</sub>).

## 5-Amino-3-cyano-benzoessäure-methylester (41)



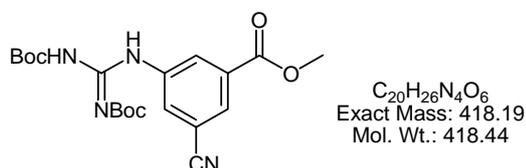
1,5 g (7,9 mmol) 3-Cyano-5-nitro-benzoessäure-methylester **40** werden mit 0,15 g Pd / C in 30 mL trockenem Methanol suspendiert und unter Wasserstoffatmosphäre 3 Tage gerührt. Der Katalysator wird über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wird an Kiesegel chromatographisch gereinigt (Essigester:Hexan 3:5). Es werden 0,90 g (70 %) gelber Feststoff erhalten.

**HPLC** (10 – 80%): 17,51 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 177,2 [m+H]<sup>+</sup>; 193,2 [m+Li]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 7,73 (1H, s, Aromat); 7,63 (1H, s, Aromat); 7,17 (1H, s, Aromat); 3,93 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>).

### 3-Cyano-5-(*N,N'*-bis-Boc)-guanidino-benzoesäure-methylester (42)

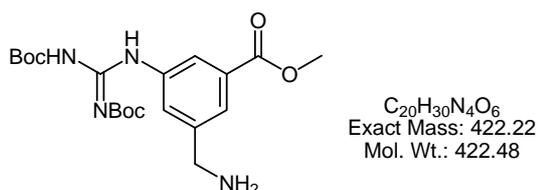


In 50 mL trockenem Methanol werden 0,5 g (2,84 mmol) 5-Amino-3-cyano-benzoesäure-methylester **41**, 0,76 g (1 eq.) *N,N'*-Bis-Boc-thioharnstoff **32** und 1,6 mL (4 eq.) Triethylamin gelöst. Bei 0 °C wird 1,0 g (1,3 eq.) Quecksilber(II)chlorid zugegeben. Sofort entsteht ein gelber Niederschlag, der mit der Zeit grau wird. Nach 12-tägigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktionsmischung über Celite gefiltert, mit Essigester nachgewaschen und auf ca. 1,5 g Kieselgel aufgezogen. Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel (Essigester:Hexan 1:3) werden 0,60 g (51 %) weißer Feststoff erhalten.

**ESI-MS**  $m/z$  = 219,3 [m-2Boc+H]<sup>+</sup>; 263,2 [m-tBu-Boc+H]<sup>+</sup>; 362,8 [m-tBu+H]<sup>+</sup>; 418,9 [m+H]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 11,58 (1H, s, NH); 10,64 (1H, s, NH); 8,55 (1H, s, Aromat); 8,41 (1H, s, Aromat); 8,01 (1H, s, Aromat); 3,93 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>); 1,51 (18H, m, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### 3-Aminomethyl-5-(*N,N'*-bis-Boc)-guanidino-benzoesäure-methylester (43)

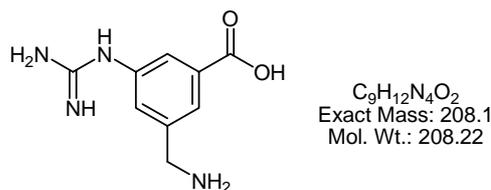


0,6 g (1,4 mmol) 3-Cyano-5-(*N,N'*-bis-Boc)-guanidino-benzoesäure-methylester **42** werden in 20 mL 2 M NH<sub>3</sub> in Ethanol gelöst. Nach der Zugabe von Pd /C wird für 6 h unter 20 bar Wasserstoffdruck bei 50 °C gerührt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingedunstet. Es bleiben 0,6 g Rückstand.

**HPLC** (10 – 90%): 11,15 min;

**ESI-MS**  $m/z$  = 223,3 [m-2Boc+H]<sup>+</sup>; 323,1 [m-Boc+H]<sup>+</sup>; 423,1 [m+H]<sup>+</sup>.

### 3-Aminomethyl-5-guanidino-benzoesäure (44)



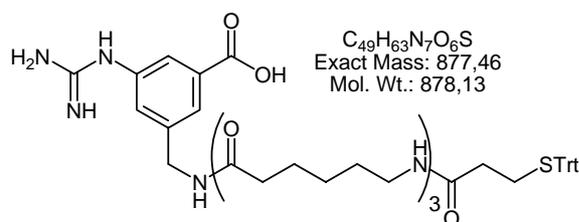
0,63 g (1,48 mmol) 3-Aminomethyl-5-(*N,N'*-bis-Boc)-guanidino-benzoesäure-methylester **43** werden mit 0,19 (3 eq.) LiOH·H<sub>2</sub>O in 20 mL Methanol und 20 mL Wasser über Nacht gerührt. Nach Abzug des Lösungsmittels wird der Rückstand in 20 mL 40 %iger wässriger TFA aufgenommen und 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel vollständig abgezogen. Der Rückstand wird präperativ HPLC-gereinigt (3-30, 30 min). Nach Lyophilisieren aus Dioxan werden 144 mg (47 %) Produkt erhalten.

**HPLC** (3 – 10%): 6,08 min;

**ESI-MS**  $m/z = 209,2 [m+H]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (D<sub>2</sub>O, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 8,02 (1H, s, Aromat); 7,96 (1H, s, Aromat); 7,63 (1H, s, Aromat); 4,32 (2H, s, CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).

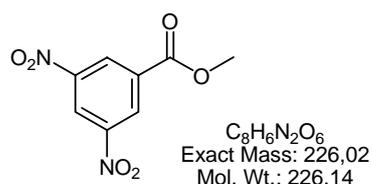
### 5-Guanidino-3-(3-(*S*-Trt)-Mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx)-aminomethylbenzoesäure (39)



108 mg MPA(Trt)-Ahx<sub>3</sub>-OH und 33 mg 3-Aminomethyl-5-guanidinobenzoesäure **44** werden nach AAV 10 gekuppelt. Das Säurefragment wird dazu 1,5 Stunden voraktiviert. Nach zwei Tagen wird die Reaktionsmischung ohne weitere Aufarbeitung für den nächsten Kupplungsschritt eingesetzt.

**ESI-MS**  $m/z = 878,5 [m+H]^+$ .

### 3-5-Dinitrobenzoesäuremethylester (46)



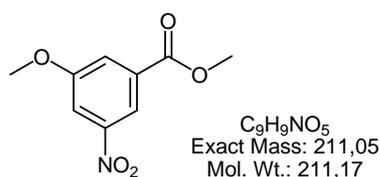
Zu einer Lösung aus 21 g (99 mmol) 3-5-Dinitrobenzoesäure **45** in 150 mL Methanol werden innerhalb von 10 min. 20 mL (6,4 eq.) Thionylchlorid zugetropft. Anschließend wird 2 h bei RT gerührt und 1 h refluxiert. Nach Abzug des Lösungsmittels wird der Rückstand in Essigester aufgenommen, einmal mit 10 %iger  $Na_2CO_3$ -Lsg., zweimal mit ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen und das Lösungsmittel abgezogen. Es werden 22 g (98 %) gelbe Kristalle erhalten.

**Smp.** 104 – 107 °C;

**HPLC** (10 – 90%): 22,31 min.

**$^1H$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 9,03 (1H, t,  $J = 2$  Hz,  $HC^4$ ); 8,90 (2H, d,  $J = 2$  Hz,  $HC^{2,6}$ ); 3,98 (3H, s,  $COOCH_3$ ).

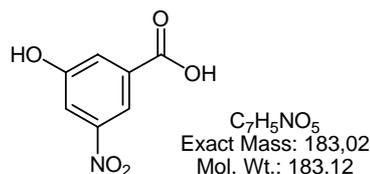
### 3-Methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester (47)



0,62 g (2 eq.) Lithium werden in 150 mL trockenem Methanol aufgelöst. Nach der Zugabe von 7,9 g (2 eq.) HMPT und 10 g (44,2 mmol) 3,5-Dinitrobenzoesäuremethylester **46** wird die Reaktionsmischung 4 h unter Argonatmosphäre refluxiert. Dabei verändert sich die Farbe von orange über rot zu schwarzrot. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in Essigester / Wasser aufgenommen und mit festem  $Na_2CO_3$  neutralisiert. Die organische Phase wird dreimal mit ges.  $NaHCO_3$ -Lsg. gewaschen. Es bleiben 4,9 g (52,5 %) Feststoff.

**$^1H$ -NMR** (DMSO, 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 8,21 (1H, t,  $J = 1,75$  Hz,  $HC^6$ ); 7,97 (1H, t,  $J = 2$  Hz,  $HC^4$ ); 7,82 (1H, m,  $HC^2$ ); 3,96 (3H, s,  $COOCH_3$ ); 3,91 (3H, s,  $COCH_3$ ).

### 3-Hydroxy-5-nitrobenzoesäure (48)



Zu einer refluxierenden Lösung von 4,8 g (22,7 mmol) 3-Methoxy-5-nitrobenzoesäuremethylester **47** in 40 mL Eisessig werden 100 mL wässrige 48 %ige Bromwasserstoffsäure gegeben und für weitere 22 h refluxiert. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Nach Abzug des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Kieselgel chromatographisch gereinigt (Eluent: EtOAc:Hexan 1:2 + 3 % HOAc). Es werden 2,0 g (48,1 %) eines gelben Feststoffs erhalten.

**Smp.** 185 – 187 °C;

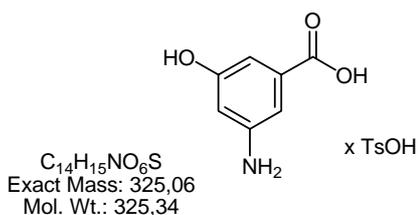
**HPLC** (10 – 90%): 14,49 min;

**EI-MS**  $m/z = 137 [M-NO_2]^+$ , 183  $M^+$ .

**$^1H$ -NMR** ( $CDCl_3$ , 250 MHz):  $\delta$ (ppm) = 13,5 (1H, bs, COOH); 10,8 (1H, bs, OH); 8,05 (1H, m,  $HC^6$ ); 7,72 (1H, t,  $J = 2,25$  Hz,  $HC^4$ ); 7,67 (1H, m,  $HC^3$ ).

**$^{13}C$ -NMR** (DMSO, 62.9 MHz):  $\delta$ (ppm) = 165,5 (COOH); 158,5 ( $C^3$ ); 148,8 ( $C^5$ ); 133,4 ( $C^1$ ); 122,2 ( $C^2$ ); 114,2 ( $C^6$ ); 113,6 ( $C^4$ ).

### 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure Hydrotosylat (49)



1,0 g (5,5 mmol) 3-Hydroxy-5-nitrobenzoesäure **48** werden in 30 mL trockenem Methanol und 30 mL trockenem  $CH_2Cl_2$  gelöst. Nach Zugabe von 1,03 g (1,0 eq.) *p*-Toluolsulfonsäure-monohydrat und 100 mg Pd/C wird für 2 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Normaldruck gerührt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen. Es werden 1,84 g (100 %) Feststoff erhalten.

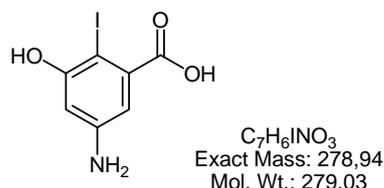
**Smp.** 224 – 226 °C;

**HPLC** (5 – 90%): 8,91 min;

**EI-MS** (+ TMSCl)  $m/z = 180 [M-COOTMS]^+$ ; 208  $[M-OTMS]^+$ ; 282  $[M-Me]^+$ ; 297  $M^+$ .

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz): δ(ppm) = 7,70 (2H, d, J = 8 Hz, HC<sup>2,6;TosOH</sup>); 7,49 – 7,46 (2H, m, HC<sup>2,6</sup>); 7,33 (2H, d, J = 7,75 Hz, HC<sup>3,5;TosOH</sup>); 7,12 (1H, t, J = 2 Hz, HC<sup>4</sup>); 2,03 (3H, s, H<sub>3</sub>C<sup>TosOH</sup>).

### 2-Iod-3-hydroxy-5-aminobenzoessäure (50)



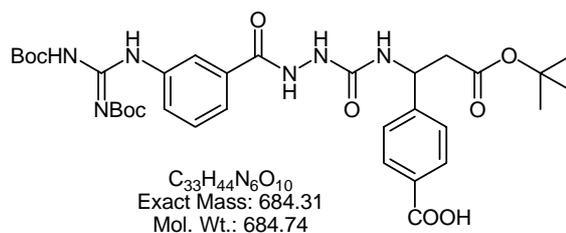
Zu einer Lösung von 0,50 g (1,5 mmol) 3-Ammonium-5-hydroxybenzoessäure *p*-Toluolsulfonat **49** und 230 mg Natriumjodid in 30 mL Wasser und 20 mL THF werden langsam 430 mg (1,0 eq.) Chloramin T zugegeben und anschließend für 80 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung auf ca. 10 mL wird der entstandene Niederschlag abfiltriert. Es werden 0,20 g (47,8 %) hellbraune Kristalle erhalten.

**Smp.** 120 – 121 °C;

**HPLC** (10 – 90%): 12,60 min;

**ESI-MS** m/z = 280,2 [m+H]<sup>+</sup>.

### 4-(2-{N-[N'-(3-(N,N'-Bis-Boc)-guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-*tert*-butoxycarbonyl)ethyl)-benzoessäure (M1\*)

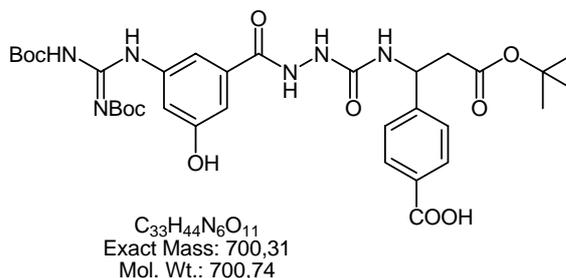


1,4 g TCP-Harz werden nach AAV 1 mit 0,75 mg **25** belegt. Die Fmoc-Entschützung des belegten Harzes nach AAV 9, Kupplung nach AAV 12, AAV 8 und AAV 13 führt nach der Abspaltung (AAV 4) zum Mimetikum **M1\*** (664 mg), das aus Dioxan lyophilisiert wird.

**HPLC** (10 – 80%): 25,56 min;

**ESI-MS** m/z = 429,2 [m-2Boc-tBu+H]<sup>+</sup>; 485,2 [m-2Boc+H]<sup>+</sup>; 585,2 [m-Boc+H]<sup>+</sup>; 685,2 [m+H]<sup>+</sup>; 707,2 [m+Na]<sup>+</sup>; 1369,1 [2m+H]<sup>+</sup>.

### 4-(2-{N-[N'-(3-(N,N'-Bis-Boc)-guanidino-5-hydroxy-benzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-*tert*-butoxycarbonylethyl)-benzoesäure (M2\*)

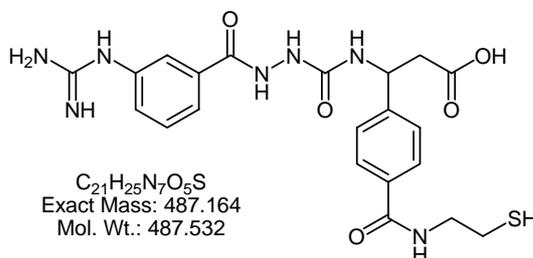


400 mg TCP-Harz werden nach AAV 1 mit 0,24 g **25** belegt. Die Fmoc-Entschützung des belegten Harzes nach AAV 9, Kupplung nach AAV 12, AAV 8 und AAV 13 führt nach der Abspaltung (AAV 4) zum Mimetikum **M2\***, das aus Dioxan lyophilisiert wird (91 mg).

