

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges

Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum

16. Juni 2016 (16.06.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2016/092069 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07K 5/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

(74) Anwalt: BUCHANAN, Luke; HERTIN und Partner PartG
mbB, Rechts- und Patentanwälte, Kurfürstendamm 54/55,
10707 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2015/079410

(22) Internationales Anmeldedatum:

11. Dezember 2015 (11.12.2015)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2014 118 413.0

11. Dezember 2014 (11.12.2014)

DE

(71) Anmelder: FORSCHUNGSVERBUND BERLIN E.V.

[DE/DE]; Rudower Chaussee 17, 12489 Berlin (DE).

UNIVERSITÄT ZU KÖLN [DE/DE]; Albertus-Magnus-

Platz, 50923 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder: KÜHNE, Ronald; Gleiwitzer Str. 16, 12683

Berlin (DE). SCHMALZ, Hans-Günther; Euskirchener

Str. 209, 50321 Brühl (DE). MÜLLER, Matthias;

Perleberger Str. 8A, 10559 Berlin (DE). REUTER,

Cedric; Hochstadenstr. 1-3, 50674 Köln (DE). SOICKE,

Arne; Siebenbürgenstr. 8a, 51491 Overath (DE). OPITZ,

Robert; Utrechterstr. 42, 13347 Berlin (DE). BARONE,

Matthias; Dänenstr. 6, 10439 Berlin (DE). OSCHKINAT,

Hartmut; Schonensche Str. 1, 13189 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: INHIBITORS FOR INHIBITING TUMOR METASTASIS

(54) Bezeichnung : INHIBITOREN ZUR HEMMUNG DER TUMORMETASTASIERUNG

(57) Abstract: The invention relates to chemical compounds that can be used in particular as structural mimetics of proline-rich peptides. The compounds of the invention are capable of selectively inhibiting ena/VASP-EVH1-mediated protein-protein interactions. The invention further relates to the use of said compounds as pharmaceutical active substances and to the use of the pharmaceutical active substances to treat tumor diseases. The chemical compounds of the invention can strongly inhibit the chemotaxis and motility of invasive tumor cells and thus can be used in the treatment and/or prevention of tumor metastases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft chemische Verbindungen, die insbesondere als Struktur-Mimetika prolinreicher Peptide eingesetzt werden können. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind in der Lage ena/VASP-EVH1-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen selektiv zu hemmen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieser Verbindungen als pharmazeutische Wirkstoffe sowie die Verwendung der pharmazeutischen Wirkstoffe zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Die chemischen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können die Chemotaxis und Motilität invasiver Tumorzellen stark hemmen und somit in der Behandlung und/oder Prävention von Tumormetastasen eingesetzt werden.



WO 2016/092069 A1

INHIBITOREN ZUR HEMMUNG DER TUMORMETASTASIERUNG

BESCHREIBUNG

Die vorliegende Erfindung betrifft chemische Verbindungen, die insbesondere als Struktur-Mimetika prolinreicher Peptide eingesetzt werden können. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind in der Lage ena/VASP-EVH1-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen selektiv zu hemmen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung dieser Verbindungen als pharmazeutische Wirkstoffe sowie die Verwendung der pharmazeutischen Wirkstoffe zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Die chemischen Verbindungen der vorliegenden Erfindung können die Chemotaxis und Motilität invasiver Tumorzellen stark hemmen und somit in der Behandlung und/oder Prävention von Tumormetastasen eingesetzt werden.

HINTERGRUND ZUR ERFINDUNG

Bei fast sämtlichen physiologischen und biochemischen Prozessen in lebenden Organismen spielen Wechselwirkungen zwischen Proteinen eine zentrale Rolle. Proteine erfüllen nicht nur biokatalytische Aufgaben (zum Beispiel als Enzym) sondern sind an verschiedenen biologischen Prozessen beteiligt. Eine selektive Hemmung der körperlichen Interaktion zwischen Peptidliganden und den entsprechenden Proteinrezeptoren kann einen wesentlichen Einfluss auf verschiedene biologische Mechanismen in der Zelle haben.

Es besteht daher im Stand der Technik das Bedürfnis, insbesondere bei der Behandlung von Krankheiten, Moleküle zu entwickeln, die spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen hemmen, um biologisch bzw. medizinisch relevante technische Effekte zu erzielen.

Ein Beispiel für solche Inhibitoren sind Struktur-Mimetika von Diprolin-Einheiten. Im Vergleich zu anderen Aminosäuren nimmt Prolin auf Basis seiner chemischen Struktur eine Sonderrolle ein. Prolin ist die einzige sekundäre, proteinogene Aminosäure die nach Knüpfung einer Peptidbindung über kein freies NH-Proton zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verfügt. Aus diesem Grund sind Polyprolin-Sequenzen nicht in der Lage klassische alpha-Helix oder beta-Faltblatt Sekundärstrukturen einzunehmen. Aufgrund dieser besonderen physikalischen Eigenschaften sind Polyprolin-Aminosäuresequenzen (z. B. prolinreiche Motive (PRM)) sehr gut geeignet, spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Rezeptoren (z. B. prolinreiche Motive-bindende Domänen (PBD)) zu formieren. Durch die Bereitstellung von Polyprolin-Mimetika können einige dieser Wechselwirkungen selektiv gehemmt werden.

Einige beta-turn-Peptidmimetika sind als Modulatoren von Protein-Protein-Interaktionen im Stand der Technik bekannt. Die WO 2006/067091 A1 offenbart verschiedene Peptide und Peptidmimetika, welche die Homodimerisierung von MyD88 sowie die Interaktion zwischen MyD88 und TIR verhindern. Beta-turn-Peptidmimetika sind ebenfalls als Modulatoren von Protein-Protein-Interaktionen zwischen SH3-Domänen bekannt. Es wird beispielsweise in der WO 98/54208

offenbart, dass beta-turn-Peptidmimetika, welche Polyprolin-Motive und eine alpha-Helix-Struktur aufweisen, mit SH3-Domänen interagieren können. Witter et al (Bioorg. & Med. Chem. Let. 8 (1998) 3137) und Vartak et al (Organic Let. 2006, 8:5, 983) offenbaren verschiedene beta-turn-Peptidmimetika, die als Mimetika für eine Polyprolin-Sequenz eingesetzt werden können.

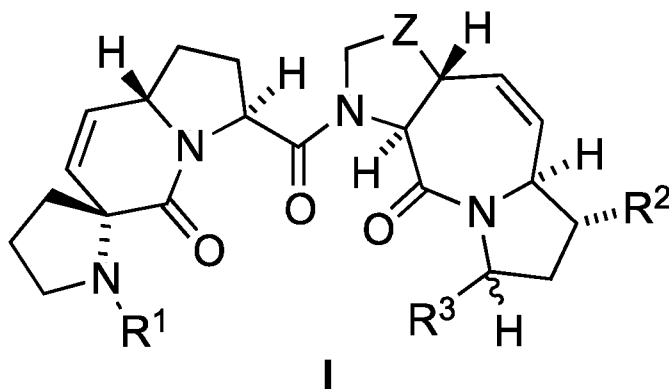
- 5 In WO 2008/040332 und in WO 2013/030111 sind weitere chemische Verbindungen offenbart, die als Diprolin-Mimetika funktionieren. Beispielsweise werden in WO 2013/030111 Peptidverbindungen offenbart, die zwei aneinandergrenzende Diprolin-Mimetika anstelle von vier Prolin-Aminosäuren aufweisen, wobei die Diprolin-Mimetika von Peptidsequenzen flankiert sind. Die darin beschriebenen Peptide zeigen eine gute Affinität zu einer VASP-EVH1-Domäne, sind jedoch auf Basis ihrer
10 besonderen Peptid-Struktur aufwändig herzustellen. Die Peptidstrukturen werden weiterhin aufgrund der Peptidstruktur und der Anwesenheit von endogenen Proteasen *in vivo* abgebaut. Einige dieser Verbindungen zeigen ebenfalls eine sub-optimale Zellpermeabilität, die für die Anwendung als Medikament durchaus nachteilhaft ist.

- Obwohl die darin offenbarten Verbindungen Protein-Protein-Wechselwirkungen durch selektive
15 Bindung an einen Rezeptor inhibieren können, besteht weiterhin das Bedürfnis, weitere Polyprolin-Mimetika bereitzustellen, die verbesserte Bindungseigenschaften und entsprechende biologische Wirkungen aufweisen.

DETAILLIERTE DARSTELLUNG DER ERFINDUNG

- Im Lichte des Standes der Technik war es daher Aufgabe der Erfindung, Verbindungen
20 bereitzustellen, die als Mimetika für polyprolinreiche Peptide verwendet werden können, insbesondere als pharmazeutische Wirkstoffe für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten. Eine weitere Aufgabe der Erfindung war die Bereitstellung von neuartigen Krebsmedikamenten, die effektiv gegen die Invasion und Motilität von Krebszellen wirken.

- Das erfindungsgemäße Problem wird gelöst durch die Bereitstellung einer Verbindung gemäß
25 Formel I:



wobei

R^1 : H, Acyl, Peptidyl, Sulfonyl, Alkyl, Aryl, Heteroaryl, wobei die Acyl, Peptidyl, Sulfonyl, Alkyl, Aryl oder Heteroaryl Substituenten gemäß R^1 optional substituiert sind;

R^2 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoralkyl oder einen heterozyklischen Substituent;

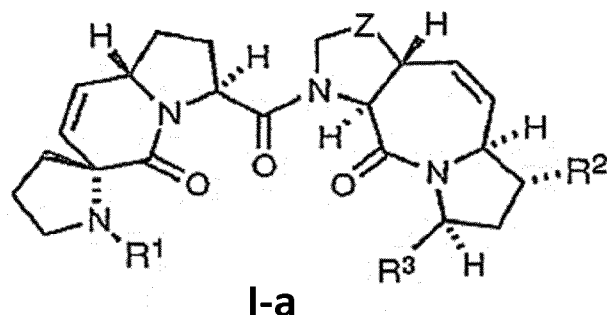
R^3 : C-enthaltener Substituent, zum Beispiel Alkyl, Acyl, bevorzugt ein Carbonsäurederivat gemäß $C(=O)X$, wobei $X = OH$, O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit $R, R' = H$ oder Alkyl), $NROR'$ (mit $R, R' = H$ oder Alkyl) oder Heteroaryl;

Z: CH_2 oder CH_2CH_2 , bevorzugt CH_2 .

- Die optionale Substitution bezieht sich auf mögliche weitere Restgruppen, die an den genannten Restgruppen der Positionen R^1 , R^2 , R^3 oder R^4 vorhanden sein können. Mögliche optionale Substitutionen können vorzugsweise Halogen, Acyl, Carboxyl, Amino, Carbamoyl, OH, O-alkyl, SH, S-alkyl, Alkyl, Aryl oder Heteroaryl sein. Wenn zum Beispiel R^1 Alkyl wäre, könnte ein substituiertes Alkyl ein Fluoralkyl sein. Bevorzugte Heteroaryl-Substituenten sind Imidazol, Triazol, Tetrazol oder Oxazol.

Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen – in einigen Ausführungsformen ohne flankierende Peptidstrukturen – eine gute Affinität zum Target, eine hohe Zellpermeabilität und hohe Stabilität aufweisen. Es war im Lichte des Standes der Technik nicht zu erwarten, dass die Abwesenheit einer flankierenden Peptidstruktur an der R^3 Position keine negativen Einflüsse auf die Affinität des Moleküls zum Target haben würde. Die Verbesserungen der Affinität durch die Abwesenheit der flankierenden Peptidstrukturen an der R^3 -Position waren überraschend. Die erfindungsgemäßen Verbindungen zeigen ebenfalls eine überraschend gute Aktivität gegen die Motilität und Invasion von Krebszellen und stellen somit effektive Antikrebsreagenzien dar, die für eine klinische Anwendung geeignet sind.

Bevorzugt ist die stereochemische Konfiguration an dem Rest R^3 wie folgt zu definieren (Formel I-a):

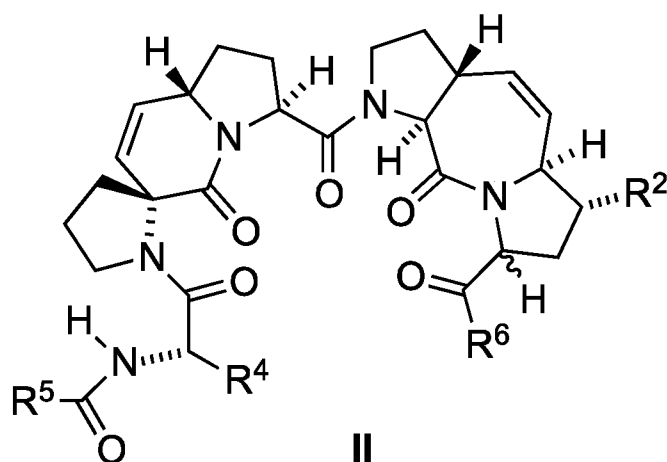


Die Substituenten für R^1 , R^2 , R^3 , Z sind für Formel I-a wie für Formel I (oben) zu definieren.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel I oder I-a, dadurch gekennzeichnet, dass R^2 : Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoralkyl oder einen heterozyklischen Substituent.

- 5 Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen nicht die Nachteile des Standes der Technik aufweisen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen verbesserte Eigenschaften auf, im Vergleich zu den bereits bekannten Verbindungen, zum Beispiel eine verbesserte Zellgängigkeit und daher erhöhte Bioverfügbarkeit. Die metabolische Stabilität der erfindungsgemäßen Verbindungen ist erhöht und die Stärke der Bindung am Target-Molekül sowie
10 die hohe Selektivität für das Target-Molekül stellen weitere Vorteile der erfindungsgemäßen Verbindungen dar.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine Verbindung gemäß der allgemeinen Formel II:



- 15 wobei

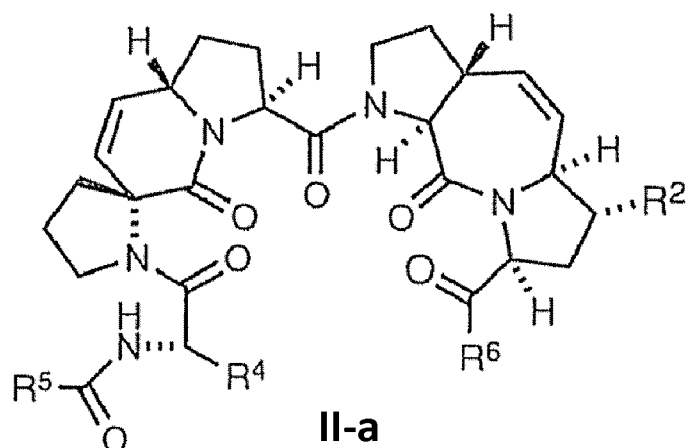
R^2 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoralkyl oder einen heterozyklischen Substituent;

- 20 R^4 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Aryl oder einen heterozyklischen Substituent, bevorzugt $-CH_2$ -aryl oder $-CH_2$ -Heteroaryl, zum Beispiel $-CH_2$ -Phenyl, $-CH_2$ -1-Naphthyl oder $-CH_2$ -3-Indolyl, wobei die Substituenten gemäß R^4 optional substituiert sind;

R^5 : H, Alkyl oder einen substituierten Alkylrest;

R^6 : OH, O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit R, R' = H, alkyl), NROR' (mit R, R' = H, Alkyl) oder Heteroaryl.

- 25 Bevorzugt ist die stereochemische Konfiguration an dem Rest COR^6 wie folgt zu definieren (Formel II-a):



Die Substituenten R^2 , R^4 , R^3 , R^5 sind für Formel II-a wie für Formel II (oben) zu definieren.

Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft Verbindungen gemäß der allgemeinen Formel II oder II-a, dadurch gekennzeichnet, dass R^2 : Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoralkyl oder einen heterozyklischen Substituent.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verbindung gemäß Formel I, I-a, II oder II-a dadurch gekennzeichnet, dass R^2 : Alkyl, ausgewählt aus der Gruppe CH_3 , C_2H_5 oder C_3H_7 , bevorzugt CH_3 oder C_2H_5 ist. Diese Substituenten ermöglichen eine besonders starke Affinität zum Target. Durch die Anwendung von Methyl oder Ethyl an der R^2 -Position kann das Molekül ideal in der Bindungstasche des Targets andocken und somit eine viel höhere Affinität verleihen.

Es ist weiterhin bevorzugt, dass der Substituent an der R^2 -Position die in der grafischen Darstellung der Formel gezeigte Stereochemie aufweist. Diese Stereochemie führt zu einer besonders hohen Affinität.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verbindung gemäß Formel I, I-a, II oder II-a dadurch gekennzeichnet, dass R^4 : CH_2 -aryl ist, insbesondere substituierte $-CH_2$ -Phenyl, wobei die Substituent an der Ortho-Position der Phenylgruppe positioniert ist, wobei der Substituent bevorzugt Halogen ist, insbesondere Cl.

Bevorzugt an der R^4 -Position ist ein Substituent positioniert, der eine 2-Cl-Phenylalanin-Struktur im Molekül (an der R^1 -Position der Formel I oder I-a) bildet. Verschiedene Halogene oder Ringstrukturen können eingesetzt werden. Als Halogen werden bevorzugt Cl, F und Br eingesetzt. Methyl oder andere bevorzugt kurzkettinge Alkylgruppen (z. B. C_1 - C_5) können ebenfalls als Substituent an der Ortho-Position der Phenylgruppe verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verbindung gemäß Formel II oder II-a dadurch gekennzeichnet, dass R^6 : O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit R, R' = H oder alkyl), NROR' (mit R, R' = H oder Alkyl) oder Heteroaryl ist. Diese Substituenten zeigen den Vorteil, dass Sie eine viel

höhere Zellpermeabilität verleihen, sodass größere Mengen des aktiven Wirkstoffes in die Zelle aufgenommen werden können.

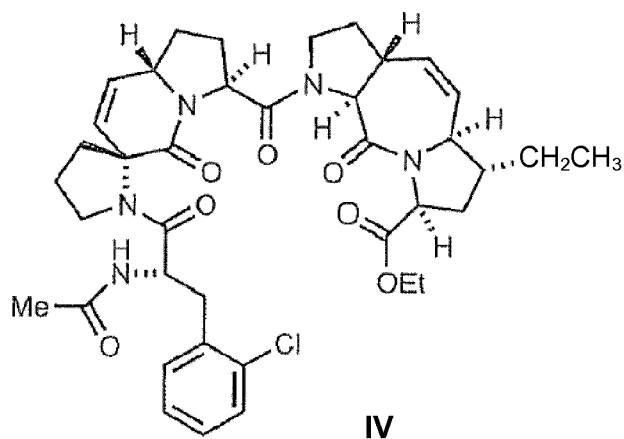
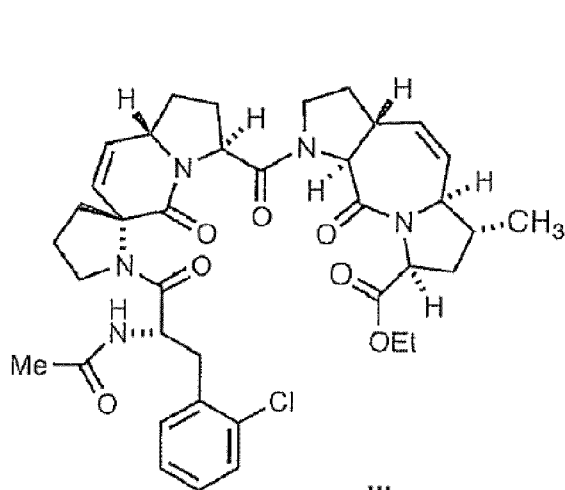
Die Ester-Gruppen an der R⁶-Position können auch unter Umständen durch endogene Enzyme nach der Verabreichung in vivo gespalten werden, so dass eine Carboxylgruppe an der R⁶ Position vorhanden ist. Die Anwesenheit der freien Carboxylgruppe an der R⁶-Position (R⁶: OH) ermöglicht eine gute Affinität gegen das Target-Protein, wirkt aber gegen die Zellpermeabilität des Moleküls. Durch die Veresterung an dieser Position können „Pro-Drugs“ erstellt werden, die eine gute Zellpermeabilität und Affinität zum Target zeigen, aber nach der Spaltung des Moleküls in vivo eine bessere Bindung und somit eine bessere Wirkung hervorrufen können.