**HPLC** (30 – 100%): 16,72 min;

**ESI-MS**  $m/z = 501,5 [m-2Boc+H]^+$ ;  $601,4 [m-Boc+H]^+$ ;  $701,3 [m+H]^+$ .

### 4-(2-{N-[N'-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-carboxyethyl)-benzoylcysteamin (MT1)



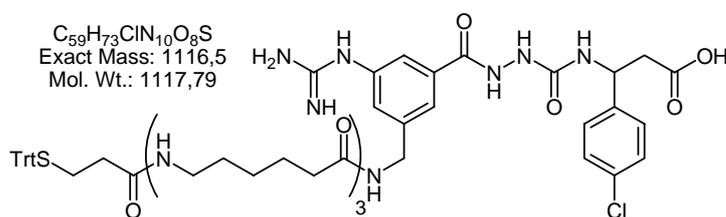
**M1\*** wird mit (*S*-Trt)-Cysteamin nach AAV 10 für zwei Tage gekuppelt. Anschließend wird nach AAV 7b entschützt, HPLC-gereinigt (10-32; 17 min) und aus Dioxan lyophilisiert.

**HPLC** (10 – 80 %): 9,4 min;

**ESI-MS**  $m/z = 488,2 [m+H]^+$ ;  $510,1 [m+Na]^+$ ;  $526,1 [m+K]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** ( $CD_3CN$ , 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 12,34 (1H, bs, COOH); 10,21 (1H, s,  $NHNHCONH$ ); 9,79 (1H, bs,  $^{Ar}C-NH$ ); 8,56 (1H, t,  $J = 5,1$  Hz,  $NHCH_2CH_2S$ ); 8,15 (1H, s,  $NHNHCONH$ ); 7,78 (2H, d,  $J = 8,3$  Hz,  $^{Phe}C^{2,6}-H$ ); 7,76 (1H, s,  $^{Ar}C^6-H$ ); 7,71 (1H, s,  $^{Ar}C^2-H$ ); 7,54 (1H, s,  $^{Ar}C^5-H$ ); 7,47 (3H, s,  $^{Gua}N_2H_3$ ); 7,42 (2H, d,  $J = 8,3$  Hz,  $^{Phe}C^{3,5}-H$ ); 7,40 (1H, s,  $^{Ar}C^4-H$ ); 7,12 (1H, bs,  $NHCH$ ); 5,12 (1H, s,  $NHCH$ ); 2,93 (2H, m,  $CH_2CH_2S$ ); 2,75 (2H, m,  $CHCH_2$ ); 2,64 (2H, m,  $CH_2CH_2S$ ).

**3-{N-[N'-(3-Guanidino-5-(3-(S-Trt)-mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx-aminomethyl)benzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorophenyl)-propionsäure (MT2\*)**

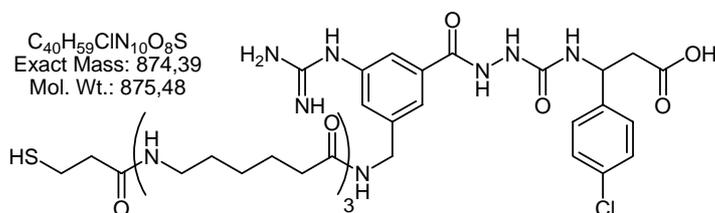


0,65 g TCP-Harz werden nach AAV 1 mit 185 mg **28** belegt. Der Fmoc-Entschützung des belegten Harzes nach AAV 9 folgt die Kupplung von azaGly nach AAV 12. Nach Fmoc-Entschützung wird die Reaktionslösung der Synthese von **39** mit 59 mg (1 eq.) HA-TU versetzt zugegeben. Die Kupplung erfolgt über Nacht. Das teilgeschützte Mimetikum **MT2\*** (206 mg) wird nach AAV 4b vom Harz abgespalten.

**HPLC** (10 – 60%): 16,66 min;

**ESI-MS**  $m/z = 875,6 [m\text{-Trt}+H]^+$ ;  $1117,5 [m+H]^+$ .

**3-{N-[N'-(3-Guanidino-5-(3-mercaptopropionyl-Ahx-Ahx-Ahx-aminomethyl)benzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-3-(4-chlorophenyl)-propionsäure (MT3)**



Das teilgeschützte Mimetikum **M2\*** wird in 16 mL DCM und 4 mL TFA aufgenommen. 0,1 mL TIPS dienen als *scavenger*. Nach 2 Stunden wird das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird HPLC-gereinigt (5-50; 30 min) und aus Dioxan lyophilisiert.

**HPLC** (10 – 80%): 14,8 min;

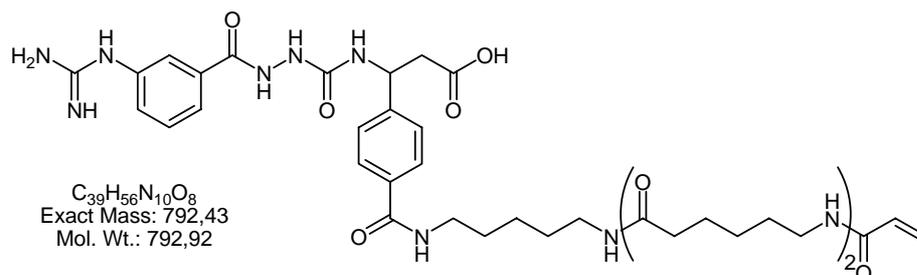
**ESI-MS**  $m/z = 875,4 [m+H]^+$ ;  $897,3 [m+Na]^+$ ;  $913,2 [m+K]^+$ .

**<sup>1</sup>H-NMR** (DMSO, 500 MHz):  $\delta$ (ppm) = 12,29 (1H, bs, COOH); 10,16 (1H, s, NHNHCONH); 9,78 (1H, s, <sup>Ar</sup>C-NH); 8,34 (1H, t,  $J = 5,9$  Hz, <sup>Ar</sup>C-CH<sub>2</sub>NH); 8,14 (1H, s, NHNHCONH); 7,83 (1H, t,  $J = 5,3$  Hz, NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH); 7,71 (2H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>); 7,63 (1H, s, <sup>Ar</sup>C<sup>6</sup>H); 7,56 (1H, s, <sup>Ar</sup>C<sup>2</sup>H); 7,45 (3H, s, <sup>Gua</sup>N<sub>2</sub>H<sub>3</sub>); 7,36 (4H, s, <sup>Phe</sup>C<sup>2,3,5,6</sup>H); 7,23 (1H, s, <sup>Ar</sup>C<sup>4</sup>H); 7,03 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, NHCH); 5,05 (1H, d,  $J =$

## 6 Experimenteller Teil

7,6 Hz, NHCH); 4,29 (2H, d, J = 5,8 Hz, ArC-CHNH); 3,01 (6H, m, CH<sub>2</sub>NHCO); 2,72 (2H, m, CH<sub>2</sub>-COOH); 2,63 (2H, q, J = 7,3 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH); 2,34 (2H, t, J = 6,9 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH); 2,13 (2H, t, J = 7,4 Hz, <sup>Ar</sup>C-CH<sub>2</sub>NHCOCH<sub>2</sub>); 2,01 (4H, t, J = 7,2 Hz, NHCOCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>); 1,53 – 1,19 (18H, m, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>).

### 4-(2-{N-[N-(3-Guanidinobenzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-carboxyethyl)-benzoyl-diaminopentyl-Ahx-Ahx-Acryloyl (MA1)

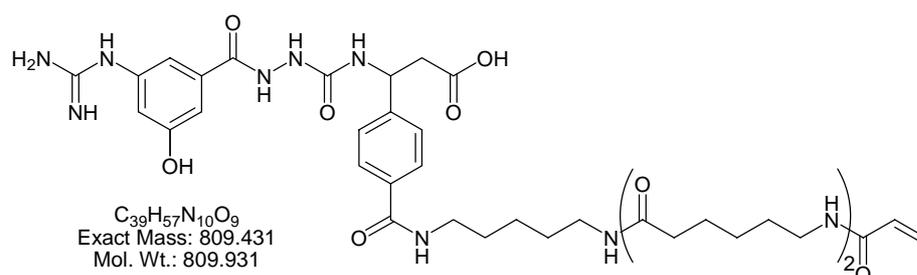


**MA1** resultiert nach AAV 10 aus 100 mg **M1\*** und **A3**. Nach 2 Tagen Rühren bei RT erfolgt die Aufarbeitung und die Entschützung mit 50 % TFA in DCM für 1,5 h. Anschließend wird das Produkt HPLC-gereinigt (15-60; 30 min). Es werden 5 mg erhalten.

**HPLC** (10 – 60%): 14,53 min;

**ESI-MS** m/z = 368,6 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 793,5 [m+H]<sup>+</sup>; 815,5 [m+Na]<sup>+</sup>.

### 4-(2-{N-[N-(3-Guanidino-5-hydroxy-benzoyl)-hydrazino]-carbonyl}-amino-1-carboxyethyl)-benzoyl-diaminopentyl-Ahx-Ahx-Acryloyl (MA2)



**MA2** resultiert nach AAV 10 aus 146 mg **M2\*** und **A3**. Nach 24 h Rühren bei RT erfolgt die Aufarbeitung und die Entschützung mit 50 % TFA in DCM für 1,5 h. Anschließend wird das Produkt HPLC-gereinigt (15-60; 30 min). Es werden 40 mg erhalten.

**HPLC** (10 – 50%): 14,78 min;

**ESI-MS** m/z = 405,6 [(m+2H)/2]<sup>+</sup>; 809,5 [m+H]<sup>+</sup>; 831,4 [m+Na]<sup>+</sup>; 847,3 [m+K]<sup>+</sup>.

### 6.6 Zelladhäsionstests

#### Herstellung der PMMA-Plättchen

Die PMMA-Plättchen werden aus Palacos R<sup>®</sup> Knochenzement der Firma *Merck* hergestellt. Eine Ampulle (20 mL) Monomer wird in einem Becherglas vorgelegt und der Inhalt eines Beutels (20 g) Polymer wird zügig untergerührt. Die Masse wird 30 s bis zu einer zähen Konsistenz gerührt. Mit einem Spatel wird die Masse in die Probenform (Stahlplatte mit 94 Vertiefungen, 3 mm hoch, Ø 10 mm) eingebracht. Die Palacosmasse wird auf beiden Seiten mit Teflonfolie geschützt und 2 h bei einem Druck von 20 bar gepresst. Anschließend werden die ausgehärteten Plättchen mit Hammer und Stößel aus der Form geschlagen und entgratet.

#### Beschichtung der PMMA-Plättchen

Die PMMA-Plättchen werden mit PBS pH 7,4 gewaschen. Die Beschichtungslösungen werden durch Verdünnen einer frischen, 1,0 mM Lösung des Peptids in DMSO (HPLC grade) mit *i*PrOH (HPLC grade) hergestellt. Von diesen Beschichtungslösungen werden 20 µL je Plättchen aufgebracht und die Proben anschließend für 2 h bei 254 nm bestrahlt. Danach werden die Proben mit 300 µL PBS pH 7,4 überschichtet und 12 h gelagert. Vor Aufbringen der Zellen werden die Plättchen noch dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen.

#### Beschichtung der Titan-Plättchen

Die Titanplättchen werden mit dest. Wasser gewaschen. Die Beschichtungslösungen werden durch Verdünnen einer frischen, 1,0 mM Lösung des Peptids in DMSO (HPLC grade) mit PBS pH 7,4 hergestellt. Von diesen Beschichtungslösungen werden 250 µL je Plättchen aufgebracht und die Proben anschließend über Nacht gelagert. Danach werden die Proben dreimal mit PBS pH 7,4 gewaschen.

#### Zelladhäsionstest mit MC3T3-E1-Mausosteoblasten

Um eine unspezifische Zellbindung zu verhindern, werden die Plättchen mit 5 % (w / v) BSA in PBS 90 min bei 37 °C geblockt. Die Zellen werden mit sterilem PBS gewaschen, mit Trypsin / EDTA abgelöst und anschließend 10 min bei 200 x g, 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden in Kulturmedium resuspen-

## 6 Experimenteller Teil

---

diert. Zur Feststellung der Zellzahl wird ein Aliquot Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau (0,5 %) 1 : 1 versetzt und in einer Neubauerkammer ausgezählt. Die Zellzahl wird nach erneuter Zentrifugation mit Zellanhaftungspuffer (1 % (w / v) BSA im Kulturmedium der jeweiligen Zellen, ohne FCS) auf  $5 \cdot 10^5$  Zellen / mL eingestellt. Die geblockten Plättchen werden noch einmal gewaschen und anschließend werden  $5 \cdot 10^5$  Zellen pro Vertiefung vorsichtig einpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, wird vorsichtig mit PBS pH 7,4 gewaschen und 250 µL Substratlösung (7,5 mM *p*-Nitrophenol-*N*-acetyl-β-D-glucosamin, 0,05 % (v / v) TWEEN-20 in 0,1 M CP-Puffer pH 5,0) und 250 µL PBS pH 7,4 hinzupipettiert. Anschließend wird für 2 h bei 37 °C inkubiert und danach die Umsetzung durch die Zugabe von 100 µL 5 mM EDTA in 0,2 M NaOH gestoppt. Zur Messung der Farbintensität werden 100 µL in eine 96-well-Platte transferiert und bei 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Als Nullwert dienen unbeschichtete Vertiefungen. Parallel wird zur Ermittlung der direkten Zellzahl eine Kallibrierkurve erstellt. Aus der Zellsuspension wird eine Verdünnungsreihe erstellt und ebenfalls 1 h bei 37 °C inkubiert, mit Substratlösung versetzt und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert.



# 7 Literatur

- [1] D. Adam. What's in a name? *Nature* **2001**, 411(6836), 408-409.
- [2] P. Smaglik. 'Quiet revolution' in chemistry could revive public and private sectors. *Nature* **2000**, 406(6797), 807-808.
- [3] E. K. Sinner, W. Knoll. Functional tethered membranes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5(6), 705-711.
- [4] H. Hillebrandt, M. Tanaka, E. Sackmann. A novel membrane charge sensor: Sensitive detection of surface charge at polymer/lipid composite films on indium tin oxide electrodes. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106(2), 477-486.
- [5] A. Förtig, R. Jordan, O. Purrucker, M. Tanaka, in *225th ACS National Meeting*, New Orleans, LA, USA, **2003**, p. POLY213.
- [6] O. Purrucker, E. Sackmann, M. Tanaka. Comment on supported lipid membrane on semiconductor electrode. *Mater. Chem. Phys.* **2003**, 78(1), 22-24.
- [7] J. M. Seeger, N. Klingman. Improved Endothelial Cell Seeding with Cultured-Cells and Fibronectin-Coated Grafts. *J. Surg. Res.* **1985**, 38(6), 641-647.
- [8] J. M. Sentissi, K. Ramberg, T. F. Odonnell, R. J. Connolly, A. D. Callow. The Effect of Flow on Vascular Endothelial-Cells Grown in Tissue-Culture on Polytetrafluoroethylene Grafts. *Surgery* **1986**, 99(3), 337-343.
- [9] J. Kaehler, P. Zilla, R. Fasol, M. Deutsch, M. Kadletz. Precoating Substrate and Surface Configuration Determine Adherence and Spreading of Seeded Endothelial-Cells on Polytetrafluoroethylene Grafts. *J. Vasc. Surg.* **1989**, 9(4), 535-541.
- [10] M. L. Cooper, J. F. Hansbrough, T. J. Foreman. Invitro Effects of Matrix Peptides on a Cultured Dermal Epidermal Skin Substitute. *J. Surg. Res.* **1990**, 48(6), 528-533.
- [11] T. Miyata, M. S. Conte, L. A. Trudell, D. Mason, A. D. Whittmore, L. K. Birinyi. Delayed Exposure to Pulsatile Shear-Stress Improves Retention of Human Saphenous-Vein Endothelial-Cells on Seeded Eptfe Grafts. *J. Surg. Res.* **1991**, 50(5), 485-493.
- [12] R. Vohra, G. J. L. Thomson, H. M. H. Carr, H. Sharma, M. G. Walker. Comparison of Different Vascular Prostheses and Matrices in Relation to Endothelial Seeding. *Br. J. Surg.* **1991**, 78(4), 417-420.
- [13] G. J. L. Thomson, R. K. Vohra, M. H. Carr, M. G. Walker. Adult Human Endothelial-Cell Seeding Using Expanded Polytetrafluoroethylene Vascular Grafts - a Comparison of 4 Substrates. *Surgery* **1991**, 109(1), 20-27.

- [14] J. M. Li, M. J. Menconi, H. B. Wheeler, M. J. Rohrer, V. A. Klassen, J. E. Ansell, M. C. Appel, J. Cronenwett. Precoating Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts Alters Production of Endothelial-Cell Derived Thrombomodulators. *J. Vasc. Surg.* **1992**, *15*(6), 1010-1017.
- [15] J. J. Grzesiak, M. D. Pierschbacher, M. F. Amodeo, T. I. Malaney, J. R. Glass. Enhancement of cell interactions with collagen/glycosaminoglycan matrices by RGD derivatization. *Biomaterials* **1997**, *18*(24), 1625-1632.
- [16] J. L. Myles, B. T. Burgess, R. B. Dickinson. Modification of the adhesive properties of collagen by covalent grafting with RGD peptides. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2000**, *11*(1), 69-86.
- [17] B. T. Burgess, J. L. Myles, R. B. Dickinson. Quantitative analysis of adhesion-mediated cell migration in three-dimensional gels of RGD-grafted collagen. *Ann. Biomed. Eng.* **2000**, *28*(1), 110-118.
- [18] K. E. Healy, A. Rezania, R. A. Stile. Designing biomaterials to direct biological responses. *Ann. NY Acad. Sci.* **1999**, *875*, 24-35.
- [19] W. J. Kao, J. A. Hubbell, J. M. Anderson. Protein-mediated macrophage adhesion and activation on biomaterials: a model for modulating cell behavior. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*(10/11), 601-605.
- [20] W. J. Kao, D. Lee, J. C. Schense, J. A. Hubbell. Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: the role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*(1), 79-88.
- [21] R. A. Stile, K. E. Healy. Thermo-responsive peptide-modified hydrogels for tissue regeneration. *Biomacromolecules* **2001**, *2*(1), 185-194.
- [22] A. Wierzbka, U. Reichl, R. F. B. Turner, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn. Production and Properties of a Bifunctional Fusion Protein That Mediates Attachment of Vero Cells to Cellulosic Matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *47*(2), 147-154.
- [23] A. Wierzbka, U. Reichl, R. F. B. Turner, R. A. J. Warren, D. G. Kilburn. Adhesion of Mammalian-Cells to a Recombinant Attachment Factor, Cbd/Rgd, Analyzed by Image-Analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46*(3), 185-193.
- [24] J. J. Marler, A. Guha, J. Rowley, R. Koka, D. Mooney, J. Upton, J. P. Vacanti. Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts. *Plast. Reconstr. Res.* **2000**, *105*(6), 2049-2058.
- [25] C. Neidlinger-Wilke, E. S. Grood, J. H. C. Wang, R. A. Brand, L. Claes. Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J. Orthop. Res.* **2001**, *19*(2), 286-293.
- [26] D. Delforge, B. Gillon, M. Art, J. Dewelle, M. Raes, J. Remacle. Design of a synthetic adhesion protein by grafting RGD tailed cyclic peptides on bovine serum albumin. *Lett. Pept. Sci.* **1998**, *5*(2-3), 87-91.
- [27] S. P. Massia, J. A. Hubbell. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Anal. Biochem.* **1990**, *187*(2), 292-301.
- [28] S. P. Massia, J. A. Hubbell. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin  $\alpha v\beta 3$ -mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J. Cell Biol.* **1991**, *114*(5), 1089-1100.
- [29] M. Kantlehner, D. Finsinger, J. Meyer, P. Schaffner, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, H. Kessler. Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*(4), 560-562.
- [30] M. Kantlehner, P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Hölzemann, S. L. Goodman, H. Kessler. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *ChemBioChem* **2000**, *1*(2), 107-114.
- [31] S. P. Massia, J. Stark. Immobilized RGD peptides on surface-grafted dextran promote bio-specific cell attachment. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56*(3), 390-399.
- [32] J. Marchand-Brynaert, E. Detrait, O. Noiset, T. Boxus, Y. J. Schneider, C. Remacle. Biological evaluation of RGD peptidomimetics, designed for the covalent derivatization of cell culture substrata, as potential promoters of cellular adhesion. *Biomaterials* **1999**, *20*(19), 1773-1782.
- [33] J. A. Hubbell. Biomaterials in tissue engineering. *Biotechnology (N Y)* **1995**, *13*(6), 565-576.

- [34] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* **2003**, 24(24), 4385-4415.
- [35] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **1984**, 309(5963), 30-33.
- [36] E. Ruoslahti. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, 12, 697-715.
- [37] F. G. Giancotti, F. Mainiero. Integrin-mediated adhesion and signaling in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1198(1), 47-64.
- [38] E. Noiri, J. Gailit, D. Sheth, H. Magazine, M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. S. Goligorsky. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int.* **1994**, 46(4), 1050-1058.
- [39] H. Le Breton, E. F. Plow, E. J. Topol. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1996**, 28(7), 1643-1651.
- [40] J. Samanen, Z. Jonak, D. Rieman, T. L. Yue. Vascular indications for integrin  $\alpha_v$  antagonists. *Curr. Pharm. Des.* **1997**, 3(6), 545-584.
- [41] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* **1986**, 44(4), 517-518.
- [42] E. Ruoslahti, M. D. Pierschbacher. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **1987**, 238(4826), 491-497.
- [43] M. Pfaff, Recognition Sites of RGD-Dependent Integrins, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 101-121.
- [44] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* **1991**, 291(1), 50-54.
- [45] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Muller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ,  $\alpha_V\beta_3$ , and  $\alpha_5\beta_1$  integrins. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269(32), 20233-20238.
- [46] J. S. Kerr, A. M. Slee, S. A. Mousa. Small molecule  $\alpha_v$ -integrin antagonists: novel anticancer agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, 9(6), 1271-1279.
- [47] G. D. Hartman, M. E. Duggan.  $\alpha_v\beta_3$  Integrin antagonists as inhibitors of bone resorption. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2000**, 9(6), 1281-1291.
- [48] G. Hölzemann. Recent advances in  $\alpha_v\beta_3$  integrin inhibitors. *IDrugs* **2001**, 4(1), 72-81.
- [49] S. M. Albelda, C. A. Buck. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **1990**, 4(11), 2868-2880.
- [50] J. Travis. Biotech gets a grip on cell adhesion. *Science* **1993**, 260(5110), 906-908.
- [51] M. J. Davies, A. C. Thomas. Plaque fissuring - the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br. Heart J.* **1985**, 53(4), 363-373.
- [52] D. C. Levin, J. T. Fallon. Significance of the angiographic morphology of localized coronary stenoses: histopathologic correlations. *Circulation* **1982**, 66(2), 316-320.
- [53] G. C. Brown, R. H. Brown, M. M. Brown. Peripheral proliferative retinopathies. *Int. Ophthalmol.* **1987**, 11(1), 41-50.
- [54] F. E. Ali, J. M. Samanen, R. J. Shebuski, Preparation of peptides as blood platelet aggregation inhibitors, **1989**, EP 341915 A2; CA Abstract Number 112:158983.
- [55] M. A. Horton, M. L. Taylor, T. R. Arnett, M. H. Helfrich. Arg-Gly-Asp (RGD) peptides and the anti-vitronectin receptor antibody 23C6 inhibit dentine resorption and cell spreading by osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **1991**, 195(2), 368-375.
- [56] D. T. Denhardt, X. Guo. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* **1993**, 7(15), 1475-1482.
- [57] M. Grano, P. Zigrino, S. Colucci, G. Zambonin, L. Trusolino, M. Serra, N. Baldini, A. Teti, P. C. Marchisio, A. Z. Zallone. Adhesion properties and integrin expression of cultured human osteoclast-like cells. *Exp. Cell Res.* **1994**, 212(2), 209-218.
- [58] N. S. Cook, G. Kottirsch, H.-G. Zerwes. Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Drugs of the Future* **1994**, 19, 135-159.

- [59] M. Chorev, R. Dresner-Pollak, Y. Eshel, M. Rosenblatt. Approach to discovering novel therapeutic agents for osteoporosis based on integrin receptor blockade. *Biopolymers* **1995**, 37(6), 367-375.
- [60] M. S. Goligorsky, H. Kessler, V. I. Romanov. Molecular mimicry of integrin ligation: therapeutic potential of arginine-glycine-aspartic acid (RGD) peptides. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1998**, 13(2), 254-263.
- [61] C. M. Storgard, D. G. Stupack, A. Jonczyk, S. L. Goodman, R. I. Fox, D. A. Cheresh. Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an  $\alpha v\beta 3$  antagonist. *J. Clin. Invest.* **1999**, 103(1), 47-54.
- [62] B. A. Molitoris, J. Marrs. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am. J. Med.* **1999**, 106(5), 583-592.
- [63] D. A. Hamerski, S. A. Santoro. Integrins and the kidney: biology and pathobiology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* **1999**, 8(1), 9-14.
- [64] H. Kikkawa, M. Kaihou, N. Horaguchi, T. Uchida, H. Imafuku, A. Takiguchi, Y. Yamazaki, C. Koike, R. Kuruto, T. Kakiuchi, H. Tsukada, Y. Takada, N. Matsuura, N. Oku. Role of integrin  $\alpha v\beta 3$  in the early phase of liver metastasis: PET and IVM analyses. *Clin. Exp. Metastasis* **2002**, 19(8), 717-725.
- [65] S. Biltresse, M. Attolini, J. Marchand-Brynaert. Cell adhesive PET membranes by surface grafting of RGD peptidomimetics. *Biomaterials* **2005**, 26(22), 4576-4587.
- [66] R. O. Hynes. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **1992**, 69(1), 11-25.
- [67] J. A. Eble, Integrins - A Versatile and Old Family of Cell Adhesion, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 1-40.
- [68] M. Takeichi. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, 59, 237-252.
- [69] M. Takeichi. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **1991**, 251(5000), 1451-1455.
- [70] A. F. Williams, A. N. Barclay. The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, 6, 381-405.
- [71] T. Hunkapiller, L. Hood. Diversity of the immunoglobulin gene superfamily. *Adv. Immunol.* **1989**, 44, 1-63.
- [72] M. Bevilacqua, E. Butcher, B. Furie, M. Gallatin, M. Gimbrone, J. Harlan, K. Kishimoto, L. Lasky, R. McEver, et al. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* **1991**, 67(2), 233.
- [73] S. Köpper. Anti-Adhäsionstherapie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1995**, 43(4), 421-427.
- [74] K. E. Gottschalk, H. Kessler. The structures of integrins and integrin-ligand complexes: implications for drug design and signal transduction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41(20), 3767-3774.
- [75] A. Howe, A. E. Aplin, S. K. Alahari, R. L. Juliano. Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, 10(2), 220-231.
- [76] E. A. Clark, J. S. Brugge. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **1995**, 268(5208), 233-239.
- [77] K. M. Yamada, S. Miyamoto. Integrin Transmembrane Signaling and Cytoskeletal Control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7(5), 681-689.
- [78] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti. Transduction - Integrin signaling. *Science* **1999**, 285(5430), 1028-1032.
- [79] K.-E. Gottschalk, R. Günther, H. Kessler. A three-state mechanism of integrin activation and signal transduction for integrin  $\alpha v\beta 3$ . *ChemBioChem* **2002**, 3(5), 470-473.
- [80] K. M. Yamada, B. Geiger. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, 9(1), 76-85.
- [81] M. A. Arnaout, S. L. Goodman, J. P. Xiong. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, 14(5), 641-651.
- [82] S. Dedhar. Integrins and signal transduction. *Curr. Opin. Hematol.* **1999**, 6(1), 37-43.
- [83] S. K. Akiyama, E. Hasegawa, T. Hasegawa, K. M. Yamada. The interaction of fibronectin fragments with fibroblastic cells. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260(24), 13256-13260.

- [84] E. M. Erb, K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Muller, J. Engel. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry* **1997**, *36*(24), 7395-7402.
- [85] S. A. Wilcox-Adelman, F. Denhez, P. F. Goetinck. Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*(36), 32970-32977.
- [86] A. van der Flier, A. Sonnenberg. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* **2001**, *305*(3), 285-298.
- [87] T. Velling, G. Collo, L. Sorokin, M. Durbeej, H. Zhang, D. Gullberg. Distinct  $\alpha$ 7A $\beta$ 1 and  $\alpha$ 7B $\beta$ 1 integrin expression patterns during mouse development:  $\alpha$ 7A is restricted to skeletal muscle but  $\alpha$ 7B is expressed in striated muscle, vasculature, and nervous system. *Dev. Dyn.* **1996**, *207*(4), 355-371.
- [88] C. Vinciguerra, J. C. Bordet, G. Beaune, C. Grenier, M. Dechavanne, C. Negrier. Description of 10 new mutations in platelet glycoprotein IIb ( $\alpha$ IIb) and glycoprotein IIIa ( $\beta$ 3) genes. *Platelets* **2001**, *12*(8), 486-495.
- [89] J. Emsley, C. G. Knight, R. W. Farndale, M. J. Barnes, R. C. Liddington. Structural basis of collagen recognition by integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1. *Cell* **2000**, *101*(1), 47-56.
- [90] S. K. Mitra, D. A. Hanson, D. D. Schlaepfer. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*(1), 56-68.
- [91] J. P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, M. A. Arnaout. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *Science* **2001**, *294*(5541), 339-345.
- [92] E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*(29), 21785-21788.
- [93] B. D. Adair, J. P. Xiong, C. Maddock, S. L. Goodman, M. A. Arnaout, M. Yeager. Three-dimensional EM structure of the ectodomain of integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3 in a complex with fibronectin. *J. Cell Biol.* **2005**, *168*(7), 1109-1118.
- [94] J. Bella, H. M. Berman. Integrin-collagen complex: a metal-glutamate handshake. *Structure Fold Des.* **2000**, *8*(6), R121-126.
- [95] D. E. Gullberg, E. Lundgren-Akerlund. Collagen-binding I domain integrins - what do they do? *Prog. Histochem. Cytochem.* **2002**, *37*(1), 3-54.
- [96] A. J. Reason, A. Dell, H. R. Morris, M. E. Rogers, J. J. Calvete, J. Gonzalez-Rodriguez. Characterisation of the N-linked oligosaccharides of the light chain of human glycoprotein IIb by FAB-MS. *Carbohydr. Res.* **1991**, *221*(1), 169-177.
- [97] T. Kawano, S. Takasaki, T. W. Tao, A. Kobata. Altered glycosylation of  $\beta$ 1 integrins associated with reduced adhesiveness to fibronectin and laminin. *Int. J. Cancer* **1993**, *53*(1), 91-96.
- [98] L. Moss, A. Prakobphol, T. W. Wiedmann, S. J. Fisher, C. H. Damsky. Glycosylation of human trophoblast integrins is stage and cell-type specific. *Glycobiology* **1994**, *4*(5), 567-575.
- [99] R. K. Pretzlaff, V. W. Xue, M. E. Rowin. Sialidase treatment exposes the  $\beta$ 1-integrin active ligand binding site on HL60 cells and increases binding to fibronectin. *Cell Adhes. Commun.* **2000**, *7*(6), 491-500.
- [100] A. C. Semel, E. C. Seales, A. Singhal, E. A. Eklund, K. J. Colley, S. L. Bellis. Hyposialylation of integrins stimulates the activity of myeloid fibronectin receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*(36), 32830-32836.
- [101] B. von Lampe, A. Stallmach, E. O. Riecken. Altered glycosylation of integrin adhesion molecules in colorectal cancer cells and decreased adhesion to the extracellular matrix. *Gut* **1993**, *34*(6), 829-836.
- [102] S. S. Veiga, R. Chammas, N. Cella, R. R. Brentani. Glycosylation of  $\beta$ 1 integrins in B16-F10 mouse melanoma cells as determinant of differential binding and acquisition of biological activity. *Int. J. Cancer.* **1995**, *61*(3), 420-424.
- [103] A. Litynska, M. Przybylo, D. Ksiazek, P. Laidler. Differences of  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin glycans from different human bladder cell lines. *Acta Biochim. Pol.* **2000**, *47*(2), 427-434.
- [104] V. W. Engleman, M. S. Kellogg, T. E. Rogers. Cell adhesion integrins as pharmaceutical targets. *Ann. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*(191-200).