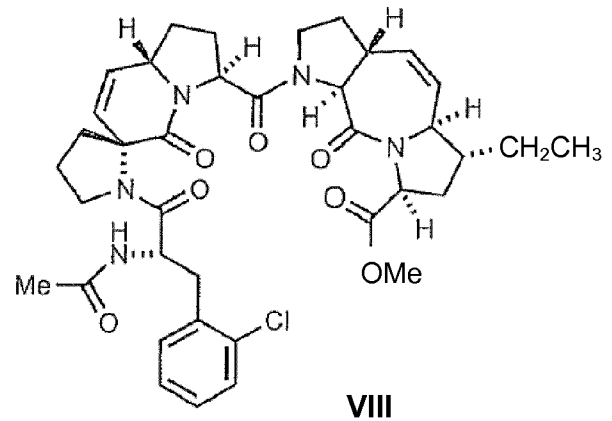
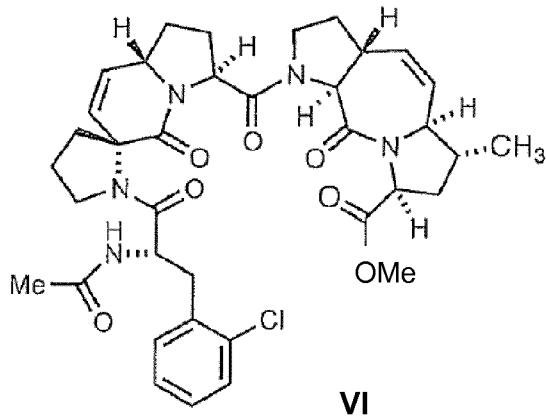
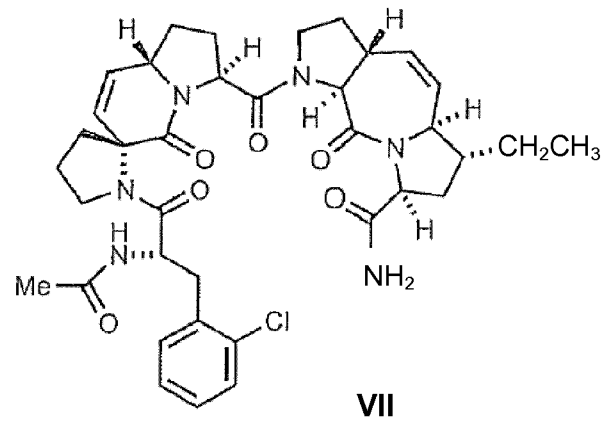
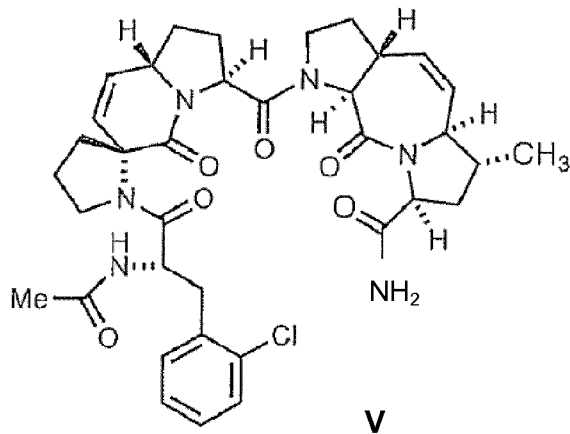
- Die Ethylester (R⁶: O-Et) werden relativ schnell in vivo gespalten, wobei die Methylester (R⁶: O-Me) und das Amid (R⁶: NH₂) eine besonders gute in vivo Stabilität zeigen.

Die Anwesenheit der NH₂-Gruppe an der R⁶-Position zeigt auch eine unerwartet gute Zellpermeabilität und Affinität zum Target.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Verbindung gemäß Formel II oder IIa dadurch gekennzeichnet, dass R⁶: O-CH₃, O-C₂H₅ oder NH₂ ist. Insbesondere diese Substituenten an der R⁴-Position ermöglichen eine optimale Kombination zwischen Zellpermeabilität und Affinität, die im Lichte des Standes der Technik nicht zu erwarten war.

In weiteren Ausführungsformen der Erfindung ist die erfindungsgemäße Verbindung durch die Formeln III, IV, V, VI, VII oder VIII gekennzeichnet:





5

- 10 Die Erfindung betrifft eine Verbindung als Ligand für eine Ena/VASP-EVH1-Domäne. Die EVH1-Domäne besteht aus etwa 115 Aminosäuren und kommt in einer Vielzahl signalgebender Multidomänenproteine vor. Neben einigen weiteren gehört dazu auch die Familie der Ena/VASP-Proteine, die als molekulare Adaptoren wirken und die Actindynamik des Cytoskeletts modulieren. Man unterteilt die EVH1-Domänen nach ihrer Ligandenpräferenz in drei Klassen. Die erste Klasse
- 15 erkennt insbesondere spezifisch ein [F/W/L]PPPP-Kernmotiv, das sich in fokalen Adhäsionsproteinen wie zum Beispiel Vinculin, Zyxin oder RIAM, in Lamellipodin, einem wichtigen Protein des Leitsaums, in einigen Proteinen des WAVE-Komplexes, wie auch im ActA-Protein des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes* wiederfindet. Ena/VASP Proteine werden außerdem in Filopodien und Invadopodien nachgewiesen, wo sie mit ihrer EVH1-Domäne mit
- 20 Forminen wechselwirken.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als Ligand für eine Domäne ausgewählt aus der Gruppe umfassend Src-Homologie-3-Domänen, WW-Domänen, GYF-Domänen, UEV-Domänen und/oder Profilin.

Die Verbindung der vorliegenden Erfindung ist in einer Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung eine Ena/VASP-EVH1-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkung inhibiert. Demgemäß betrifft die Erfindung auch die Verwendung der neuen Strukturmimetika der PolyprolinII-Helix als überraschend gute Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen, bei denen insbesondere EVH1-Domänen, SH3-Domänen, WW-Domänen, GYF-Domänen, UEV-Domänen und Profilin beteiligt sind. Proteine, die diese Domänen enthalten, wie z. B. VASP (EVH1-Domäne) oder YAP (WW) spielen u. a. bei der Regulation der Zellmotilität (insbesondere VASP) und der Zellproliferation (insbesondere YAP) eine bedeutsame Rolle. So ist beispielsweise VASP in hochinvasiven Brustkrebszellen stark überexprimiert.

Die Verbindung der vorliegenden Erfindung ist in einer Ausführungsform dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung eine Dissoziationskonstante (K_d) im Komplex mit einer Ena/VASP-EVH1-Domäne von $\leq 20 \mu\text{M}$, bevorzugt $\leq 2 \mu\text{M}$, weiterhin bevorzugt $\leq 500 \text{ nM}$ aufweist. Die besonders niedrigen Dissoziationskonstanten stellen ein überraschendes Ergebnis dar. Es war vorher weder bekannt noch im Stand der Technik erwähnt, dass Polyprolin-Mimetika solche Bindungseigenschaften an EVH1-Domänen aufweisen können.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine oder mehrere erfindungsgemäße Verbindungen, bevorzugt mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger. Bevorzugte pharmazeutische Träger sind beispielsweise Füllmittel, Streckmittel, Bindemittel, Feuchthaltemittel, Lösungsverzögerer, Sprengmittel, Resorptionsbeschleuniger, Netzmittel, Absorptionsmittel und/oder Gleitmittel.

Die Erfindung betrifft in einem bevorzugten Aspekt die Verwendung der genannten Verbindungen als pharmazeutische Wirkstoffe. Die Verwendung als pharmazeutischer Wirkstoff betrifft die Verwendung für chirurgische, therapeutische oder diagnostische Verfahren. Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt ein pharmazeutisches Mittel, das die erfindungsgemäßen Verbindungen gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden die Verbindungen als Poly-Prolin-Mimetika eingesetzt. Vorteilhafterweise findet man prolinreiche Aminosäuresequenzen insbesondere in Peptiden, die an Signaltransduktionsvorgängen, insbesondere intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind. Im Sinne der Erfindung kann der Begriff der Mimetika auch als Analoga verstanden werden. Bevorzugt ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer Modifikation von intrazellulären Signaltransduktionsvorgängen assoziiert sind, die durch Poly-Prolin-Helix-Strukturen vermittelt werden, ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tumorerkrankungen, bakterielle Infektionskrankheiten und/oder neurodegenerative Erkrankungen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen als Medikament zur Behandlung von Tumorerkrankungen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Tumorerkrankung Brustkrebs.

5 Die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung als Medikament zur Behandlung einer Tumorerkrankung wird vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung die Metastasierung eines Tumors, bevorzugt durch Inhibition der Chemotaxis und/oder Motilität der Tumorzellen auf Basis einer Störung der Aktinfilamentsynthese, inhibiert.

10 Es war völlig überraschend, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen eine besonders gute Wirksamkeit gegen die Chemotaxis und/oder Motilität von Tumorzellen zeigen würden. Die Hemmung der Chemotaxis und/oder Motilität von Tumorzellen spielt daher insbesondere eine Rolle bei der Behandlung und/oder Prävention von Tumormetastasen. Dies stellt einen unterschiedlichen technischen Effekt im Vergleich zur Hemmung der Zellproliferation dar.

15 Aktin ist ein Strukturprotein, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Es ist Bestandteil des Zytoskeletts und eines der fünf häufigsten Proteine in Eukaryoten. Aktin bildet aneinandergereiht als F-Aktin dynamische Aktinfilamente. Diese Mikrofilamente dienen der Stabilisierung der äußeren Zellform, der Ausbildung von Zellfortsätzen, intrazellulären Verlagerungen und gerichteten zellulären Bewegungen. Viele eukaryotische Zellen besitzen ein hohes Maß an Bewegungsfähigkeit, Zellmotilität oder auch Zellmigration genannt, um beispielsweise Eindringlinge im Körper unschädlich machen zu können (Zellen des Immunsystems), Wunden heilen zu können (z. B. Hautzellen) oder
20 um allgemein Zellen zu bewegen (in der Entwicklung oder bei einzelligen Organismen wie z. B. Amöben). Die Zellmigration spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle bei Krebsmetastasen. Diese Beweglichkeit beruht hauptsächlich auf zwei Prozessen: Der gerichteten Aktinpolymerisierung in die Bewegungsrichtung (geregelt durch eine Anzahl von Regulatoren die auf Signale von der Zellperipherie reagieren), und der Aktin-Myosin-Interaktion in Fibrillenbündeln (stress fibers),
25 kontraktile Zugseile, die durch die Zelle verlaufen und formgebende Elemente mit der Unterlage verspannen.

Die von den erfindungsgemäßen Verbindungen hervorgerufene Störung der Aktinfilamentsynthese stellt ebenfalls einen neuen und vorteilhaften technischen Effekt dar. Durch eine Störung der Aktinfilamentsynthese können die erfindungsgemäßen Verbindungen die Motilität der Krebszellen
30 inhibieren und somit die Krebsmetastasierung stark hemmen bzw. dieser vorbeugen.

Die bevorzugten Tumorerkrankungen sind ausgewählt aus der Gruppe umfassend Tumorerkrankungen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs, der Lunge, des Mediastinums, des Gastrointestinaltraktes, des Urogenital-Systems, des gynäkologischen Systems, der Brust, des endokrinen Systems, der Haut, Knochen- und Weichteilsarkomen, Mesotheliomen, Melanomen,
35 Neoplasmen des zentralen Nervensystems, Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen im Kindesalter, Lymphomen, Leukämien, paraneoplastischen Syndromen, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritonealen Karzinomastosen, Immunsuppression-bezogenen Malignitäten und/oder Tumor-Metastasen.