- [105] J. F. Marshall, D. C. Rutherford, A. C. McCartney, F. Mitjans, S. L. Goodman, I. R. Hart.  $\alpha v\beta 1$  is a receptor for vitronectin and fibrinogen, and acts with  $\alpha 5\beta 1$  to mediate spreading on fibronectin. *J. Cell Sci.* **1995**, *108*(3), 1227-1238.
- [106] Y. Taooka, J. Chen, T. Yednock, D. Sheppard. The integrin  $\alpha 9\beta 1$  mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J. Cell Biol.* **1999**, *145*(2), 413-420.
- [107] S. T. Barry, S. B. Ludbrook, E. Murrison, C. M. Horgan. Analysis of the  $\alpha 4\beta 1$  integrin-osteopontin interaction. *Exp. Cell Res.* **2000**, *258*(2), 342-351.
- [108] N. Morimura, Y. Tezuka, N. Watanabe, M. Yasuda, S. Miyatani, N. Hozumi, K. Tezuka Ki. Molecular cloning of POEM: a novel adhesion molecule that interacts with  $\alpha 8\beta 1$  integrin. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*(45), 42172-42181.
- [109] R. Brandenberger, A. Schmidt, J. Linton, D. Wang, C. Backus, S. Denda, U. Müller, L. F. Reichardt. Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin alpha8beta1 in the embryonic kidney. *J. Cell Biol.* **2001**, *154*(2), 447-458.
- [110] E. Ruoslahti. The RGD story: a personal account. *Matrix Biol* **2003**, *22*(6), 459-465.
- [111] S. Aota, M. Nomizu, K. M. Yamada. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*(40), 24756-24761.
- [112] J. Y. Wong, Z. Weng, S. Moll, S. Kim, C. T. Brown. Identification and validation of a novel cell-recognition site (KNEED) on the 8th type III domain of fibronectin. *Biomaterials* **2002**, *23*(18), 3865-3870.
- [113] M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl. Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*(3), 911-921.
- [114] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha v\beta 3$  integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*(13-14), 1375-1389.
- [115] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler. Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin  $\alpha v\beta 3$  antagonists. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(32), 7461-7472.
- [116] C. M. Isacke, M. A. Horton, *The Adhesion Molecules Fact Book*, 2nd ed., Academic Press, London, **2000**.
- [117] D. Cox, T. Aoki, J. Seki, Y. Motoyama, K. Yoshida. The pharmacology of the integrins. *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*(2), 195-228.
- [118] J. Ivaska, J. Kapyla, O. Pentikainen, A. M. Hoffren, J. Hermonen, P. Huttunen, M. S. Johnson, J. Heino. A peptide inhibiting the collagen binding function of integrin  $\alpha 2 I$  domain. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(6), 3513-3521.
- [119] M. Nomizu, W. H. Kim, K. Yamamura, A. Utani, S. Y. Song, A. Otaka, P. P. Roller, H. K. Kleinman, Y. Yamada. Identification of cell binding sites in the laminin  $\alpha 1$  chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*(35), 20583-20590.
- [120] M. Mesri, J. Plescia, D. C. Altieri. Dual regulation of ligand binding by CD11b I domain. Inhibition of intercellular adhesion and monocyte procoagulant activity by a factor X-derived peptide. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*(2), 744-748.
- [121] C. Marcinkiewicz, Y. Taooka, Y. Yokosaki, J. J. Calvete, M. M. Marcinkiewicz, R. R. Lobb, S. Niewiarowski, D. Sheppard. Inhibitory effects of MLDG-containing heterodimeric disintegrins reveal distinct structural requirements for interaction of the integrin  $\alpha 9\beta 1$  with VCAM-1, tenascin-C, and osteopontin. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*(41), 31930-31937.
- [122] R. Alon, R. Hershkovich, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Lider. Streptavidin blocks immune reactions mediated by fibronectin-VLA-5 recognition through an Arg-Gly-Asp mimicking site. *Eur. J. Immunol.* **1993**, *23*(4), 893-898.
- [123] H. Sakamoto, T. Broekelmann, D. A. Cheresch, F. Ramirez, J. Rosenbloom, R. P. Mecham. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*(9), 4916-4922.

- [124] J. W. Smith, Z. M. Ruggeri, T. J. Kunicki, D. A. Cheresh. Interaction of integrins  $\alpha v\beta 3$  and glycoprotein IIb-IIIa with fibrinogen. Differential peptide recognition accounts for distinct binding sites. *J. Biol. Chem.* **1990**, 265(21), 12267-12271.
- [125] Y. Maeshima, U. L. Yerramalla, M. Dhanabal, K. A. Holthaus, S. Barbashov, S. Kharbanda, C. Reimer, M. Manfredi, W. M. Dickerson, R. Kalluri. Extracellular matrix-derived peptide binds to  $\alpha v\beta 3$  integrin and inhibits angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(34), 31959-31968.
- [126] K. Yokoyama, H. P. Erickson, Y. Ikeda, Y. Takada. Identification of amino acid sequences in fibrinogen gamma -chain and tenascin C C-terminal domains critical for binding to integrin  $\alpha v\beta 3$ . *J. Biol. Chem.* **2000**, 275(22), 16891-16898.
- [127] H. Nakahara, M. Nomizu, S. K. Akiyama, Y. Yamada, Y. Yeh, W. T. Chen. A mechanism for regulation of melanoma invasion. Ligation of  $\alpha 6\beta 1$  integrin by laminin G peptides. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(44), 27221-27224.
- [128] H. Li, N. Sampson. Structural analysis of fertilin  $\beta$  cyclic peptide mimics that are ligands for  $\alpha 6\beta 1$  integrin. *J. Pept. Res.* **2002**, 59(2), 45-54.
- [129] B. E. Vogel, S. J. Lee, A. Hildebrand, W. Craig, M. D. Pierschbacher, F. Wong-Staal, E. Ruoslahti. A novel integrin specificity exemplified by binding of the  $\alpha v\beta 5$  integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin. *J. Cell Biol.* **1993**, 121(2), 461-468.
- [130] U. Müller, B. Bossy, K. Venstrom, L. F. Reichardt. Integrin  $\alpha 8\beta 1$  promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. *Mol. Biol. Cell.* **1995**, 6(4), 433-448.
- [131] L. M. Schnapp, N. Hatch, D. M. Ramos, I. V. Klimanskaya, D. Sheppard, R. Pytela. The human integrin  $\alpha 8\beta 1$  functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(39), 23196-23202.
- [132] S. Denda, U. Müller, K. L. Crossin, H. P. Erickson, L. F. Reichardt. Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin  $\alpha 8\beta 1$  receptor interactions with tenascin: murine  $\alpha 8\beta 1$  binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C. *Biochemistry* **1998**, 37(16), 5464-5474.
- [133] P. I. Karecla, S. J. Green, S. J. Bowden, J. Coadwell, P. J. Kilshaw. Identification of a binding site for integrin  $\alpha E\beta 7$  in the N-terminal domain of E-cadherin. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271(48), 30909-30915.
- [134] C. G. Galbraith, K. M. Yamada, M. P. Sheetz. The relationship between force and focal complex development. *J. Cell Biol.* **2002**, 159(4), 695-705.
- [135] S. B. Hopkinson, K. Findlay, G. W. deHart, J. C. Jones. Interaction of BP180 (type XVII collagen) and  $\alpha 6$  integrin is necessary for stabilization of hemidesmosome structure. *J. Invest. Dermatol.* **1998**, 111(6), 1015-1022.
- [136] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Muller. Conformation of cyclic peptides. Principle concepts and the design of selectivity and superactivity in bioactive sequences by 'spatial screening'. *Pure and Applied Chemistry* **1996**, 68(6), 1201-1205.
- [137] M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler. N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective  $\alpha V\beta 3$  integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **1999**, 42(16), 3033-3040.
- [138] G. A. G. Sulyok. Parallelsynthese von Bibliotheken nichtpeptidischer  $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten für den Einsatz in Tumortherapie und -diagnostik. Dissertation, TU München (München), **2001**.
- [139] A. Meyer, J. Auernheimer, A. Modlinger, H. Kessler. Targeting RGD Recognizing Integrins: Drug Development, Biomaterial Research, Tumor Imaging and Targeting. *Curr. Pharm. Design* **2005**, in press.
- [140] R. Haubner. Design, Synthese und Konformationsanalyse biologisch aktiver und selektiver  $\alpha v\beta 3$ -Antagonisten. Dissertation, TU München (München), **1995**.
- [141] T. Weller, L. Alig, M. Beresini, B. Blackburn, S. Bunting, P. Hadvary, M. Hürzeler Müller, D. Knopp, B. Levet-Trafit, M. T. Lipari, N. B. Modi, M. Müller, C. J. Refino, M. Schmitt, P. Schonholzer, S. Weiss, B. Steiner. Orally active fibrinogen receptor antagonists. 2. Amidoximes as prodrugs of amidines. *J. Med. Chem.* **1996**, 39(16), 3139-3147.
- [142] C. A. Burnett, J. Xie, J. Quijano, Z. Shen, F. Hunter, M. Bur, K. C. P. Li, S. N. Danthi. Synthesis, in vitro, and in vivo characterization of an integrin  $\alpha v\beta 3$ -targeted molecular probe for optical imaging of tumor. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13(11), 3763-3771.

- [143] W. H. Miller, D. P. Alberts, P. K. Bhatnagar, W. E. Bondinell, J. F. Callahan, R. R. Calvo, R. D. Cousins, K. F. Erhard, D. A. Heerding, R. M. Keenan, C. Kwon, P. J. Manley, K. A. Newlander, S. T. Ross, J. M. Samanen, I. N. Uzinskas, J. W. Venslavsky, C. C. Yuan, R. C. Haltiwanger, M. Gowen, S. M. Hwang, I. E. James, M. W. Lark, D. J. Rieman, G. B. Stroup, L. M. Azzarano, K. L. Salyers, B. R. Smith, K. W. Ward, K. O. Johanson, W. F. Huffman. Discovery of orally active nonpeptide vitronectin receptor antagonists based on a 2-benzazepine Gly-Asp mimetic. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*(1), 22-26.
- [144] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, M. Semmrich, B. Holzmann, H. Kessler. Design and synthesis of potent and selective  $\alpha 4\beta 7$  integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*(16), 2586-2592.
- [145] M. W. Lark, G. B. Stroup, S. M. Hwang, I. E. James, D. J. Rieman, F. H. Drake, J. N. Bradbeer, A. Mathur, K. F. Erhard, K. A. Newlander, S. T. Ross, K. L. Salyers, B. R. Smith, W. H. Miller, W. F. Huffman, M. Gowen. Design and characterization of orally active Arg-Gly-Asp peptidomimetic vitronectin receptor antagonist SB 265123 for prevention of bone loss in osteoporosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *291*(2), 612-617.
- [146] P. A. Burke, S. J. DeNardo, L. A. Miers, K. R. Lamborn, S. Matzku, G. L. DeNardo. Cilengitide targeting of  $\alpha v\beta 3$  integrin receptor synergizes with radioimmunotherapy to increase efficacy and apoptosis in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* **2002**, *62*(15), 4263-4272.
- [147] B. S. Coller. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*(7), 1467-1471.
- [148] S. L. Goodman, G. Holzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler. Nanomolar small molecule inhibitors for  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 5$ , and  $\alpha v\beta 3$  integrins. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*(5), 1045-1051.
- [149] J. T. Yang, H. Rayburn, R. O. Hynes. Embryonic mesodermal defects in  $\alpha 5$  integrin-deficient mice. *Development* **1993**, *119*(4), 1093-1105.
- [150] D. Cue, S. O. Southern, P. J. Southern, J. Prabhakar, W. Lorelli, J. M. Smallheer, S. A. Mousa, P. P. Cleary. A nonpeptide integrin antagonist can inhibit epithelial cell ingestion of *Streptococcus pyogenes* by blocking formation of integrin  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin-M1 protein complexes. *PNAS* **2000**, *97*(6), 2858-2863.
- [151] D. Gottschling, J. Boer, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler. Combinatorial and rational strategies to develop nonpeptidic  $\alpha 4\beta 7$ -integrin antagonists from cyclic peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*(16), 3007-3011.
- [152] J. Boer, D. Gottschling, A. Schuster, B. Holzmann, H. Kessler. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of  $\alpha 4\beta 1$  Integrin Antagonists Based on  $\beta$ -D-Mannose as Rigid Scaffold. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(20), 3870-3873.
- [153] W. J. Pitts, J. Wityak, J. M. Smallheer, A. E. Tobin, J. W. Jetter, J. S. Buynitsky, P. P. Harlow, K. A. Solomon, M. H. Corjay, S. A. Mousa, R. R. Wexler, P. K. Jadhav. Isoxazolines as potent antagonists of the integrin  $\alpha v\beta 3$ . *J. Med. Chem.* **2000**, *43*(1), 27-40.
- [154] A. E. Adang, H. Lucas, A. P. de Man, R. A. Engh, P. D. Grootenhuis. Novel acylguanidine containing thrombin inhibitors with reduced basicity at the P1 moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*(24), 3603-3608.
- [155] L. Tranqui, A. Andrieux, G. Hudry-Clergeon, J. J. Ryckewaert, S. Soyez, A. Chapel, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, G. Marguerie. Differential structural requirements for fibrinogen binding to platelets and to endothelial cells. *J. Cell Biol.* **1989**, *108*(6), 2519-2527.
- [156] J. P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S. L. Goodman, M. A. Arnaout. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha v\beta 3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* **2002**, *296*(5565), 151-155.
- [157] B. B. Whitlock, S. Gardai, V. Fadok, D. Bratton, P. M. Henson. Differential roles for  $\alpha M\beta 2$  integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *J. Cell Biol.* **2000**, *151*(6), 1305-1320.
- [158] C. K. Miranti, J. S. Brugge. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat. Cell Biol.* **2002**, *4*(4), 83-90.
- [159] D. R. Phillips, I. F. Charo, R. M. Scarborough. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* **1991**, *65*(3), 359-362.