- Insbesondere kann es sich bei den Tumoren um folgende Krebsarten handeln: Adenokarzinom der Brust, der Prostata und des Dickdarms; alle Formen von Lungenkrebs, der von den Bronchien ausgeht; Knochenmarkkrebs; das Melanom; das Hepatom; das Neuroblastom; das Papillom; das Apudom; das Choristom; das Branchiom; das maligne Karzinoid-Syndrom; die Karzinoid-Herzerkrankung; das Karzinom (zum Beispiel Walker-Karzinom, Basalzellen-Karzinom, basosquamöses Karzinom, Brown-Pearce-Karzinom, duktales Karzinom, Ehrlich-Tumor, in-situ-Karzinom, Krebs-2-Karzinom, Merkel-Zellen-Karzinom, Schleimkrebs, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Haferzellen-Karzinom, papilläres Karzinom, szirrhöses Karzinom, bronchiolo-alveoläres Karzinom, Bronchial-Karzinom, Plattenepithelkarzinom und Transitionalzell-Karzinom);
- histiocytische Funktionsstörung; Leukämie (zum Beispiel in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie, akut lymphozytische Leukämie, chronisch-lymphozythische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie); maligne Histiocytose, Hodgkin-Krankheit, non-Hodgkin-Lymphom, solitärer Plasmazelltumor; Reticuloendotheliose, Chondroblastom;
- Chondrom, Chondrosarkom; Fibrom; Fibrosarkom; Riesenzell-Tumore; Histiocytom; Lipom; Liposarkom; Leukosarkom; Mesotheliom; Myxom; Myxosarkom; Osteom; Osteosarkom; Ewing-Sarkom; Synoviom; Adenofibrom; Adenolymphom; Karzinosarkom; Chordom; Craniopharyngiom; Dysgerminom; Hamartom; Mesenchymom; Mesonephrom; Myosarkom; Ameloblastom; Cementom; Odontom; Teratom; Thymom; Chorio-blastom; Adenokarzinom; Adenom; Cholangiom;
- Cholesteatom; Cylindrom; Cystadeno-carcinom; Cystadenom; Granulosa-zelltumor; Gynadroblastom; Hidradenom; Inselzelltumor; Leydig-Zelltumor; Papillom; Sertoli-Zell-Tumor; Thekazell-tumor; Leiomyom; Leiomyosarkom; Myoblastom; Myom; Myosarkom; Rhabdomyom; Rhabdomyosarkom; Ependynom; Ganglioneurom; Gliom; Medulloblastom; Meningiom; Neurilemmom; Neuroblastom; Neuroepitheliom; Neurofibrom; Neurom; Paragangliom; nicht-chromaffines Paragangliom; Angiokeratom; angiolymphoide Hyperplasie mit Eosinophilie; sclerosierendes Angiom; Angiomatose; Glomangiom; Hemangioendotheliom; Hemangiom; Hemangiopericytom, Hemangiosarkom; Lymphangiom, Lymphangio-myom, Lymphangiosarkom; Pinealom; Cystosarkom phyllodes; Hemangiosarkom; Lymphangiosarkom; Myxosarkom; Ovarialkarzinom; Sarkom (zum Beispiel Ewing-Sarkom, experimentell, Kaposi-Sarkom und Mastzell-Sarkom); Neoplasmen (zum Beispiel Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des Verdauungssystems, colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen, Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des urogenitaltrakts); Neuro-fibromatose und zervikale Plattenepitheldysplasie.
- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs umfassend Tumoren der inneren Nase, der Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, der Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, des Ohres, der Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren der Lunge umfassend nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums, Tumoren des Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des Ösophagus, des

Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und Rektumkarzinome und Analkarzinome, Urogenitaltumoren umfassend Tumoren der Nieren, der Harnleiter, der Blase, der Prostata, der Harnröhre, des Penis und der Hoden, gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren des Zervix, der Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne
5 Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des Eileiters (Tuba Fallopii), Tumoren der Bauchhöhle, Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde, endokrine Pankreastumoren, Karzinoidtumoren und Karzinoidsyndrom, multiple endokrine Neoplasien, Knochen- und Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome umfassend kutane und intraokulare Melanome, Tumoren des zentralen
10 Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend Retinoblastom, Wilms Tumor, Neurofibromatose, Neuroblastom, Ewing-Sarkom Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, primäre Lymphome des zentralen Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und lymphatische Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen, myelodysplastische Syndrome,
15 paraneoplastische Syndrome, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritoneale Karzinomatose, Immunsuppression-bezogene Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-Sarkom, AIDS-assoziierte Lymphome, AIDS-assoziierte Lymphome des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziiierter Morbus Hodgkin und AIDS-assoziiierter anogenitale Tumoren, Transplantations-bezogene Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend
20 Gehirnmetastasen, Lungen-metastasen, Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor ausgewählt aus der Gruppe umfassend Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen der Mammakarzinome, der Gastrointestinaltumore, einschließlich Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Pankreaskarzinome,
25 Dickdarmkrebs, Dünndarm-krebs, der Ovarialkarzinome, der Zervikalkarzinome, Lungen-krebs, Prostatakrebs, Nierenzellkarzinome und/oder Lebermetastasen.

Bei der Behandlung der genannten Krankheiten ist es besonders bevorzugt, das pharmazeutische Mittel, welches die erfindungsgemäßen Verbindungen umfasst, als Gel, Puder, Pulver, Tablette, Retard-Tablette, Premix, Emulsion, Aufgussformulierung, Tropfen, Konzentrat, Granulat, Sirup,
30 Pellet, Boli, Kapsel, Aerosol, Spray und/oder Inhalat zuzubereiten und/oder anzuwenden.

Bevorzugt liegt das pharmazeutische Mittel, welches die erfindungsgemäßen Verbindungen umfasst, in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5, bevorzugt von 0,5 bis 95,0, besonders bevorzugt von 20,0 bis 80,0 Gew.-% in einer Zubereitung vor.

Bevorzugt wird diese Zubereitung oral, subkutan, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal und/oder
35 topisch gesetzt.

Bevorzugt wird das pharmazeutische Mittel, das die erfindungsgemäßen Verbindungen enthält, in Gesamtmengen von 0,05 bis 500 mg pro kg, bevorzugt von 5 bis 100 mg pro kg Körpergewicht, je 24 Stunden eingesetzt.

Bevorzugt erfolgt die Verabreichung der erfindungsgemäßen Verbindung oder pharmazeutischen Zusammensetzung in den Patienten oral, über Injektion, topisch, vaginal, rektal und/oder nasal.

Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der mindestens eine der erfindungsgemäßen Verbindungen und/oder eines der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel, gegebenenfalls mit einer
 5 Information zum Kombinieren der Inhalte des Kits, umfasst – z. B. einen Beipackzettel oder eine Internet-Adresse, die auf Homepages mit weiteren Informationen verweist etc. Die Information zur Handhabung des Kits kann beispielsweise ein Therapie-Schema für die o. g. Krankheiten, insbesondere für die bevorzugten Krankheiten umfassen. Die Information kann jedoch auch
 10 Angaben darüber umfassen, wie die erfindungsgemäßen Erzeugnisse innerhalb einer Diagnose der genannten Krankheiten einzusetzen sind. Der erfindungsgemäße Kit kann auch in der Grundlagenforschung verwendet werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Kits zur Prophylaxe und/oder Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, bakteriellen Infektionserkrankungen oder Tumorerkrankungen.

FIGUREN

- 15 **Fig. 1:** Hemmung der Chemotaxis und Motilität hoch invasiver Tumorzellen in einem Matrigel-Migrationsassay.
- Fig. 2:** Zelltoxizität der Verbindung gemäß Formel III.
- Fig. 3:** Bindung der Verbindung gemäß Formel III an ena-EVH1.
- Fig. 4:** Cyclus der angewendeten Festphasensynthese zum Aufbau der Peptidliganden.
- 20 **Fig. 5:** Bindung von SFEFPPPTEDEL an VASP-EVH1.
- Fig. 6:** Verlauf der Ligandenoptimierung bzgl. des Enthalpiegewinns $\Delta\Delta G$; links: ΔG bestimmt mittels ITC, rechts: ΔG : bestimmt mittels ITC.
- Fig. 7:** Oben: Bindung von Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OH (hinten) und Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-9]-OH (vorn) an der Proteinoberfläche, unten: Ausrichtung der
 25 zusätzlichen Methylgruppe in die Bindungstasche.

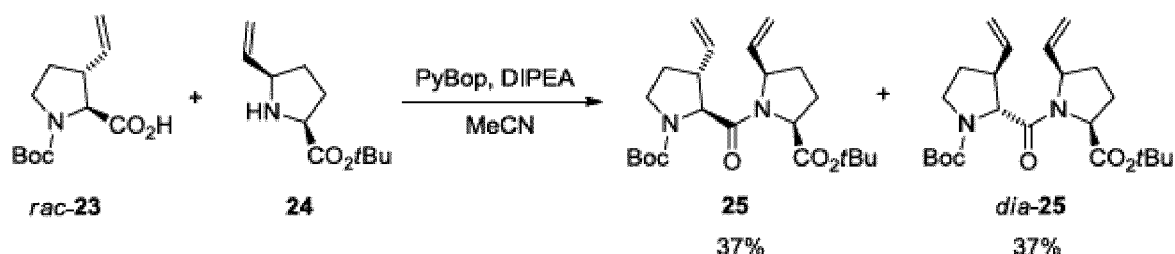
BEISPIELE

Im Folgenden soll die Erfindung anhand der Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen näher erläutert werden, ohne auf dieses beschränkt zu sein.

Beispiel 1: Synthese der Verbindungen

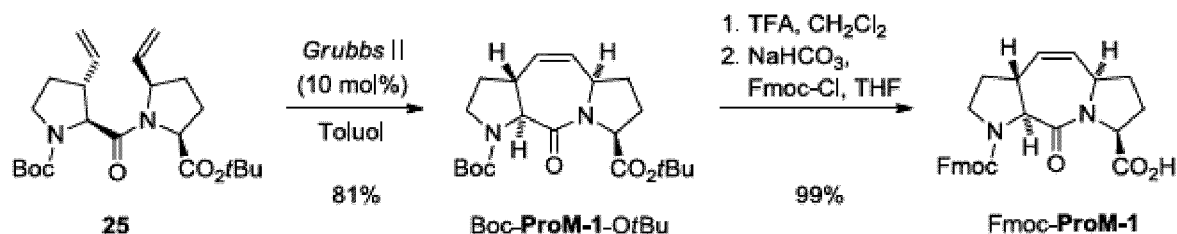
30 Synthese von Fmoc-ProM-1:

Das tricyclische Dipeptidmimetikum Fmoc-ProM-1 wurde als erster PPII-Scaffold synthetisiert und als Prolin-Prolin-Äquivalent erfolgreich in Peptidliganden eingebaut.



Schema 1: Synthese der Dipeptide 25 und *dia*-25 durch Peptidkupplung und Trennung der Diastereomere.

Im ersten Schritt wurde der racemische Säurebaustein *rac*-23 mit dem Amin 24 unter Einsatz von PyBop gekuppelt. Die dabei anfallenden Diastereomere 25 und *dia*-25 wurde nach säulenchromatographischer Trennung an Kieselgel jeweils in einer Ausbeute von 37% erhalten (Schema 4.86).

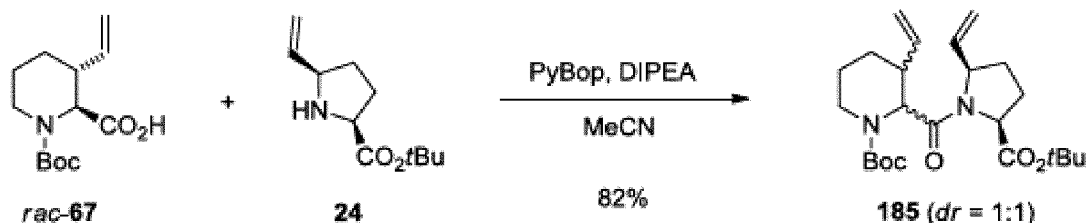


Schema 2: Synthese von Fmoc-ProM-1 durch Ringschlussmetathese und Schutzgruppenmanipulation.

Im Anschluss wurde das Dipeptid 25 unter Verwendung des *Grubbs* II-Katalysators (10 mol%) in den Tricyclus Boc-ProM-1-OtBu überführt. Die Ringschlussmetathese wurde dabei unter Refluxieren in Toluol (120 °C) durchgeführt und lieferte das gewünschte Produkt nach säulenchromatographischer Reinigung in einer Ausbeute von 81%. Nach finaler Umwandlung von Boc-ProM-1-OtBu zu Fmoc-ProM-1 (TFA/NaHCO₃, Fmoc-Cl) wurde die Zielverbindung in 99% Ausbeute isoliert (Schema 2). Die Reinigung von Fmoc-ProM-1 wurde durch automatisierte Säulenchromatographie an einem *Reveleris*® Flash-Systems (MeOH/CH₂Cl₂; Gradient: 0 – 20%) ohne Zusatz von HOAc durchgeführt.

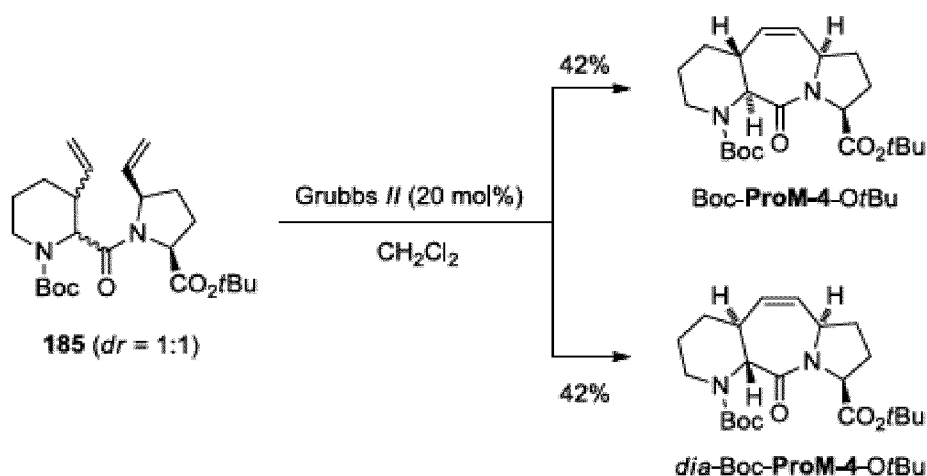
Synthese von Fmoc-ProM-4

Hierzu wurde der racemische Baustein *rac*-67 nach Aktivierung (PyBop) mit dem Ostbaustein 24 gekuppelt. Das entsprechende Dipeptid 185 wurde als diastereomeres Gemisch (*dr* = 1:1, *cis/trans*) in einer Ausbeute von 82% erhalten. Eine säulenchromatographische Trennung der beiden Isomere gelang an dieser Stelle nicht (Schema 3).



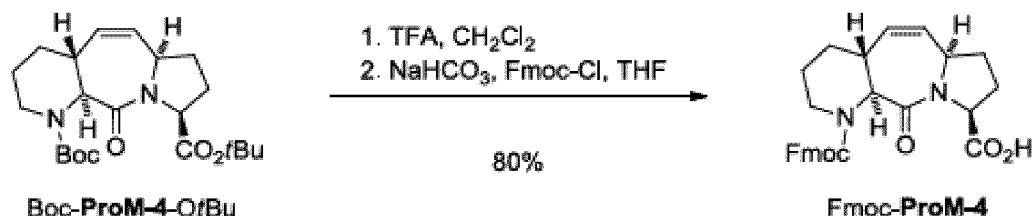
Schema 3: Peptidkupplung der Bausteine *rac*-67 und 24 zu Dipeptid 185.

Nach Umsetzung von 185 mit *Grubbs* II-Katalysator (20 mol%) in refluxierendem CH₂Cl₂ wurde das cyclisierte Rohprodukt in Form eines diastereomeren Gemisches der beiden Isomere Boc-ProM-4-OtBu und *dia*-Boc-ProM-4-OtBu erhalten. Beide Diastereomere konnten auf dieser Stufe durch Säulenchromatographie an Kieselgel voneinander getrennt werden, sodass die gewünschte Verbindung Boc-ProM-4-OtBu in 42% Ausbeute neben *dia*-Boc-ProM-4-OtBu (ebenfalls in 42%) erhalten werden konnte (Schema 4).



Schema 4: Ringschlussmetathese zu Boc-ProM-4-OtBu und *dia*-Boc-ProM-4-OtBu.

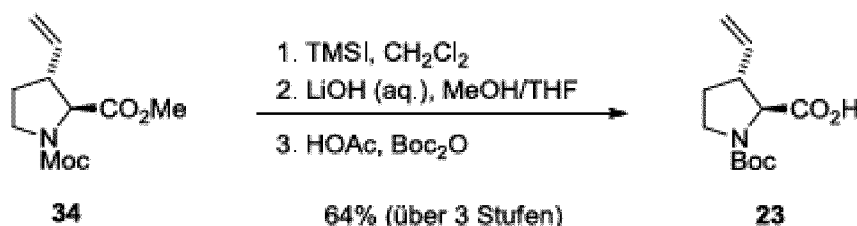
Durch vorsichtiges Entfernen des Lösungsmittels nach der chromatographischen Reinigung konnten beide Isomere in kristalliner Form erhalten werden. Die Qualität der Kristalle reichte zur Bestimmung der relativen Konfiguration durch Röntgenstrukturanalyse aus. Nach erfolgreichem Ringschluss und Trennung der Diastereomere sollte Verbindung Boc-ProM-4-OtBu im finalen Schritt durch globale Entschützung mit TFA und anschließender *N*-terminaler Fmoc-Schützung (NaHCO₃, Fmoc-Cl) in das anvisierte Mimetikum Fmoc-ProM-4 überführt werden (Schema 4.90). Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts mittels eines *Reveleris*® Flash-Säulenchromatographie-Systems (MeOH/CH₂Cl₂; Gradient: 0 – 20%) konnte das gewünschte Mimetikum Fmoc-ProM-4 in einer Ausbeute von 80% isoliert werden.



Schema 5: Finale Schutzgruppenmanipulation an Boc-ProM-4-OtBu.

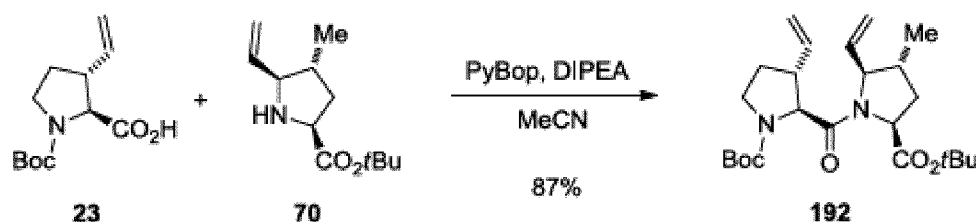
Synthese von Fmoc-ProM-9:

Für die Kupplung zum Dipeptid wurde an dieser Stelle nicht der racemische Säurebaustein *rac*-23 sondern die enantiomerenreine Verbindung 23 verwendet, um nach Kupplung mit dem Aminbaustein 70 eine möglicherweise schwierige Trennung der resultierenden Diastereomere zu vermeiden. Aus dem Moc-geschützten Prolin 34, welches mittels chiraler, präparativer HPLC durch die Bayer Pharma AG (HealthCare Pharmaceuticals) in enantiomerenreiner Form zur Verfügung gestellt wurde, konnte durch Schutzgruppenmanipulation die benötigte *N*-Boc-Carbonsäure 23 in einer Ausbeute von 64% über 3 Stufen erhalten werden (Schema 6).



Schema 6: Herstellung von 23 aus enantiomerenreinem 34.

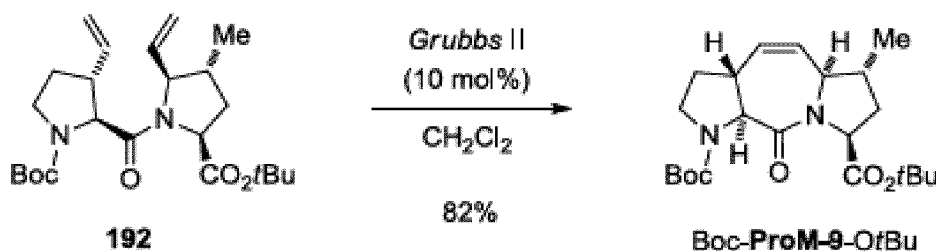
Nach der Synthese des enantiomerenreinen Westbausteins 23 wurde dieser unter Standardbedingungen mit dem Methylprolinderivat 70 gekuppelt. Nach Aktivierung mit PyBop konnte durch Reaktion bei Raumtemperatur und anschließender säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel das gewünschte Dipeptid 192 in einer Ausbeute von 87% isoliert werden (Schema 7).



Schema 7: Synthese von Verbindung 192 durch Peptidkupplung.

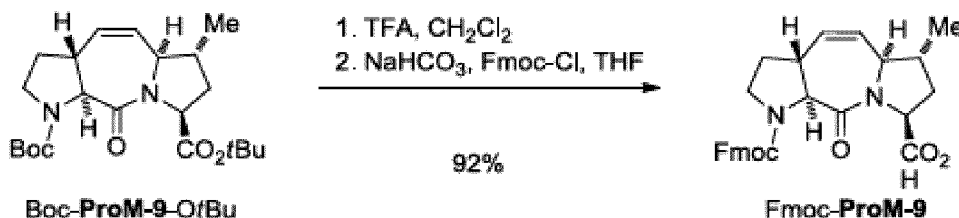
Die nachfolgende Ringschlussmetathese von 192 unter Bildung des tricyclischen Produkts Boc-ProM-9-OtBu wurde durch Einsatz von 10 mol% Grubbs II-Katalysator in refluxierendem CH₂Cl₂

durchgeführt. Ein vollständiger Umsatz konnte schon nach 8 h detektiert werden. Nach säulenchromatographischer Reinigung wurde das cyclisierte Produkt Boc-ProM-9-OtBu in 82% Ausbeute erhalten (Schema 8). Wie schon im Falle der Metathese von Boc-ProM-4-OtBu konnte nach der Säulenchromatographie, durch vorsichtiges Entfernen der Lösungsmittelreste, die Substanz in kristalliner Form erhalten und in ihrer Struktur röntgenanalytisch untersucht werden.