- [160] R. R. Hantgan, C. Paumi, M. Rocco, J. W. Weisel. Effects of ligand-mimetic peptides Arg-Gly-Asp-X (X = Phe, Trp, Ser) on  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin conformation and oligomerization. *Biochemistry* **1999**, 38(44), 14461-14474.
- [161] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **2002**, 110(5), 599-511.
- [162] J. H. Beer, K. T. Springer, B. S. Collier. Immobilized Arg-Gly-Asp (RGD) peptides of varying lengths as structural probes of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood* **1992**, 79(1), 117-128.
- [163] K. E. Gottschalk, P. D. Adams, A. T. Brunger, H. Kessler. Transmembrane signal transduction of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin. *Protein Sci.* **2002**, 11(7), 1800-1812.
- [164] R. J. Mehta, B. Diefenbach, A. Brown, E. Cullen, A. Jonczyk, D. Gussow, G. A. Luckenbach, S. L. Goodman. Transmembrane-truncated  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin retains high affinity for ligand binding: evidence for an 'inside-out' suppressor? *Biochem. J.* **1998**, 330(861-869).
- [165] M. Shimaoka, J. Takagi, T. A. Springer. Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2002**, 31, 485-516.
- [166] K. M. Yamada, S. Even-Ram. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat. Cell Biol.* **2002**, 4(4), 75-76.
- [167] A. Woods, J. R. Couchman. Syndecan-4 and focal adhesion function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, 13(5), 578-583.
- [168] B. Geiger, A. Bershadsky. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, 13(5), 584-592.
- [169] A. Rahman, Y. Tseng, D. Wirtz. Micromechanical coupling between cell surface receptors and RGD peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 296(3), 771-778.
- [170] R. L. Duncan, C. H. Turner. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* **1995**, 57(5), 344-358.
- [171] I. Owan, D. B. Burr, C. H. Turner, J. Qiu, Y. Tu, J. E. Onyia, R. L. Duncan. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am. J. Physiol.* **1997**, 273(3), 810-815.
- [172] D. M. Salter, S. J. Millward-Sadler, G. Nuki, M. O. Wright. Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2001**, 391, 49-60.
- [173] M. H. Ali, P. T. Schumacker. Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit. Care Med.* **2002**, 30(5), 198-206.
- [174] H. S. Lee, S. J. Millward-Sadler, M. O. Wright, G. Nuki, R. Al-Jamal, D. M. Salter. Activation of Integrin-RACK1/PKC $\alpha$  signalling in human articular chondrocyte mechanotransduction. *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, 10(11), 890-897.
- [175] G. Pande. The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, 12(5), 569-574.
- [176] S. P. Palecek, C. E. Schmidt, D. A. Lauffenburger, A. F. Horwitz. Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J. Cell Sci.* **1996**, 109(5), 941-952.
- [177] G. Schulze-Tanzil, P. de Souza, H. J. Merker, M. Shakibaei. Co-localization of integrins and matrix metalloproteinases in the extracellular matrix of chondrocyte cultures. *Histol. Histopathol.* **2001**, 16(4), 1081-1089.
- [178] F. Grinnell. Focal adhesion sites and the removal of substratum-bound fibronectin. *J. Cell Biol.* **1986**, 103(6), 2697-2706.
- [179] L. M. Memmo, P. McKeown-Longo. The  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin functions as an endocytic receptor for vitronectin. *J. Cell Sci.* **1998**, 111(4), 425-433.
- [180] R. G. LeBaron, K. A. Athanasiou. Extracellular matrix cell adhesion peptides: functional applications in orthopedic materials. *Tissue Eng.* **2000**, 6(2), 85-103.
- [181] C. Gimond, A. Sonnenberg, Activation States of Integrins, in *Integrin-Ligand Interaction* (Ed.: J. A. Eble), Springer-Verlag, Heidelberg, **1997**, pp. 219-240.
- [182] D. Dogic, P. Rousselle, M. Aumailley. Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform-specific clustering of integrins and other focal adhesion components. *J. Cell Sci.* **1998**, 111(6), 793-802.

- [183] E. Zamir, B. Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*(20), 3583-3590.
- [184] R. R. Hantgan, D. S. Lyles, T. C. Mallett, M. Rocco, C. Nagaswami, J. W. Weisel. Ligand binding promotes the entropy-driven oligomerization of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*(5), 3417-3426.
- [185] V. Petit, J. P. Thiery. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol. Cell* **2000**, *92*(7), 477-494.
- [186] V. Grabovsky, S. Feigelson, C. Chen, D. A. Bleijs, A. Peled, G. Cinamon, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, T. Lapidot, Y. van Kooyk, R. R. Lobb, R. Alon. Subsecond induction of  $\alpha$ 4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*(4), 495-506.
- [187] S. Myou, X. Zhu, E. Boetticher, Y. Qin, S. Myo, A. Meliton, A. Lambertino, N. M. Munoz, K. J. Hamann, A. R. Leff. Regulation of adhesion of AML14.3D10 cells by surface clustering of  $\beta$ 2-integrin caused by ERK-independent activation of cPLA2. *Immunology* **2002**, *107*(1), 77-85.
- [188] M. Stewart, N. Hogg. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J. Cell Biochem.* **1996**, *61*(4), 554-561.
- [189] D. F. Kucik. Rearrangement of integrins in avidity regulation by leukocytes. *Immunol. Res.* **2002**, *26*(1-3), 199-206.
- [190] A. Zanetti, G. Conforti, S. Hess, I. Martin-Padura, E. Ghibaudi, K. T. Preissner, E. Dejana. Clustering of vitronectin and RGD peptides on microspheres leads to engagement of integrins on the luminal aspect of endothelial cell membrane. *Blood* **1994**, *84*(4), 1116-1123.
- [191] T. Hato, N. Pampori, S. J. Shattil. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J. Cell Biol.* **1998**, *141*(7), 1685-1695.
- [192] J. C. Adams. Cell-matrix contact structures. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2001**, *58*(3), 371-392.
- [193] N. Tawil, P. Wilson, S. Carbonetto. Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs. focal contacts. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*(1), 261-271.
- [194] J. L. Sechler, A. M. Cumiskey, D. M. Gazzola, J. E. Schwarzbauer. A novel RGD-independent fibronectin assembly pathway initiated by  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin binding to the alternatively spliced V region. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*(8), 1491-1498.
- [195] C. Brakebusch, D. Bouvard, F. Stanchi, T. Sakai, R. Fassler. Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest.* **2002**, *109*(8), 999-1006.
- [196] N. J. Boudreau, P. L. Jones. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.* **1999**, *339*(3), 481-488.
- [197] M. C. Frame, V. G. Brunton. Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2002**, *12*(1), 36-43.
- [198] K. Kawakami, H. Tatsumi, M. Sokabe. Dynamics of integrin clustering at focal contacts of endothelial cells studied by multimode imaging microscopy. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*(17), 3125-3135.
- [199] B. Z. Katz, E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K. M. Yamada, B. Geiger. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*(3), 1047-1060.
- [200] R. J. Pelham, Jr., Y. L. Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol. Bull.* **1998**, *194*(3), 348-350.
- [201] L. B. Smilenov, A. Mikhailov, R. J. Pelham, E. E. Marcantonio, G. G. Gundersen. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* **1999**, *286*(5442), 1172-1174.
- [202] E. Cukierman, R. Pankov, D. R. Stevens, K. M. Yamada. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* **2001**, *294*(5547), 1708-1712.
- [203] B. Geiger. Cell biology. Encounters in space. *Science* **2001**, *294*(5547), 1661-1663.
- [204] J. E. Murphy-Ullrich. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J. Clin. Invest.* **2001**, *107*(7), 785-790.
- [205] L. Capro. Hormone - Die chemischen Boten des Körpers. *Spektrum der Wissenschaften* **1985**, 129 - 140.

- [206] H. W. Minne. Lebensqualität im Alter - bedroht durch Osteoporose? *Pharm. in uns. Zeit* **1991**, 20, 109 - 114.
- [207] D. M. Burns, J. M. Forstrom, K. E. Friday, G. A. Howard, B. A. Roos. Procalcitonin's amino-terminal cleavage peptide is a bone-cell mitogen. *PNAS* **1989**, 86(23), 9519-9523.
- [208] K. Hulthenby, F. P. Reinholt, D. Heinegard. Distribution of integrin subunits on rat metaphyseal osteoclasts and osteoblasts. *Eur. J. Cell Biol.* **1993**, 62(1), 86-93.
- [209] M. Castoldi, M. Pistone, C. Caruso, A. Puddu, C. Filanti, D. Piccini, C. Tacchetti, P. Manduca. Osteoblastic cells from rat long bone. II: Adhesion to substrata and integrin expression in primary and propagated cultures. *Cell. Biol. Int.* **1997**, 21(1), 7-16.
- [210] R. K. Sinha, R. S. Tuan. Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials. *Bone* **1996**, 18(5), 451-457.
- [211] D. Goltzman. Discoveries, drugs and skeletal disorders. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2002**, 1(10), 784-796.
- [212] A. Reznia, K. E. Healy. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptide surfaces. *J. Orthop. Res.* **1999**, 17(4), 615-623.
- [213] J. L. Ong, D. C. N. Chan. Hydroxyapatite and Their Use As Coatings in Dental Implants: A Review. *Biomed. Eng.* **2000**, 28(5), 667-892.
- [214] R. Lenigk, M. Carles, N. Y. Ip, N. J. Sucher. Surface characterization of a silicon-chip-based DNA microarray. *Langmuir* **2001**, 17(8), 2497-2501.
- [215] M. C. Pirrung. How to make a DNA chip. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41(8), 1277-1289.
- [216] C. Abdelghani-Jacquín, A. Abdelghani, G. Chmel, M. Kantlehner, E. Sackmann. Decorated surfaces by biofunctionalized gold beads: application to cell adhesion studies. *Eur. Biophys. J.* **2002**, 31(2), 102-110.
- [217] S. V. Dorozhkin, M. Epple. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41(17), 3130-3146.
- [218] M. Epple, J. M. Rueger. Festkörperchemie und Chirurgie. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1999**, 47(12), 1405-1410.
- [219] N. Kossovsky, in *Advances in Materials Science and Implant Orthopedic Surgery* (Eds.: R. Kossovsky, N. Kossovsky), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **1995**, pp. 25-46.
- [220] C. D. Jefferiss, A. J. Lee, R. S. Ling. Thermal aspects of self-curing polymethylmethacrylate. *J. Bone Joint Surg. Br.* **1975**, 57(4), 511-518.
- [221] J. M. Rueger. Knochensatzmittel - Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* **1998**, 27(2), 72-79.
- [222] H.-J. Neumann, D. K. Shetty, *Erste Erfahrungen mit Biocoral-Implantaten bei Rekonstruktionen im Gesichtsschädelbereich*, Einhorn Presse-Verlag, Reinbek/Hamburg, **1993**.
- [223] K. A. Hing, S. M. Best, K. E. Tanner, W. Bonfield, P. A. Revell. Biomechanical assessment of bone ingrowth in porous hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1997**, 8(12), 731-736.
- [224] J. Heisel, E. Fritsch, E. Schmitt, H. Mittelmeier, *Knöcherner Defektauffüllung und Überbrückung mit dem Knochensatzmaterial-Pyrost : klinischer Erfahrungsbericht*, Thieme, Stuttgart, **1993**.
- [225] R. van Noort. Titanium - the Implant Material of Today. *J. Mater. Sci.* **1987**, 22(11), 3801-3811.
- [226] M. Semlitsch, H. Weber, R. Steger. Fifteen years of experience with a Ti-6Al-7Nb alloy for joint replacements. *Biomed. Tech.* **1995**, 40(12), 347-355.
- [227] J. Breme, V. Wadewitz. Comparison of titanium-tantalum and titanium-niobium alloys for application as dental implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1989**, 4(2), 113-118.
- [228] H. Matsuno, A. Yokoyama, F. Watari, M. Uo, T. Kawasaki. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials* **2001**, 22(11), 1253-1262.
- [229] M. Veiseh, M. H. Zareie, M. Q. Zhang. Highly selective protein patterning on gold-silicon substrates for biosensor applications. *Langmuir* **2002**, 18(17), 6671-6678.
- [230] I. Willner, E. Katz. Integration of layered redox proteins and conductive supports for bio-electronic applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39(7), 1180-1218.
- [231] E. Katz, I. Willner. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43(45), 6042-6108.
- [232] Y. Kumagai, Immobilization of Peptide Compound on Silicon or Germanium Carriers, **1988**, JP 63162700 A2; CA Abstract Number 111:129803.

- [233] R. Ostroff, A. Ettinger, H. La, M. Rihaneck, L. Zalman, J. Meador, 3rd, A. K. Patick, S. Worland, B. Polisky. Rapid multiserotype detection of human rhinoviruses on optically coated silicon surfaces. *J. Clin. Virol.* **2001**, 21(2), 105-117.
- [234] H. Andersson, C. Jonsson, C. Moberg, G. Stemme. Consecutive microcontact printing - ligands for asymmetric catalysis in silicon channels. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2001**, 79(1), 78-84.
- [235] L. L. Smith, K. Wang, G. N. Parsons, R. Hernandez, D. T. Brown. Selective Area Cell Adhesion on Amorphous Silicon Using Patterned Self-Assembled Monolayers. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* **2000**, 609, A21.25.21-A21.25.26.
- [236] M. Stutzmann, in *Arbeits- und Ergebnisbericht des SFB 563*, München, **2003**, pp. 155-185.
- [237] J. E. Zull, J. Reed-Mundell, Y. W. Lee, D. Vezenov, N. P. Ziats, J. M. Anderson, C. N. Suenik. Problems and approaches in covalent attachment of peptides and proteins to inorganic surfaces for biosensor applications. *J. Ind. Microbiol.* **1994**, 13(3), 137-143.
- [238] J. J. Langer, R. Galinski, T. Gibinski. Electrically conducting and fluorising self-assembled monomolecular layers. *Adv. Mater. Opt. Electron.* **1998**, 8(1), 31-37.
- [239] C. R. Jenney, J. M. Anderson. Alkylsilane-modified surfaces: Inhibition of human macrophage adhesion and foreign body giant cell formation. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 46(1), 11-21.
- [240] X. Zhao, S. Nampalli, A. J. Serino, S. Kumar. Immobilization of oligodeoxyribonucleotides with multiple anchors to microchips. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29(4), 955-959.
- [241] F. Palmer, R. Tünnemann, D. Leipert, C. Stingel, G. Jung, V. Hoffmann. Cyclic peptides and their interaction with peptide coated surfaces. *J. Mol. Struct.* **2001**, 563, 153-157.
- [242] V. M. da Rocha Barros, L. A. Salata, C. E. Sverzut, S. P. Xavier, R. van Noort, A. Johnson, P. V. Hatton. In vivo bone tissue response to a canasite glass-ceramic. *Biomaterials* **2002**, 23(14), 2895-2900.
- [243] W. Y. J. Kao, J. A. Hubbell. Murine macrophage behavior on peptide-grafted polyethylene-glycol-containing networks. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, 59(1), 2-9.
- [244] J. A. Chinn, J. A. Sauter, R. E. Phillips, Jr., W. J. Kao, J. M. Anderson, S. R. Hanson, T. R. Ashton. Blood and tissue compatibility of modified polyester: thrombosis, inflammation, and healing. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 39(1), 130-140.
- [245] J. A. Burdick, K. S. Anseth. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2002**, 23(22), 4315-4323.
- [246] R. Johnson, D. Harrison, M. Tucci, A. Tsao, M. Lemos, A. Puckett, J. L. Hughes, H. Benghuzzi. Fibrous capsule formation in response to ultrahigh molecular weight polyethylene treated with peptides that influence adhesion. *Biomed. Sci. Instrum.* **1997**, 34, 47-52.
- [247] D. M. Ferris, G. D. Moodie, P. M. Dimond, C. W. Gioranni, M. G. Ehrlich, R. F. Valentini. RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* **1999**, 20(23-24), 2323-2331.
- [248] M. Dard, A. Sewing, J. Meyer, S. Verrier, S. Roessler, D. Scharnweber. Tools for tissue engineering of mineralized oral structures. *Clin. Oral Investig.* **2000**, 4(2), 126-129.
- [249] K. Eid, E. Chen, L. Griffith, J. Glowacki. Effect of RGD coating on osteocompatibility of PLGA-polymer disks in a rat tibial wound. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 57(2), 224-231.
- [250] K. Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* **2000**, 21(7), 667-681.
- [251] M. C. Siebers, P. J. ter Brugge, X. F. Walboomers, J. A. Jansen. Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. *Biomaterials* **2005**, 26(2), 137-146.
- [252] A. J. García, C. D. Reyes. Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Foration. *J. Dent. Res.* **2005**, 84(5), 407-413.
- [253] M. Arnold, E. A. Cavalcanti-Adam, R. Glass, J. Blummel, W. Eck, M. Kantelehner, H. Kessler, J. P. Spatz. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *ChemPhysChem* **2004**, 5(3), 383-388.
- [254] K. P. S. Dancil, D. P. Greiner, M. J. Sailor. A porous silicon optical biosensor: Detection of reversible binding of IgG to a protein A-modified surface. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121(34), 7925-7930.
- [255] E. Danelian, A. Karlen, R. Karlsson, S. Winiwarer, A. Hansson, S. Lofas, H. Lennernas, M. D. Hamalainen. SPR biosensor studies of the direct interaction between 27 drugs and a lipo-