Schema 8: Ringschlussmetathese von 192 zum Tricyclus Boc-ProM-9-OtBu.

Im finalen Schritt der Synthese des Scaffolds Fmoc-ProM-9 bedurfte es der Schutzgruppenmanipulation am tricyclischen System Boc-ProM-9-OtBu. Nach bekannter Prozedur wurde die Verbindung global mit TFA entschützt und nachfolgend mit Fmoc-Cl im leicht basischen Milieu (NaHCO₃, pH = 7-8) N-terminal geschützt. Nach automatisierter Reinigung (*Reveleris*®-System, MeOH/CH₂Cl₂; Gradient: 0 – 20%) konnte das gewünschte Mimetikum Fmoc-ProM-9 in einer Ausbeute von 92% isoliert werden (Schema 9).

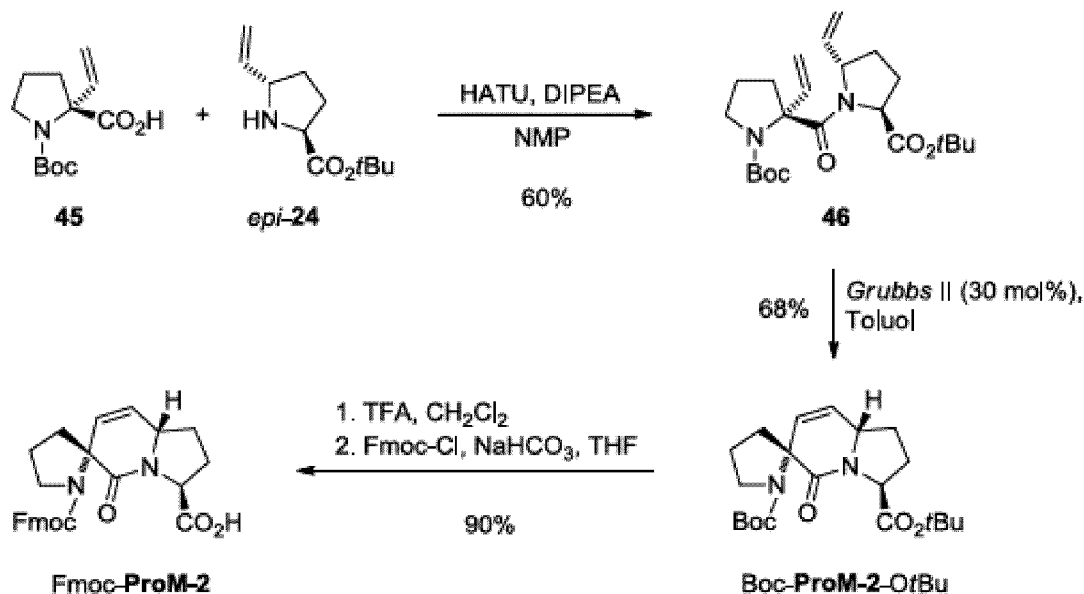


Schema 9: Komplettierung der Synthese des Mimetikums Fmoc-ProM-9.

Synthese von Fmoc-ProM-2:

Zum Aufbau der dipeptidischen Verbindung 46 wurden die beiden Bausteine 45 und *epi*-24 mit HATU und DIPEA in NMP bei 85 °C in einer Ausbeute von 60% gekuppelt. In diesem Zusammenhang war auf eine hohe (trockene) Qualität des Kupplungsreagenzes zu achten. Zur Ringschlussmetathese des Dipeptids 46 wurden die beschriebenen Bedingungen (30 mol% Grubbs II-Katalysator in CH₂Cl₂, Refluxieren) zur Erhöhung der Ausbeute (von nur 55%) verändert. So konnte nach Reaktion in refluxierendem Toluol (110-120 °C) der gewünschte Tricyclus Boc-ProM-2-OtBu in einer Ausbeute von 68% erhalten werden. Im finalen Schritt der Synthese von Fmoc-ProM-2 wurde das Metatheseprodukt zunächst global entschützt (TFA) und unter basischen Bedingungen (NaHCO₃, pH = 7-8) N-terminal Fmoc-geschützt. Nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts mittels eines *Reveleris*® Flash-Säulenchromatographie-Systems (MeOH/CH₂Cl₂;

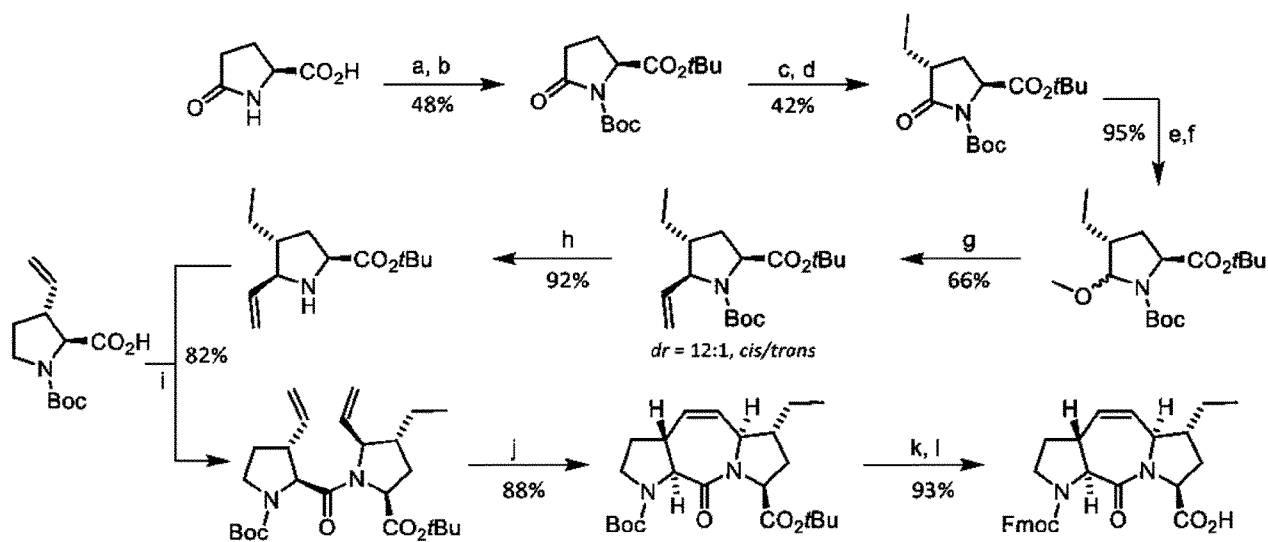
Gradient: 0 – 20%) konnte das anvisierte Mimetikum Fmoc-ProM-2 in einer Ausbeute von 90% isoliert werden. In Schema 4.98 ist die Synthesesequenz zum Aufbau von Fmoc-ProM-2 ausgehend von den Prolinbausteinen 45 und *epi*-24 nochmals dargestellt.



- 5 Schema 10: Synthese des Mimetikums Fmoc-ProM-2 ausgehend von 45 und *epi*-24.

Synthese von Fmoc-ProM-13:

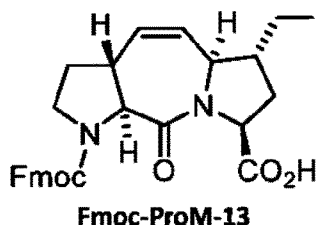
Die Synthese des Scaffolds Fmoc-ProM-13 wurde auf Basis des folgenden Schemas (Schema 11) durchgeführt:



- 10 Schema 11: Synthesebedingungen für Fmoc-ProM-13:

(a) HClO₄, tBuOAc, RT, 65 h; (b) Boc₂O, DMAP, MeCN, RT, 18 h; (c) LiHMDS, EtOTf, TPPA, THF, -78°C, 6 h; (d) TBAF, THF, 80°C, 1.5 h; (e) DIBAL-H, THF, -78°C, 2.5 h; (f) PPTS, MeOH, RT, 16 h; (g) VinylMgBr, AlCl₃, BF₃·OEt₂, -40 °C, 6 h; (h) TMSOTf, CH₂Cl₂, 0 °C, 20 min; (i) PyBOP, DIPEA, MeCN, RT, 23h; (j) Grubbs II, CH₂Cl₂, RT, 8 h; (k) TFA, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h; (l) NaHCO₃, FmocCl, THF, RT, 16 h.

Fmoc-ProM-13 weist die folgende Struktur auf:

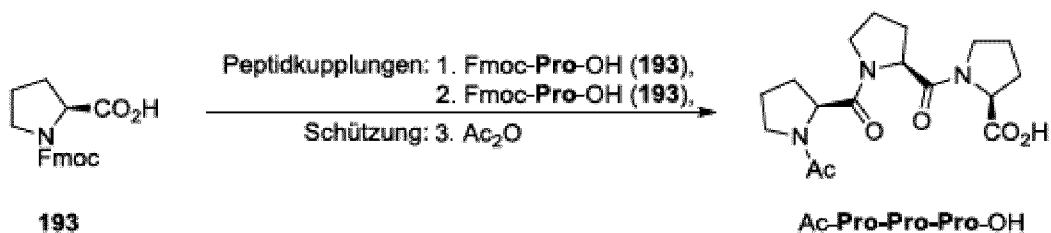


Festphasenpeptidsynthese und Liganden-Funktionalisierung:

Als Verfahren zur Herstellung der Verbindungen diente die Festphasenpeptidsynthese (SPPS, engl.: *solid phase peptide synthesis*). Der, von Merrifield 1963 entwickelte, kontrollierte Aufbau eines Polypeptids an einem festen funktionalisierten Polystyrolharz erlaubt dabei die schnelle, effektive und gegebenenfalls automatisierte Synthese von Peptiden unter milden Bedingungen. Zur schrittweisen Verdeutlichung des Kupplungszyklus ist der entsprechende Ablauf in Fig. 4 exemplarisch dargestellt. So wird zunächst entgegen der „natürlichen“ Syntheserichtung die erste Aminosäure über den C-Terminus an das Polystyrolharz gekuppelt. Nach N-terminaler Entschützung (üblicherweise Boc-, oder Fmoc-Schutzgruppenstrategien) kann anschließend eine weitere Aminosäure durch Aktivierung mit einem Kupplungsreagenz an die festphasengebundene Peptidsequenz angebracht werden. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, wobei durch Waschen des Trägerharzes überschüssige Reagenzien entfernt werden. Zur Isolierung des freien Peptids wird am Ende die Abspaltung vom Harz durchgeführt.