- some surface: correlation with fraction absorbed in humans. *J. Med. Chem.* **2000**, 43(11), 2083-2086.
- [256] R. Biran, K. Webb, M. D. Noble, P. A. Tresco. Surfactant-immobilized fibronectin enhances bioactivity and regulates sensory neurite outgrowth. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, 55(1), 1-12.
- [257] N. Weiß, D. Klee, H. Höcker. Konzept zur bioaktiven Ausrüstung von Metallimplantatoberflächen. *Biomaterialien* **2001**, 2(2/3), 81-86.
- [258] S. P. Massia, J. A. Hubbell. Human endothelial cell interactions with surface-coupled adhesion peptides on a nonadhesive glass substrate and two polymeric biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, 25(2), 223-242.
- [259] K. E. Healy, D. Tsai, J. E. Kim, Osteogenic cell attachment to degradable polymers, in *Tissue-Inducing Biomaterials, Vol. 252*, **1992**, pp. 109-114.
- [260] G. B. Fields, J. L. Lauer, Y. Dori, P. Forns, Y. C. Yu, M. Tirrell. Protein-like molecular architecture: biomaterial applications for inducing cellular receptor binding and signal transduction. *Biopolymers* **1998**, 47(2), 143-151.
- [261] D. L. Hern, J. A. Hubbell. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 39(2), 266-276.
- [262] H. Kobayashi, Y. Ikada. Corneal cell adhesion and proliferation on hydrogel sheets bound with cell-adhesive proteins. *Curr. Eye Res.* **1991**, 10(10), 899-908.
- [263] J. B. Huebsch, G. B. Fields, T. G. Triebes, D. L. Mooradian. Photoreactive analog of peptide FN-C/H-V from the carboxy-terminal heparin-binding domains of fibronectin supports endothelial cell adhesion and spreading on biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, 31(4), 555-567.
- [264] D. L. Elbert, J. A. Hubbell. Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering. *Biomacromolecules* **2001**, 2(2), 430-441.
- [265] K. Lewandowska, E. Pergament, C. N. Sukenik, L. A. Culp. Cell-Type-Specific Adhesion Mechanisms Mediated by Fibronectin Adsorbed to Chemically Derivatized Substrata. *J. Biomed. Mater. Res.* **1992**, 26(10), 1343-1363.
- [266] P. A. Underwood, J. G. Steele, B. A. Dalton. Effects of polystyrene surface chemistry on the biological activity of solid phase fibronectin and vitronectin, analysed with monoclonal antibodies. *J. Cell Sci.* **1993**, 104(3), 793-803.
- [267] D. J. Iuliano, S. S. Saavedra, G. A. Truskey. Effect of the Conformation and Orientation of Adsorbed Fibronectin on Endothelial-Cell Spreading and the Strength of Adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, 27(8), 1103-1113.
- [268] D. K. Pettit, A. S. Hoffman, T. A. Horbett. Correlation between Corneal Epithelial-Cell Outgrowth and Monoclonal-Antibody Binding to the Cell-Binding Domain of Adsorbed Fibronectin. *J. Biomed. Mater. Res.* **1994**, 28(6), 685-691.
- [269] J. B. Lhoest, E. Detrait, P. van den Bosch de Aguilar, P. Bertrand. Fibronectin adsorption, conformation, and orientation on polystyrene substrates studied by radiolabeling, XPS, and ToF SIMS. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 41(1), 95-103.
- [270] A. M. Rouhi. Contemporary biomaterials. *Chem. Eng. News* **1999**, 77(3), 51-65.
- [271] V. V. Hlady, J. Buijs. Protein adsorption on solid surfaces. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, 7(1), 72-77.
- [272] G. Altankov, F. Grinnell, T. Groth. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J. Biomed. Mater. Res.* **1996**, 30(3), 385-391.
- [273] T. A. Horbett, K. R. Lew. Residence time effects on monoclonal antibody binding to adsorbed fibrinogen. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1994**, 6(1), 15-33.
- [274] D. L. Elbert, J. A. Hubbell. Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Ann. Rev. Mat. Sci.* **1996**, 26, 365-394.
- [275] D. Delforge, M. Art, B. Gillon, M. Dieu, E. Delaive, M. Raes, J. Remacle. Automated solid-phase synthesis of cyclic peptides bearing a side-chain tail designed for subsequent chemical grafting. *Anal. Biochem.* **1996**, 242(2), 180-186.
- [276] M. Mrksich. A surface chemistry approach to studying cell adhesion. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29(4), 267-273.

- [277] R. A. Quirk, W. C. Chan, M. C. Davies, S. J. Tendler, K. M. Shakesheff. Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid). *Biomaterials* **2001**, 22(8), 865-872.
- [278] V. Marchi-Artzner, B. Lorz, U. Hellerer, M. Kantlehner, H. Kessler, E. Sackmann. Selective adhesion of endothelial cells to artificial membranes with a synthetic RGD-lipopeptide. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7(5), 1095-1101.
- [279] S. Verrier, S. Pallu, R. Bareille, A. Jonczyk, J. Meyer, M. Dard, J. Amedee. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* **2002**, 23(2), 585-596.
- [280] Y. Ito, M. Kajihara, Y. Imanishi. Materials for enhancing cell adhesion by immobilization of cell-adhesive peptide. *J. Biomed. Mater. Res.* **1991**, 25(11), 1325-1337.
- [281] S. J. Bogdanowich-Knipp, D. S. Jois, T. J. Siahaan. The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J. Pept. Res.* **1999**, 53(5), 523-529.
- [282] B. Ivanov, W. Grzesik, F. A. Robey. Synthesis and use of a new bromoacetyl-derivatized heterotrifunctional amino acid for conjugation of cyclic RGD-containing peptides derived from human bone sialoprotein. *Bioconj. Chem.* **1995**, 6(3), 269-277.
- [283] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **1987**, 262(36), 17294-17298.
- [284] V. Grigoriou, I. M. Shapiro, E. A. Cavalcanti-Adam, R. J. Composto, P. Ducheyne, C. S. Adams. Apoptosis and survival of osteoblast-like cells are regulated by surface attachment. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280(3), 1733-1739.
- [285] S. Jo, H. Shin, A. G. Mikos. Modification of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) macromer with a GRGD peptide for the preparation of functionalized polymer networks. *Biomacromolecules* **2001**, 2(1), 255-261.
- [286] Y. S. Lin, S. S. Wang, T. W. Chung, Y. H. Wang, S. H. Chiou, J. J. Hsu, N. K. Chou, K. H. Hsieh, S. H. Chu. Growth of endothelial cells on different concentrations of Gly-Arg-Gly-Asp photochemically grafted in polyethylene glycol modified polyurethane. *Artif. Organs* **2001**, 25(8), 617-621.
- [287] S. Woerly, E. Pinet, L. de Robertis, D. Van Diep, M. Bousmina. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials* **2001**, 22(10), 1095-1111.
- [288] W. Breuers, D. Klee, H. Hocker, C. Mittermayer. Immobilization of a Fibronectin Fragment at the Surface of a Polyetherurethane Film. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* **1991**, 2(2), 106-109.
- [289] P. D. Drumheller, J. A. Hubbell. Polymer networks with grafted cell adhesion peptides for highly biospecific cell adhesive substrates. *Anal. Biochem.* **1994**, 222(2), 380-388.
- [290] M. J. Moghaddam, T. Matsuda. Molecular Design of 3-Dimensional Artificial Extracellular-Matrix - Photosensitive Polymers Containing Cell Adhesive Peptide. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1993**, 31(6), 1589-1597.
- [291] T. Matsuda, A. Kondo, K. Makino, T. Akutsu. Development of a novel artificial matrix with cell adhesion peptides for cell culture and artificial and hybrid organs. *ASAIO Trans.* **1989**, 35(3), 677-679.
- [292] P. Banerjee, D. J. Irvine, A. M. Mayes, L. G. Griffith. Polymer latexes for cell-resistant and cell-interactive surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, 50(3), 331-339.
- [293] K. P. Walluscheck, G. Steinhoff, S. Kelm, A. Haverich. Improved endothelial cell attachment on ePTFE vascular grafts pretreated with synthetic RGD-containing peptides. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **1996**, 12(3), 321-330.
- [294] J. Holland, L. Hersh, M. Bryhan, E. Onyiriuka, L. Ziegler. Culture of human vascular endothelial cells on an RGD-containing synthetic peptide attached to a starch-coated polystyrene surface: comparison with fibronectin-coated tissue grade polystyrene. *Biomaterials* **1996**, 17(22), 2147-2156.
- [295] D. J. Irvine, A. V. Ruzette, A. M. Mayes, L. G. Griffith. Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using comb polymers. 2. Surface segregation of comb polymers in poly(lactide). *Biomacromolecules* **2001**, 2(2), 545-556.
- [296] S. Biltresse, M. Attolini, G. Dive, A. Cordi, G. C. Tucker, J. Marchand-Brynaert. Novel RGD-like molecules based on the tyrosine template design, synthesis, and biological evaluation.

- tion on isolated integrins  $\alpha v\beta 3 / \alpha IIb\beta 3$  and in cellular adhesion tests. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*(20), 5379-5393.
- [297] A. D. Cook, J. S. Hrkach, N. N. Gao, I. M. Johnson, U. B. Pajvani, S. M. Cannizzaro, R. Langer. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *35*(4), 513-523.
- [298] J. A. Neff, P. A. Tresco, K. D. Caldwell. Surface modification for controlled studies of cell-ligand interactions. *Biomaterials* **1999**, *20*(23-24), 2377-2393.
- [299] J. A. Neff, K. D. Caldwell, P. A. Tresco. A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *40*(4), 511-519.
- [300] U. Hersel. Monomere und multimere RGD-Peptide für die integrinvermittelte Zelladhäsion auf Biomaterialien und zur Tumordiagnose. Dissertation, TU München (München), **2003**.
- [301] W. S. Craig, S. Cheng, D. G. Mullen, J. Blevitt, M. D. Pierschbacher. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers* **1995**, *37*(2), 157-175.
- [302] D. Harrison, R. Johnson, M. Tucci, A. Puckett, A. Tsao, J. Hughes, H. Benghuzzi. Interaction of cells with UHMWPE impregnated with the bioactive peptides RGD, RGE or Poly-L-lysine. *Biomed. Sci. Instrum.* **1997**, *34*, 41-46.
- [303] A. McConachie, D. Newman, M. Tucci, A. Puckett, A. Tsao, J. Hughes, H. Benghuzzi. The effect on bioadhesive polymers either freely in solution or covalently attached to a support on human macrophages. *Biomed. Sci. Instrum.* **1999**, *35*, 45-50.
- [304] M. Dettin, M. T. Conconi, R. Gambaretto, A. Pasquato, M. Folin, C. Di Bello, P. P. Parnigotto. Novel osteoblast-adhesive peptides for dental/orthopedic biomaterials. *J. Biomed. Mat. Res.* **2002**, *60*(3), 466-471.
- [305] G. Marletta, G. Ciapetti, C. Satriano, S. Pagani, N. Baldini. The effect of irradiation modification and RGD sequence adsorption on the response of human osteoblasts to polycaprolactone. *Biomaterials* **2005**, *26*(23), 4793-4804.
- [306] J. M. Gold, M. Schmidt, S. G. Steinemann. XPS Study of Amino-Acid Adsorption to Titanium Surfaces. *Helv. Phys. Acta* **1989**, *62*(2-3), 246-249.
- [307] K. Endo. Chemical modification of metallic implant surfaces with biofunctional proteins (Part 1). Molecular structure and biological activity of a modified NiTi alloy surface. *Dent. Mater. J.* **1995**, *14*(2), 185-198.
- [308] A. Reznia, R. Johnson, A. R. Lefkow, K. E. Healy. Bioactivation of metal oxide surfaces. 1. Surface characterization and cell response. *Langmuir* **1999**, *15*(20), 6931-6939.
- [309] H. Zreiqat, F. A. Akin, C. R. Howlett, B. Markovic, D. Haynes, S. Lateef, L. Hanley. Differentiation of human bone-derived cells grown on GRGDSP-peptide bound titanium surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *64*(1), 105-113.
- [310] M. C. Porte-Durrieu, F. Guillemot, S. Pallu, C. Labrugere, B. Brouillaud, R. Bareille, J. Amedee, N. Barthe, M. Dard, C. Baquey. Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials* **2004**, *25*(19), 4837-4846.
- [311] B. Elmengaard, J. E. Bechtold, K. Soballe. In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants. *Biomaterials* **2005**, *26*(17), 3521-3526.
- [312] J. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, J. E. Schwarzbauer, K. S. Midwood, E. S. Gawalt. Cell attachment and spreading on metal implant materials. *Mater. Sci. Eng., C* **2003**, *23*(3), 395-400.
- [313] R. Bernhardt, S. Rammelt, R. Beutner, F. Beckmann, B. Jeschke, C. Dahmen, H. Kessler, D. Scharnweber, H. Worch. Bio Surface-Engineering von Titanimplantaten durch elektrochemisch gestützte Immobilisierung von RGD-Peptid - Erste Tierexperimentelle Befunde in einem Rattenmodell. *BIOMaterialien* **2002**, *3*(3/4), 150.
- [314] H. Schliephake, D. Scharnweber, M. Dard, A. Sewing, A. Aref, S. Roessler. Functionalization of Dental Implant Surfaces Using Adhesion Molecules. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater* **2005**, *73B*, 88-96.
- [315] B. H. Zhao, W. M. Tian, H. L. Feng, I.-S. Lee, F. Z. Cui. Effects of RGD peptide grafting to titanium dental implants on the adhesion of human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Curr. Appl. Phys.* **2005**, *5*(5), 407-410.

- [316] M. Hasan, D. Bethell, M. Brust. The fate of sulfur-bound hydrogen on formation of self-assembled thiol monolayers on gold: H-1 NMR spectroscopic evidence from solutions of gold clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(7), 1132-1133.
- [317] C. D. Bain, G. M. Whitesides. Modeling Organic-Surfaces with Self-Assembled Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*(4), 506-512.
- [318] B. T. Houseman, M. Mrksich. Efficient solid-phase synthesis of peptide-substituted alkanethiols for the preparation of substrates that support the adhesion of cells. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*(21), 7552-7555.
- [319] C. Roberts, C. S. Chen, M. Mrksich, V. Martichonok, D. E. Ingber, G. M. Whitesides. Using mixed self-assembled monolayers presenting RGD and (EG)<sub>3</sub>OH groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(26), 6548-6555.
- [320] B. T. Houseman, M. Mrksich. The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials* **2001**, *22*(9), 943-955.
- [321] C. Dahmen, A. Janotta, D. Dimova-Malinovska, S. Marx, B. Jeschke, B. Nies, H. Kessler, M. Stutzmann. Surface functionalization of amorphous silicon and silicon suboxides for biological applications. *Thin Solid Films* **2003**, *427*(1-2), 201-207.
- [322] L. C. Lopez, R. Gristina, G. Ceccone, F. Rossi, P. Favia, R. d'Agostino. Immobilization of RGD peptides on stable plasma-deposited acrylic acid coatings for biomedical devices. *Surf. Coat. Technol.* **2005**, *200*(1-4), 1000-1004.
- [323] S. Sagnella, E. Anderson, N. Sanabria, R. E. Marchant, K. Kottke-Marchant. Human endothelial cell interaction with biomimetic surfactant polymers containing Peptide ligands from the heparin binding domain of fibronectin. *Tissue Eng.* **2005**, *11*(1-2), 226-236.
- [324] O. Keller, J. Rudinger. Preparation and some properties of maleimido acids and maleoyl derivatives of peptides. *Helv. Chim. Acta* **1975**, *58*(2), 531-541.
- [325] S. Yoshitake, Y. Yamada, E. Ishikawa, R. Masseyeff. Conjugation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* and rabbit antibodies using N-hydroxysuccinimide ester of N-(4-carboxycyclohexylmethyl)-maleimide. *Eur. J. Biochem.* **1979**, *101*(2), 395-399.
- [326] H. Schliephake, D. Scharnweber, M. Dard, S. Rossler, A. Sewing, J. Meyer, D. Hoogstraat. Effect of RGD peptide coating of titanium implants on periimplant bone formation in the alveolar crest. An experimental pilot study in dogs. *Clin. Oral Implants Res.* **2002**, *13*(3), 312-319.
- [327] M. H. Ho, D. M. Wang, H. J. Hsieh, H. C. Liu, T. Y. Hsien, J. Y. Lai, L. T. Hou. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds. *Biomaterials* **2005**, *26*(16), 3197-3206.
- [328] C. Picart, R. Elkaim, L. Richert, F. Audoin, Y. Arntz, M. Da Silva Cardoso, P. Schaaf, J.-C. Voegel, B. Frisch. Primary Cell Adhesion on RGD-Functionalized and Covalently Crosslinked Thin Polyelectrolyte Multilayer Films. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*(1), 83-94.
- [329] D. D. Pless, Y. C. Lee, S. Roseman, R. L. Schnaar. Specific cell adhesion to immobilized glycoproteins demonstrated using new reagents for protein and glycoprotein immobilization. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*(4), 2340-2349.
- [330] P. J. Willcox, C. A. Reinhart-King, S. J. Lahr, W. F. DeGrado, D. A. Hammer. Dynamic heterodimer-functionalized surfaces for endothelial cell adhesion. *Biomaterials* **2005**, *26*(23), 4757-4766.
- [331] E. Lieb, M. Hacker, J. Tessmar, L. A. Kunz-Schughart, J. Fiedler, C. Dahmen, U. Hersel, H. Kessler, M. B. Schulz, A. Göpferich. Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides. *Biomaterials* **2005**, *26*(15), 2333-2341.
- [332] K. H. Park, K. Na, H. M. Chung. Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an Arg-Gly-Asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*(4), 227-231.
- [333] M. Kantlehner. Beschichtung künstlicher Oberflächen mit hochaktiven und für das  $\alpha\beta_3$ -Integrin selektiven RGD-Peptiden zur Stimulation der integrinvermittelten Zelladhäsion. TU München (München), **2000**.