Unter der Anwendung einer Fmoc-Schutzgruppenstrategie wurde die Synthese von Ac-Pro-Pro-Pro-OH als Test-Verbindung (sowie der weiteren Verbindungen) in einem Reaktor unter vorsichtigem Rühren durchgeführt. Dieser bestand aus einer PET-Spritzenhülse, verbunden mit einer Pumpe zum Absaugen von Lösungsmittelresten bzw. überschüssigen Reagenzien, und konnte hierzu beliebig über eine Klammer geöffnet und geschlossen werden. Als Linker wurden Chlor(2'-chlor)trityl-Polystyrolharz-Kugeln (beads) verwendet. Als Kupplungsreagenz diente HATU in DMF. Eine 20%ige Piperidin-Lösung (DMF) wurde zur Fmoc-Entschützung eingesetzt. Detailliertere Angaben zu den verwendeten Reaktionsbedingungen, sowie den Waschprozeduren sind dem Experimentalteil zu entnehmen. Sämtliche Liganden wurden am Ende durch Zugabe von TFA vom Harz abgespalten und durch anschließende Lyophilisierung und Reinigung durch HPLC für die späteren biologischen Tests vorbereitet. Auf die synthetisierten Liganden und Funktionalisierungen (NBD-Labeling, Veresterung) soll im Folgenden eingegangen werden. So konnte nach der beschriebenen Prozedur ausgehend von Fmoc geschütztem L-Prolin (193) nach doppelter Peptidkupplung mit 189 und

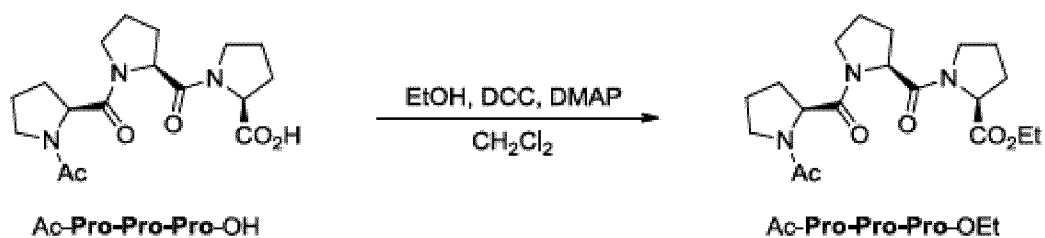
anschließender Acetylierung mit Ac_2O das gewünschte Triprolynderivat Ac-Pro-Pro-Pro-OH an der festen Phase synthetisiert werden (Fig. 4). Die erfolgreiche Synthese der Substanz konnte jedoch durch LCMS-Analytik bestätigt werden.



- 5 Schema 12: Festphasensynthese von Ac-Pro-Pro-Pro-OH ausgehend von 193.

Zur C-terminalen Veresterung des Triprolyns Ac-Pro-Pro-Pro-OH wurde die Substanz unter klassischen *Steglich*-Bedingungen (DCC, DMAP) mit EtOH bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht. Nach einer Reaktionszeit von 23 h konnte der gewünschte Ethylester Ac-Pro-Pro-Pro-OEt als Rohprodukt zur Reinigung mittels HPLC übergeben werden. Die erfolgreiche Synthese der

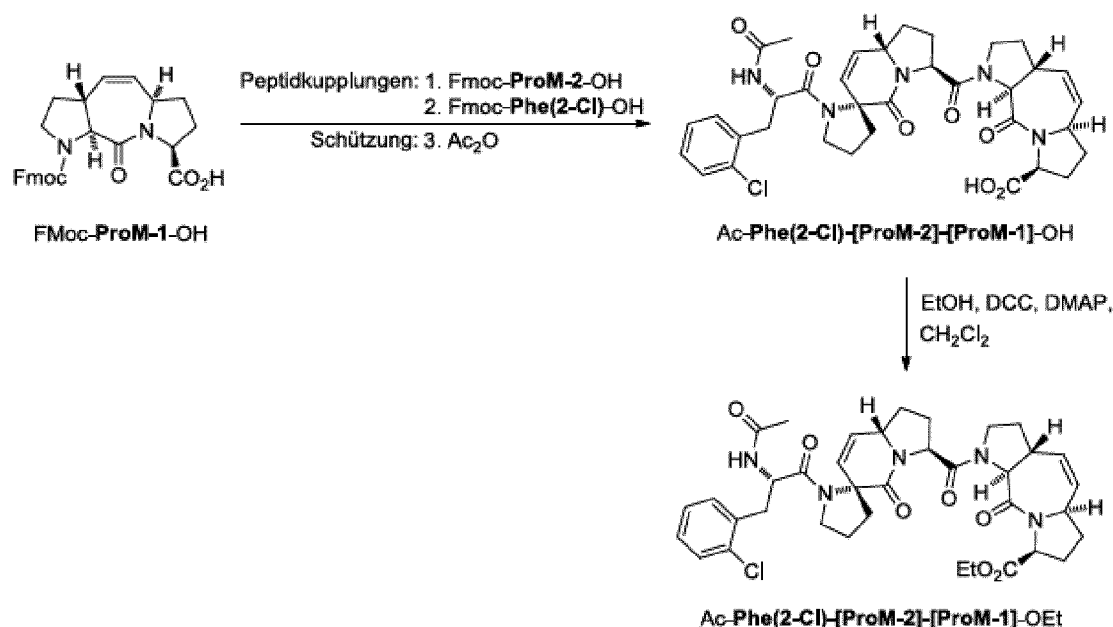
10 Substanz konnte wiederum durch LCMS-Analytik bestätigt werden.



Schema 13: *Steglich*-Veresterung von Ac-Pro-Pro-Pro-OH zu Ac-Pro-Pro-Pro-OEt.

Nach der Entwicklung einer erfolgreichen Methodik zur Veresterung von prolinreichen Liganden des Typs Ac-Pro-Pro-Pro-OEt findet diese Prozedur für die Synthese des Ethylester-Liganden Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt Anwendung. Hierzu bedurfte es zunächst dem Aufbau des Systems Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OH mittels Festphasenpeptidsynthese, wobei die schon in den

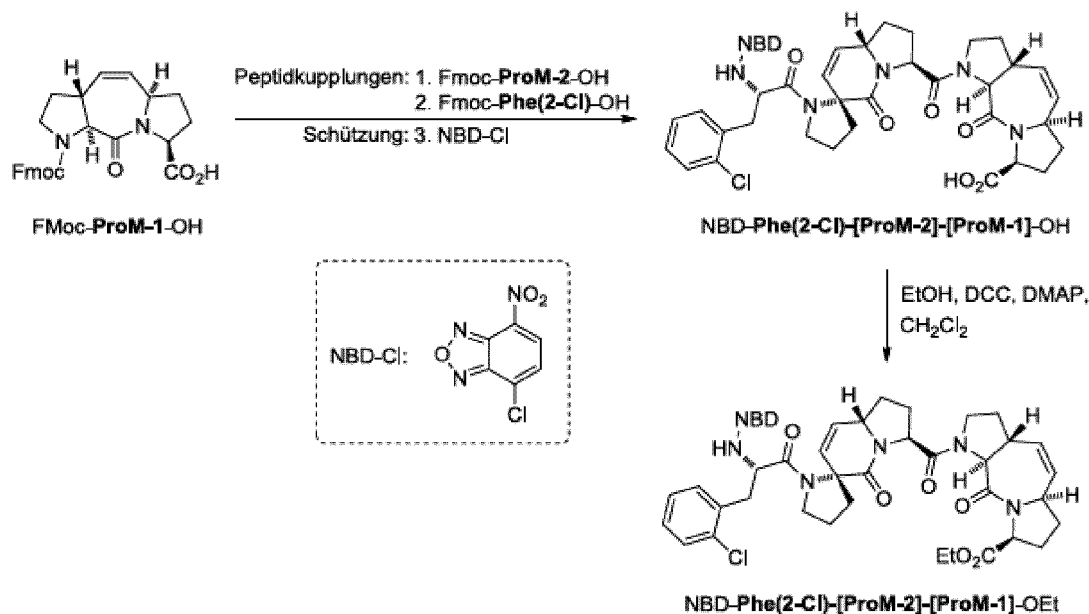
15 vorherigen Kapiteln diskutierten Fmoc-Mimetika Fmoc-ProM-1 und Fmoc-ProM-2 zum Einsatz kamen. In dieser Reihenfolge wurden beide Dipeptidanaloga an die feste Phase gebracht, im letzten Schritt mit L-2-Chlor-Phenylalanin gekuppelt und mit Ac_2O N-terminal acetyliert (Schema 14).



Schema 14: Aufbau von Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt.

Im Folgeschritt konnte der Ligand Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OH erfolgreich durch Anwendung der *Steglich*-Veresterung in sein Ethylesterderivat Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt überführt werden (Nachweis mittels LCMS-Analytik). Nach identischem Synthesemuster wurde auch der NBD-

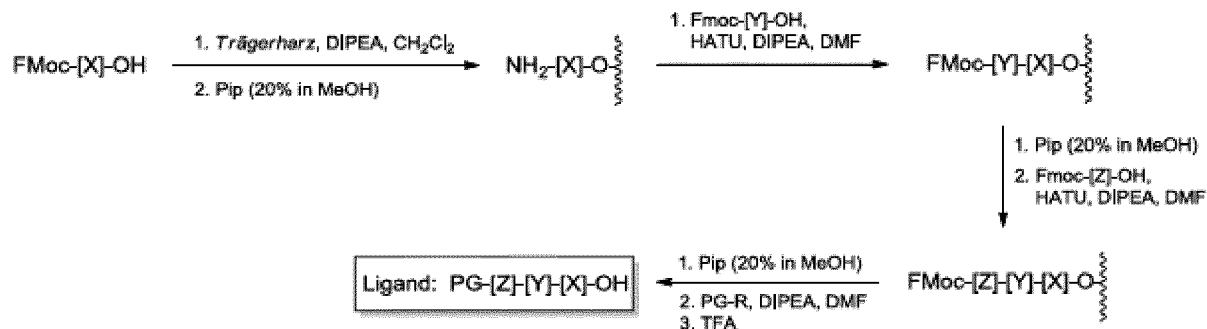
5 gelabelte Ligand Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt hergestellt (Schema 15), sodass nun beide Formen (acetyliert und NBD-gelabelt) als Ethylester für biologische Tests zur Verfügung standen.



Schema 15: Aufbau des NBD-gelabelten Liganden NBD-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt.

Versuche zur Festphasensynthese der Peptidliganden:

Allgemeine Versuchsvorschrift (A) zur Festphasensynthese der Liganden:



Harzkupplung: In einer offenen Spritzenhülse, verbunden mit einem Absaugmechanismus, wurde Chlor-(2'-chlor)trityl-Polystyrolharz (1 g / 1 mmol Säure, Kapazität = 1.19 mmol/g) in trockenem CH₂Cl₂ suspendiert und nach Zugabe von FMoc-[X]-OH (1.0 Äq.) und DIPEA (2.0 Äq.) bei RT für 2 h vorsichtig gerührt. Im Anschluss wurde das Gemisch mit MeOH/DIPEA (9:1) neutralisiert, für 15 min gerührt und nach Entfernen der Lösung mit DMF (3 × 10 ml) gewaschen.