- [334] A. Rezania, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy. The detachment strength and morphology of bone cells contacting materials modified with a peptide sequence found within bone sialoprotein. *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, *37*(1), 9-19.
- [335] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber. Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(34), 7967-7968.
- [336] M. Brook, A. Ragheb, in *24th Annual Meeting of the Adhesion Society*, **2001**, pp. 377-379.
- [337] P. Wagner, S. Nock, J. A. Spudich, W. D. Volkmuth, S. Chu, R. L. Cicero, C. P. Wade, M. R. Linford, C. E. Chidsey. Bioreactive self-assembled monolayers on hydrogen-passivated Si(111) as a new class of atomically flat substrates for biological scanning probe microscopy. *J. Struct. Biol.* **1997**, *119*(2), 189-201.
- [338] M. M. Sung, G. J. Kluth, O. W. Yauw, R. Maboudian. Thermal behavior of alkyl monolayers on silicon surfaces. *Langmuir* **1997**, *13*(23), 6164-6168.
- [339] A. B. Sieval, A. L. Demirel, J. W. M. Nissink, M. R. Linford, J. H. van der Maas, W. H. de Jeu, H. Zuilhof, E. J. R. Sudholter. Highly stable Si-C linked functionalized monolayers on the silicon (100) surface. *Langmuir* **1998**, *14*(7), 1759-1768.
- [340] J. E. Bateman, R. D. Eagling, D. R. Worrall, B. R. Horrocks, A. Houlton. Alkylation of porous silicon by direct reaction with alkenes and alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*(19), 2683-2685.
- [341] L. A. Belyakova, A. M. Varvarin. Interaction of hydride silica surfaces with N-vinyl-2-pyrrolidone. *Adsorption Science & Technology* **2000**, *18*(1), 65-74.
- [342] J. E. Bateman, R. D. Eagling, B. R. Horrocks, A. Houlton. A deuterium labeling, FTIR, and ab initio investigation of the solution-phase thermal reactions of alcohols and alkenes with hydrogen-terminated silicon surfaces. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*(23), 5557-5565.
- [343] R. Boukherroub, S. Morin, P. Sharpe, D. D. M. Wayner, P. Allongue. Insights into the formation mechanisms of Si-OR monolayers from the thermal reactions of alcohols and aldehydes with Si(111)-H. *Langmuir* **2000**, *16*(19), 7429-7434.
- [344] A. B. Sieval, B. van den Hout, H. Zuilhof, E. J. R. Sudholter. Molecular modeling of covalently attached alkyl monolayers on the hydrogen-terminated Si(111) surface. *Langmuir* **2001**, *17*(7), 2172-2181.
- [345] M. P. Stewart, J. M. Buriak. Photopatterned hydrosilylation on porous silicon. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*(23), 3257-3260.
- [346] T. Strother, R. J. Hamers, L. M. Smith. Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*(18), 3535-3541.
- [347] R. L. Cicero, M. R. Linford, C. E. D. Chidsey. Photoreactivity of unsaturated compounds with hydrogen-terminated silicon(111). *Langmuir* **2000**, *16*(13), 5688-5695.
- [348] J. M. Buriak. Silicon-carbon bonds on porous silicon surfaces. *Adv. Mater.* **1999**, *11*(3), 265-267.
- [349] J. M. Buriak. Organometallic chemistry on silicon surfaces: formation of functional monolayers bound through Si-C bonds. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1999**, (12), 1051-1060.
- [350] J. M. Buriak, M. J. Allen. Lewis acid mediated functionalization of porous silicon with substituted alkenes and alkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(6), 1339-1340.
- [351] D. H. Davis, C. S. Giannoulis, R. W. Johnson, T. A. Desai. Immobilization of RGD to < 1 1 1 > silicon surfaces for enhanced cell adhesion and proliferation. *Biomaterials* **2002**, *23*(19), 4019-4027.
- [352] M. E. Hasenbein, T. T. Andersen, R. Bizios. Micropatterned surfaces modified with select peptides promote exclusive interactions with osteoblasts. *Biomaterials* **2002**, *23*(19), 3937-3942.
- [353] A. Rezania, K. E. Healy, in *Materials Research Society Symposium, Vol. 530 (Biomaterials Regulating Cell Function and Tissue Development)*, **1998**, pp. 99-104.
- [354] K. C. Dee, D. C. Rueger, T. T. Andersen, R. Bizios. Conditions which promote mineralization at the bone-implant interface: a model in vitro study. *Biomaterials* **1996**, *17*(2), 209-215.
- [355] K. C. Dee, T. T. Anderson, R. Bizios. Osteoblast population migration characteristics on substrates modified with immobilized adhesive peptides. *Biomaterials* **1999**, *20*(3), 221-227.
- [356] A. Rezania, K. E. Healy. The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*(4), 595-600.

- [357] K. C. Olbrich, T. T. Andersen, F. A. Blumenstock, R. Bizios. Surfaces modified with covalently-immobilized adhesive peptides affect fibroblast population motility. *Biomaterials* **1996**, *17*(8), 759-764.
- [358] B. K. Mann, A. T. Tsai, T. Scott-Burden, J. L. West. Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition. *Biomaterials* **1999**, *20*(23-24), 2281-2286.
- [359] Y. Xiao, G. A. Truskey. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. *Biophys. J.* **1996**, *71*(5), 2869-2884.
- [360] E. Fischer, E. Fourneau. Über einige Derivate des Glykocolls. *Chem. Ber.* **1901**, *34*, 2868-2877.
- [361] T. Curtius. Verkettung von Amidosäuren I. Abhandlung. *J. Prakt. Chem.* **1904**, *70*(1), 57-72.
- [362] M. Bergmann, L. Zervas. Über ein allgemeines Verfahren zur Peptid-Synthese. *Chem. Ber.* **1932**, *65*, 1192.
- [363] R. B. Merrifield. Solid-Phase Synthesis (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*(10), 799-810.
- [364] G. Barany, N. Kneibcordnier, D. G. Mullen. Solid-Phase Peptide-Synthesis - a Silver Anniversary Report. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *30*(6), 705-739.
- [365] L. A. Carpino, G. Y. Han. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*(22), 3404.
- [366] G. B. Fields, R. L. Noble. Solid-Phase Peptide-Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*(3), 161-214.
- [367] L. A. Carpino, D. Sadat-Aalae, H. G. Chao, R. H. DeSelms. ((9-Fluorenylmethyl)Oxy)Carbonyl (Fmoc) Amino-Acid Fluorides - Convenient New Peptide Coupling Reagents Applicable to the Fmoc/Tert-Butyl Strategy for Solution and Solid-Phase Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*(26), 9651-9652.
- [368] K. Barlos, D. Gatos, J. Kallitsis, G. Papaphotiu, P. Sotiriu, Y. Wenqing, W. Schäfer. Darstellung geschützter Peptid-Fragmente unter Einsatz substituierter Triphenylmethyl-Harze. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*(30), 3943-3946.
- [369] K. Barlos, O. Chatzi, D. Gatos, G. Stavropoulos. 2-Chlorotrityl Chloride Resin - Studies on Anchoring of Fmoc-Amino Acids and Peptide Cleavage. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*(6), 513-520.
- [370] I. W. James. Linkers for solid phase organic synthesis. *Tetrahedron* **1999**, *55*(16), 4855-4946.
- [371] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley. Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100*(6), 2091-2157.
- [372] J. M. Humphrey, A. R. Chamberlin. Chemical synthesis of natural product peptides: Coupling methods for the incorporation of noncoded amino acids into peptides. *Chem. Rev.* **1997**, *97*(6), 2243-2266.
- [373] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates. Use of onium salt-based coupling reagents in peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*(26), 9678-9683.
- [374] L. P. Miranda, P. F. Alewood. Challenges for protein chemical synthesis in the 21st century: Bridging genomics and proteomics. *Biopolymers* **2000**, *55*(3), 217-226.
- [375] J. N. Bertho, A. Loffet, C. Pinel, F. Reuther, G. Sennyey. Amino-Acid Fluorides - Their Preparation and Use in Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*(10), 1303-1306.
- [376] L. A. Carpino, M. Beyermann, H. Wenschuh, M. Bienert. Peptide synthesis via amino acid halides. *Accounts of Chemical Research* **1996**, *29*(6), 268-274.
- [377] Y. M. Angell, C. García-Echeverría, D. H. Rich. Comparative-Studies of the Coupling of N-Methylated, Sterically Hindered Amino-Acids During Solid-Phase Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(33), 5981-5984.
- [378] H. Wenschuh, M. Beyermann, R. Winter, M. Bienert, D. Ionescu, L. A. Carpino. Fmoc amino acid fluorides in peptide synthesis - Extension of the method to extremely hindered amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*(31), 5483-5486.
- [379] L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, P. Henklein, H. Wenschuh, M. Bienert, M. Beyermann. Protected amino acid chlorides vs protected amino acid fluorides: Reactivity comparisons. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*(3-4), 241-244.
- [380] S. Y. Han, Y. A. Kim. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60*(11), 2447-2467.
- [381] L. A. Carpino. 1-Hydroxy-7-Azabenzotriazole - an Efficient Peptide Coupling Additive. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*(10), 4397-4398.

- [382] L. A. Carpino, A. Elfaham, F. Albericio. Racemization Studies During Solid-Phase Peptide-Synthesis Using Azabenzotriazole-Based Coupling Reagents. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35(15), 2279-2282.
- [383] W. König, R. Geiger. A New Method for Synthesis of Peptides - Activation of Carboxy Group with Dicyclohexylcarbodiimide and 3-Hydroxy-4-Oxo-3,4-Dihydro-1,2,3-Benzotriazine. *Chem. Ber.* **1970**, 103(7), 2034.
- [384] W. König, R. Geiger. Racemization in Peptide Syntheses. *Chem. Ber.* **1970**, 103(7), 2024.
- [385] Y. X. Han, F. Albericio, G. Barany. Occurrence and minimization of cysteine racemization during stepwise solid-phase peptide synthesis. *J. Org. Chem.* **1997**, 62(13), 4307-4312.
- [386] L. A. Carpino, H. Shroff, S. A. Triolo, E. M. E. Mansour, H. Wenschuh, F. Albericio. The 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-Sulfonyl Group (Pbf) as Arginine Side-Chain Protectant. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34(49), 7829-7832.
- [387] R. Bollhagen, M. Schmiedberger, K. Barlos, E. Grell. A New Reagent for the Cleavage of Fully Protected Peptides Synthesized on 2-Chlorotriyl Chloride Resin. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1994**, (22), 2559-2560.
- [388] N. A. Solé, G. Barany. Optimization of Solid-Phase Synthesis of Ala<sup>8</sup>-Dynorphin-A. *J. Org. Chem.* **1992**, 57(20), 5399-5403.
- [389] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guindon. Trialkylsilanes as Scavengers for the Trifluoroacetic-Acid Deblocking of Protecting Groups in Peptide-Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30(21), 2739-2742.
- [390] T. Shioiri, S. Yamada, K. Ninomiya. Diphenylphosphoryl Azide - New Convenient Reagent for a Modified Curtius Reaction and for Peptide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94(17), 6203-6205.
- [391] U. Landegren. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J. Immunol. Methods* **1984**, 67(2), 379-388.
- [392] S. F. Brady, S. L. Varga, R. M. Freidinger, D. A. Schwenk, M. Mendlowski, F. W. Holly, D. F. Veber. Practical Synthesis of Cyclic-Peptides, with an Example of Dependence of Cyclization Yield Upon Linear Sequence. *J. Org. Chem.* **1979**, 44(18), 3101-3105.
- [393] R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen. New Coupling Reagents in Peptide Chemistry. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30(15), 1927-1930.
- [394] W. König, R. Geiger. A New Method for Synthesis of Peptides - Activation of Carboxyl Group with Dicyclohexylcarbodiimide Using 1-Hydroxybenzotriazoles as Additives. *Chem. Ber.* **1970**, 103(3), 788.
- [395] B. M. Nakhle, S. A. Trammell, K. M. Sigel, T. J. Meyer, B. W. Erickson. Synthesis of 3,5-bis(phosphonomethyl)benzoic acid and its application as a metal oxide surface bivalent anchor. *Tetrahedron* **1999**, 55(10), 2835-2846.
- [396] C. C. Kotoris, W. Wen, A. Lough, S. D. Taylor. Preparation of chiral  $\alpha$ -monofluoroalkylphosphonic acids and their evaluation as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 8, 1271-1281.
- [397] M. Gilbert, W. J. Shaw, J. R. Long, K. Nelson, G. P. Drobny, C. M. Giachelli, P. S. Stayton. Chimeric peptides of statherin and osteopontin that bind hydroxyapatite and mediate cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275(21), 16213-16218.
- [398] J. Emsley, D. Hall, *The Chemistry of Phosphorus - Environmental, organic, inorganic, biochemical and spectroscopic aspects*, Harper & Row, London, New York, Hagerstown, San Fransisco, **1976**.
- [399] D. E. C. Corbridge, *Phosphorus - A Outline of its Chemistry, Biochemistry and Technology*, Vol. 20, 5. ed., ELSEVIER, Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo, **1995**.
- [400] C. Dahmen. Funktionalisierung künstlicher Oberflächen mit zyklischen RGD-Peptiden und RGD-Mimetika zur Stimulierung integrinvermittelter Zelladhäsion. Dissertation, TU München (München), **2003**.
- [401] J. Auernheimer, D. Zukowski, C. Dahmen, M. Kantlehner, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler. Titanium Implant Materials with Improved Biocompatibility through Coating with Phosphonate-Anchored Cyclic RGD-Peptides. *ChemBioChem* **2005**, 6, 2034-2040.
- [402] S. Rensing, T. Schrader. The first synthetic receptor for the RGD sequence. *Org. Lett.* **2002**, 4(13), 2161-2164.

- [403] M. Gilbert, C. M. Giachelli, P. S. Stayton. Biomimetic peptides that engage specific integrin-dependent signaling pathways and bind to calcium phosphate surfaces. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *67*(1), 69-77.
- [404] C. B. Herbert, T. L. McLernon, C. L. Hypolite, D. N. Adams, L. Pikus, C. C. Huang, G. B. Fields, P. C. Letourneau, M. D. Distefano, W. S. Hu. Micropatterning gradients and controlling surface densities of photoactivatable biomolecules on self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol) alkanethiolates. *Chem. Biol.* **1997**, *4*(10), 731-737.
- [405] R. E. Galaray, L. C. Craig, M. P. Printz. Benzophenone triplet: a new photochemical probe of biological ligand-receptor interactions. *Nat. New. Biol.* **1973**, *242*(117), 127-128.
- [406] C. P. Holmes, D. G. Jones. Reagents for Combinatorial Organic-Synthesis - Development of a New o-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid-Phase Synthesis. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*(8), 2318-2319.
- [407] C. P. Holmes. Model studies for new o-nitrobenzyl photolabile linkers: Substituent effects on the rates of photochemical cleavage. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*(8), 2370-2380.
- [408] L. Ulysse, J. Chmielewski. The Synthesis of a Light-Switchable Amino-Acid for Inclusion into Conformationally Mobile Peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*(17), 2145-2146.
- [409] J. Wachtveitl, T. Nagele, B. Puell, W. Zinth, M. Kruger, S. RudolphBohner, D. Oesterhelt, L. Moroder. Ultrafast photoisomerization of azobenzene compounds. *J. Photochem. Photobiol., A* **1997**, *105*(2-3), 283-288.
- [410] D. A. James, D. C. Burns, G. A. Woolley. Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues. *Prot. Eng.* **2001**, *14*(12), 983-991.
- [411] L. Ulysse, J. Cubillos, J. Chmielewski. Photoregulation of Cyclic Peptide Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*(32), 8466-8467.
- [412] I. Willner, S. Rubin. Control of the structure and functions of biomaterials by light. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*(4), 367-385.
- [413] H. Asanuma, T. Ito, T. Yoshida, X. G. Liang, M. Komiyama. Photoregulation of the formation and dissociation of a DNA duplex by using the cis-trans isomerization of azobenzene. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*(16), 2393-2395.
- [414] A. M. Caamano, M. E. Vazquez, J. Martinez-Costas, L. Castedo, J. L. Mascarenas. A light-modulated sequence-specific DNA-binding peptide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*(17), 3104-3107.
- [415] C. Renner, R. Behrendt, S. Sporlein, J. Wachtveitl, L. Moroder. Photomodulation of conformational states. I. Mono- and bicyclic peptides with (4-amino)phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* **2000**, *54*(7), 489-500.
- [416] M. J. Cook, A. M. Nygard, Z. X. Wang, D. A. Russell. An evanescent field driven monomolecular layer photoswitch: coordination and release of metallated macrocycles. *Chem. Comm.* **2002**, *10*, 1056-1057.
- [417] M. Goodman, A. Kossoy. Conformational aspects of polypeptide structure. XIX. Azoaromatic side chain effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*(21), 5010-5015.
- [418] A. Cattani-Scholz, C. Renner, C. Cabrele, R. Behrendt, D. Oesterhelt, L. Moroder. Photosensitive cyclic bis(cysteiny)peptides as catalysts of oxidative protein folding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *41*(2), 289-292.
- [419] O. Pieroni, A. Fissi, N. Angelini, F. Lenci. Photoresponsive polypeptides. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 9-17.
- [420] J. R. Kumita, D. G. Flint, O. S. Smart, G. A. Woolley. Photo-control of peptide helix content by an azobenzene cross-linker: steric interactions with underlying residues are not critical. *Prot. Eng.* **2002**, *15*(7), 561-569.
- [421] G. Fridkin, C. Gilon. Azo cyclization: peptide cyclization via azo bridge formation. *J. Pept. Res.* **2002**, *60*(2), 104-111.
- [422] C. Renner, J. Cramer, R. Behrendt, L. Moroder. Photomodulation of conformational states. II. Mono- and bicyclic peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* **2000**, *54*(7), 501-514.
- [423] C. Renner, R. Behrendt, N. Heim, L. Moroder. Photomodulation of conformational states. III. Water-soluble bis-cysteiny-peptides with (4-aminomethyl) phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* **2002**, *63*(6), 382-393.

- [424] T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz, H. E. Gaub. Single-molecule optomechanical cycle. *Science* **2002**, 296(5570), 1103-1106.
- [425] M. Schütt, S. S. Krupka, A. G. Milbradt, S. Deindl, E. K. Sinner, D. Oesterhelt, C. Renner, L. Moroder. Photocontrol of cell adhesion processes: Model studies with cyclic azobenzene-RGD peptides. *Chem. Biol.* **2003**, 10(6), 487-490.
- [426] A. G. Milbradt, M. Loweneck, S. S. Krupka, M. Reif, E. K. Sinner, L. Moroder, C. Renner. Photomodulation of conformational states. IV. Integrin-binding RGD-peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent. *Biopolymers* **2005**, 77(5), 304-313.
- [427] C. Renner, U. Kusebauch, M. Löweneck, A. G. Milbradt, L. Moroder. Azobenzene as photoresponsive conformational switch in cyclic peptides. *J. Pept. Res.* **2005**, 65(1), 4-14.
- [428] D. G. Flint, J. R. Kumita, O. S. Smart, G. A. Woolley. Using an azobenzene cross-linker to either increase or decrease peptide helix content upon trans-to-cis photoisomerization. *Chemistry & Biology* **2002**, 9(3), 391-397.
- [429] C. Corporation, 7.0 (2002) ed., Cambridge, MA, **2002**.
- [430] Biosym/MSI, 2.9.7/95.0/3.00 UserGuide ed., San Diego, **1995**.
- [431] N. M. Green. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* **1990**, 184, 51-67.
- [432] W. A. Hendrickson, A. Pahler, J. L. Smith, Y. Satow, E. A. Merritt, R. P. Phizackerley. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *PNAS* **1989**, 86(7), 2190-2194.
- [433] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **1989**, 243(4887), 85-88.
- [434] G. Gitlin, E. A. Bayer, M. Wilchek. Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. Tyrosine residues are involved in the binding site. *Biochem. J.* **1990**, 269(2), 527-530.
- [435] A. Chilkoti, P. S. Stayton. Molecular-Origins of the Slow Streptavidin-Biotin Dissociation Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117(43), 10622-10628.
- [436] M. L. Jones, G. P. Kurzban. Noncooperativity of biotin binding to tetrameric streptavidin. *Biochemistry* **1995**, 34(37), 11750-11756.
- [437] K. Hofmann, F. M. Finn. Receptor affinity chromatography based on the avidin-biotin interaction. *Ann. NY Acad. Sci.* **1985**, 447, 359-372.
- [438] R. Y. Lue, G. Y. Chen, Q. Zhu, M. L. Lesaichere, S. Q. Yao. Site-specific immobilization of biotinylated proteins for protein microarray analysis. *Methods Mol. Biol.* **2004**, 264, 85-100.
- [439] B. O. Dabbousi, J. RodriguezViejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101(46), 9463-9475.
- [440] L. Leelaswatanakij, J. V. Aldrich. A solid-phase synthetic strategy for the preparation of peptide-based affinity labels: synthesis of dynorphin A analogs. *J. Pept. Res.* **2000**, 56(2), 80-87.
- [441] S. Cesana, J. Auernheimer, R. Jordan, H. Kessler, O. Nuyken. First Poly(2-oxazoline)s with Pendant Amino Groups. *Macromol. Chem. Phys.*, *accepted*.
- [442] E. Rozengurt. Convergent signalling in the action of integrins, neuropeptides, growth factors and oncogenes. *Cancer Surv.* **1995**, 24, 81-96.
- [443] S. L. Bellis, J. T. Miller, C. E. Turner. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270(29), 17437-17441.
- [444] M. D. Schaller, J. T. Parsons. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Mol. Cell Biol.* **1995**, 15(5), 2635-2645.
- [445] C. E. Turner. Paxillin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, 30(9), 955-959.
- [446] K. Burridge, C. E. Turner, L. H. Romer. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell. Biol.* **1992**, 119(4), 893-903.
- [447] G. A. Cook, D. A. Wilkinson, J. T. Crossno, Jr., R. Raghov, L. K. Jennings. The tetraspanin CD9 influences the adhesion, spreading, and pericellular fibronectin matrix assembly of Chinese hamster ovary cells on human plasma fibronectin. *Exp. Cell. Res.* **1999**, 251(2), 356-371.
- [448] J. P. Bearinger, D. G. Castner, K. E. Healy. Biomolecular modification of p(AAm-co-EG/AA) IPNs supports osteoblast adhesion and phenotypic expression. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1998**, 9(7), 629-652.

- [449] J. P. Spatz, Persönliche Mitteilung, **2004**
- [450] K. E. Gottschalk, H. Kessler. A computational model of transmembrane integrin clustering. *Structure (Camb)* **2004**, *12*(6), 1109-1116.
- [451] J.-S. Bae, S.-H. Lee, J.-E. Kim, J.-Y. Choi, R.-W. Park, J. Y. Park, H.-S. Park, Y.-S. Sohn, D.-S. Lee, E. B. L. Lee, I.-S. Kim.  $\beta$ ig-h3 supports keratinocyte adhesion, migration, and proliferation through  $\alpha 3\beta 1$  integrin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *294*(5), 940-948.
- [452] H. K. Kleinman, J. Graf, Y. Iwamoto, M. Sasaki, C. S. Schasteen, Y. Yamada, G. R. Martin, F. A. Robey. Identification of a second active site in laminin for promotion of cell adhesion and migration and inhibition of in vivo melanoma lung colonization. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *272*(1), 39-45.
- [453] S. Pattaramalai, K. M. Skubitz, A. P. Skubitz. A Novel Recognition Site on Laminin for the  $\alpha 3\beta 1$  Integrin. *Exp. Cell. Res.* **1996**, *222*(2), 281-290.
- [454] K. Tashiro, A. Monji, I. Yoshida, Y. Hayashi, K. Matsuda, N. Tashiro, Y. Mitsuyama. An IKLLI-containing peptide derived from the laminin  $\alpha 1$  chain mediating heparin-binding, cell adhesion, neurite outgrowth and proliferation, represents a binding site for integrin  $\alpha 3\beta 1$  and heparan sulphate proteoglycan. *Biochem. J.* **1999**, *340*(1), 119-126.
- [455] H. Rink. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenylmethylester resin. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*(33), 3787-3790.
- [456] S. A. Latt, G. Stetten. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **1976**, *24*(1), 24-33.
- [457] D. Gerlier, N. Thomasset. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **1986**, *94*(1-2), 57-63.
- [458] M. Gurrath. Design, Synthese, Konformationsanalyse und Struktur-Wirkungs-Beziehungen biologisch aktiver RGD-Peptide. TU München (München), **1992**.
- [459] D. Finsinger. Peptidische und peptidanaloge Antagonisten des Integrins  $\alpha v\beta 3$  Beiträge zum Verständnis zellulärer Adhäsion. Dissertation, TU München (München), **1997**.
- [460] P. Schaffner. Biologische Aktivierung von Implantatoberflächen -Zyklisches RGD erwirkt verstärkte Knochenneogenese-. Dissertation, TU Darmstadt (Darmstadt), **2003**.
- [461] P. J. Fraker, J. C. Speck, Jr. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diphrenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*(4), 849-857.
- [462] A. E. Bolton. Comparative methods for the radiolabeling of peptides. *Methods Enzymol.* **1986**, *124*, 18-29.
- [463] R. Haubner, H. J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Diefenbach, H. Kessler, G. Stöcklin, M. Schwaiger. Radiolabeled  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists: A new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* **1999**, *40*(6), 1061-1071.
- [464] E. A. Kitas, J. W. Perich, R. B. Johns, G. W. Tregear. The Efficient Synthesis of a O-Phosphotyrosine-Containing Peptide Using Modern Deprotection Methods. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*(29), 3591-3592.
- [465] G. A. Sulyok, C. Gibson, S. L. Goodman, G. Hölzemann, M. Wiesner, H. Kessler. Solid-phase synthesis of a nonpeptide RGD mimetic library: new selective  $\alpha v\beta 3$  integrin antagonists. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*(12), 1938-1950.
- [466] C. Gibson, G. A. G. Sulyok, D. Hahn, S. L. Goodman, G. Hölzemann, H. Kessler. Nonpeptidic  $\alpha v\beta 3$  Integrin Antagonist Libraries: On-Bead Screening and Mass Spectrometric Identification without Tagging. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(1), 165-169.
- [467] C. J. Gray, M. Quibell, N. Baggett, T. Hammerle. Incorporation of azaglutamine residues into peptides synthesised by the ultra-high load solid (gel)-phase technique. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*(5), 351-362.
- [468] J. Gante. Azapeptides. *Synth. Commun.* **1989**, *17*(6), 405-413.
- [469] J. Gante. Peptide mimetics - tailor-made enzyme inhibitors. *Angew. Chem.* **1994**, *106*(17), 1780-1802.
- [470] C. Gibson. Kombinatorische Festphasensynthese und biologische Evaluation niedermolekularer RGD-Mimetika. Dissertation, TU München (München), **2000**.

- [471] G. Cardillo, L. Gentilucci, A. Tolomelli, C. Tomasini. A Stereoselective Synthesis of (2R,3S)-N-Benzoylphenylisoserine Methyl Ester. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2351-2353.
- [472] D. R. Bolin, I.-I. Sytwu, F. Humiec, J. Meierhofer. Preparation of oligomer-free N-alpha-Fmoc and N-alpha-urethane amino acids. *Int. J. Peptide Proteins Res.* **1989**, *33*, 353-359.
- [473] V. W. Rodionov, E. A. Postovskii. Mechanism of formation of  $\beta$ -aryl- $\beta$ -amino fatty acids by the condensation of aromatic aldehydes with malonic acid and its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1929**, *51*, 841-847.
- [474] F. A. Carey, R. J. Sundberg, Die Knoevenagel-Kondensation, in *Organische Chemie* (Eds.: H. J. Schäfer, D. Hoppe, G. Erker), VCH, Weinheim, **1995**, pp. 830-831.
- [475] C. Gibson, S. L. Goodman, D. Hahn, G. Hölzemann, H. Kessler. Novel Solid-Phase Synthesis of Azapeptides and Azapeptoides via Fmoc-Strategy and Its Application in the Synthesis of RGD-Mimetics. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*(20), 7388-7394.
- [476] Y. Wu, G. R. Matsueda, M. Bernatowicz. An Efficient Method for the Preparation of Bis-Urethane Protected Arginine Derivatives. *Synth. Commun.* **1993**, *23*(21), 2055-3060.
- [477] A. Hamilton, Y. Hamuro, Preparation of multiple peptide loops attached to a molecular scaffold as synthetic antibody mimics, **1998**, US 5770380 A; CA Abstract Number 129:95721.
- [478] B. R. Neustadt, E. M. Smith, T. Nechuta, Y. Zhang. Combinatorial Libraries Based on a Novel and Readily Accessible "Centroid" Scaffold. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5317-5320.
- [479] C. Dahmen, J. Auernheimer, A. Meyer, A. Enderle, S. L. Goodman, H. Kessler. Improving implant materials by coating with nonpeptidic, highly specific integrin ligands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(48), 6649-6652.
- [480] J. Bishop, A Process for the Preparation of a Thrombus Imaging Agent, **2000**, WO 2000021982 A1; CA Abstract Number 132:294012.
- [481] M. A. Poss, E. Iwanowicz, J. A. Reid, J. Lin, Z. Gu. A mild and efficient method for the preparation of guanidines. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*(40), 5933-5936.
- [482] T. Kometani, D. S. Watt, T. Ji. Iodination of phenols using chloramine T and sodium iodide. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*(17), 2043-2046.
- [483] A. J. Herlt, J. J. Kibby, R. W. Rickards. Synthesis of Unlabelled and Carboxyl-Labelled 3-Amino-5-hydroxybenzoic Acid. *Aust. J. Chem.* **1981**, *34*, 1319-1324.
- [484] G. M. Morris, D. S. Goodsell, A. J. Olson, AutoDock3.0 beta ed., **1993**.
- [485] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an epimerical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*(14), 1639-1662.
- [486] L. Marinelli, A. Lavecchia, K. E. Gottschalk, E. Novellino, H. Kessler. Docking studies on  $\alpha v \beta 3$  integrin ligands: pharmacophore refinement and implications for drug design. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*(21), 4393-4404.
- [487] B. Jeschke, J. Meyer, A. Jonczyk, H. Kessler, P. Adamietz, N. M. Meenen, M. Kantlehner, C. Goepfert, B. Nies. RGD-peptides for tissue engineering of articular cartilage. *Biomaterials* **2002**, *23*(16), 3455-3463.