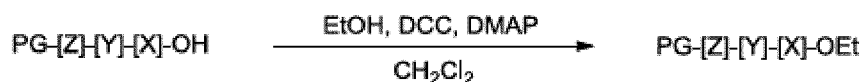
Peptidkupplung(en): Nach Entfernen des DMF wurde der Rückstand zweimal nacheinander in einer Piperidin-Lösung (10 ml, 20%ig in MeOH) bei RT für 15 min gerührt. Nach Entfernen der Lösung wurde mit CH₂Cl₂ (4 × 10 ml) nachgewaschen. Nach Entfernen des CH₂Cl₂ wurde eine Lösung aus Fmoc-[Y/Z]-OH (1.2 – 4.0 Äq.), HATU (2.0 – 4.0 Äq.) und DIPEA (4.0 – 8.0 Äq.) in DMF voraktiviert (3 min Ultraschallbad) und bei RT mit dem Trägerharz für 25 min gerührt. Im Anschluss wurde das LM entfernt und der Rückstand mit DMF und CH₂Cl₂ (jeweils 2 × 10 ml) gewaschen. Nach Entfernen der Waschlösung und eventuellem Kaisertest wurde das Harz mit einem Gemisch aus Ac₂O, DIPEA und DMF (10 ml, 1:2:7) bei RT für 10 min gerührt und mit DMF (3 × 10 ml) nachgewaschen.

Die Prozedur der Peptidkupplung konnte beliebig oft durchgeführt werden. Für die diskutierten Liganden wurde die Prozedur zweifach durchgeführt.

Schützung und Harzabspaltung: Nach Entfernen der Waschlösung wurde der Rückstand zweimal nacheinander in einer Piperidin-Lösung (10 ml, 20%ig in MeOH) bei RT für 15 min gerührt. Nach Entfernen der Lösung wurde mit CH₂Cl₂ (4 × 10 ml) nachgewaschen und die Waschlösung entfernt. Im Anschluss wurde der Rückstand entweder zur Ac-Schützung mit einem Gemisch aus Ac₂O, DIPEA und DMF (10 ml, 1:2:7) bei RT für 10 min gerührt, oder Experimenteller Teil 270 zur NBD-Schützung mit einer Lösung aus NBD-Cl (3.0 Äq.) und DIPEA (3.0 Äq.) in 2 ml DMF bei RT für 18 h geschüttelt. Das LM wurde entfernt, der Rückstand mit DMF (3 × 10 ml) gewaschen und die Waschphase entfernt. Zur finalen Harzabspaltung wurde das trockene Harz mit (2 – 10 ml) TFA bei RT für 2 h gerührt. Nach Entfernen der TFA wurde das Trägerharz mit TFA und CH₂Cl₂ (jeweils 3 × 10 ml) gewaschen. Die Waschlösungen wurden vereint und bis zur Trockne eingedampft. Das Produkt wurde nach Zugabe von Et₂O (50 ml) unter Kühlung (Kühlschrank) gefällt, abgesaugt und

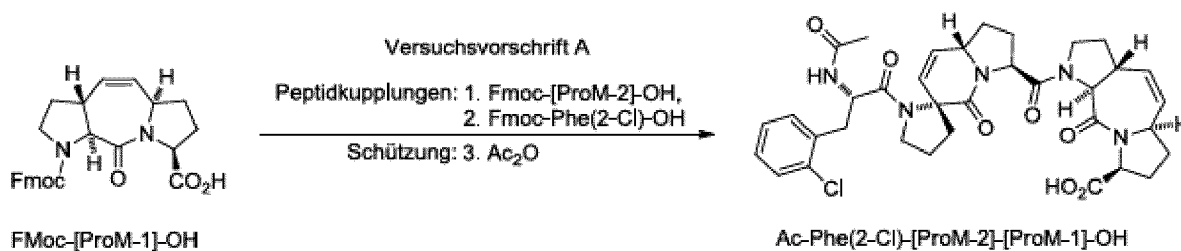
mit Et₂O (20 ml) gewaschen. Trocknen durch Lyophilisierung (MeCN/H₂O; 10 – 20 ml) lieferte den entsprechenden Peptidliganden.

Allgemeine Versuchsvorschrift (B) zur Steglich-Veresterung der Liganden:



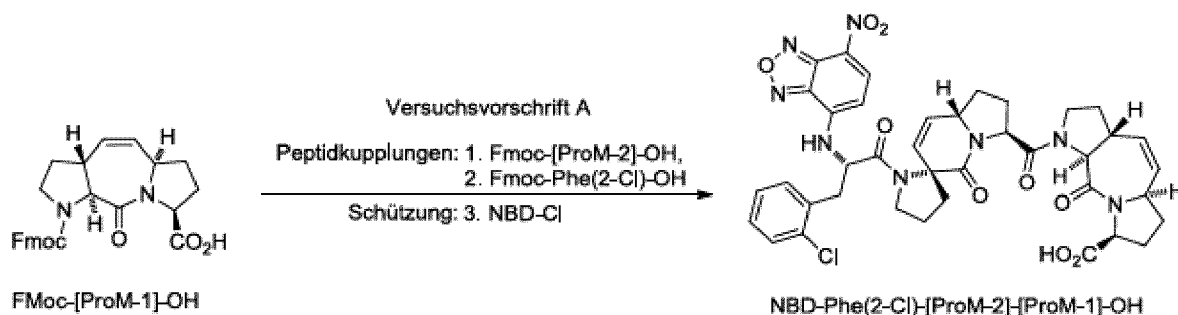
- 5 Unter Argonschutzgasatmosphäre wurde der entsprechende Ligand (1.0 Äq.) in trockenem CH₂Cl₂ (2 ml) gelöst und nach Zugabe von trockenem EtOH (5.0 – 10.0 Äq.), DCC (1.0 Äq.) und DMAP (0.1 – 0.2 Äq.) bei RT für 20 h gerührt. Im Anschluss wurde das LM unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ (5 ml) aufgenommen, über eine Glasfritte filtriert (Porengröße = 4 Å) und mit CH₂Cl₂ (3 × 5 ml) nachgewaschen. Eindampfen des Filtrats unter vermindertem Druck lieferte den
- 10 gewünschten Ester als Rohprodukt.

Synthese von Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OH nach Versuchsvorschrift (A):



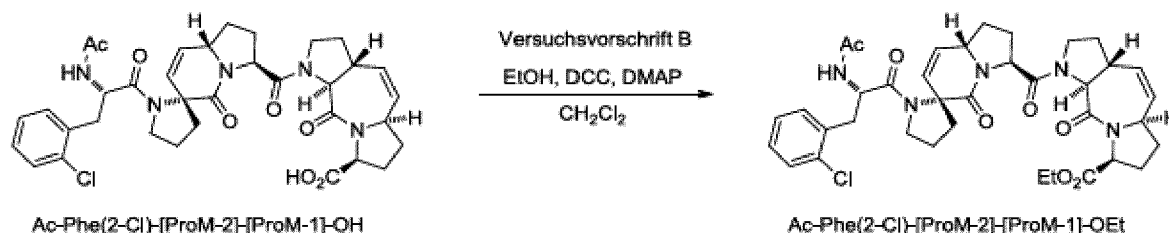
- Unter Anwendung der Allgemeinen Versuchsvorschrift A (8.2.7.1) wurde Fmoc-[ProM-1]-OH (0.136 g, 0.297 mmol) mit Chlor(2'-chlor)trityl-Polystyrolharz (0.250 g) durch Zugabe von DIPEA (101 µl, 0.594 mmol) in CH₂Cl₂ (1.7 ml) gekuppelt. Zur Peptidkuppelung wurde zuerst eine Lösung aus Fmoc-[ProM-2]-OH (0.164 g, 0.357 mmol), HATU (0.136 g, 0.357 mmol) und DIPEA (124 µl, 0.714 mmol) in DMF (1.5 ml) und dann eine Lösung aus Fmoc-Phe(2-Cl)-OH (0.251 g, 0.595 mmol), HATU (0.226 g, 0.595 mmol) und DIPEA (340 µl, 1.200 mmol) in DMF (1.5 ml) verwendet. Im Anschluss wurde das freie Amin mit einem Gemisch aus Ac₂O, DIPEA und DMF (10 ml, 1:2:7) acetyliert und mit 5 ml
- 15 TFA vom Harz gespalten. Es konnten 0.075 g des Rohpeptids als weißer Feststoff erhalten werden. Das Rohprodukt wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter aufgereinigt. (Anschließende Aufreinigung mittels präparativer HPLC). LCMS-TOF-MS (ESI): berechnet für: [M+H]⁺ 678.270; gefunden: 678.268.
- 20

Synthese von NBD-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OH nach Versuchsvorschrift (A):

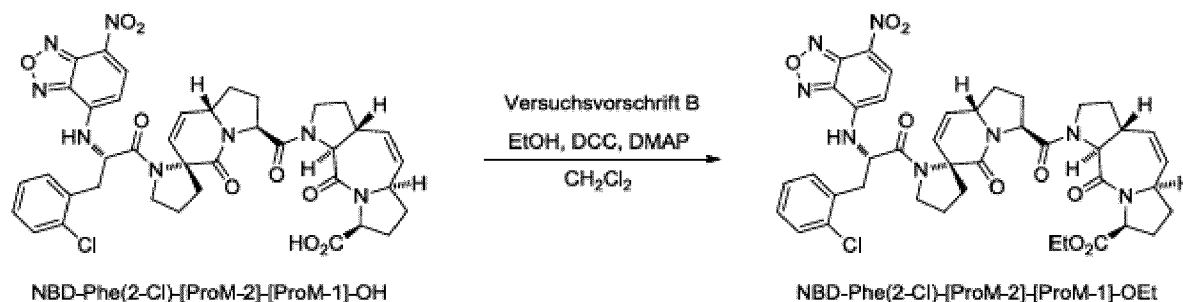


- Unter Anwendung der Allgemeinen Versuchsvorschrift A (8.2.7.1) wurde Fmoc-[ProM-1]-OH (0.075 g, 0.164 mmol) mit Chlor(2'-chlor)trityl-Polystyrolharz (0.140 g) durch Zugabe von DIPEA (60 μ l, 0.328 mmol) in CH_2Cl_2 (1.5 ml) gekuppelt. Zur Peptidkupplung wurde zuerst eine Lösung aus Fmoc-[ProM-2]-OH (0.090 g, 0.196 mmol), HATU (0.075 g, 0.196 mmol) und DIPEA (150 μ l, 0.820 mmol) in DMF (1.5 ml) und dann eine Lösung aus Fmoc-Phe(2-Cl)-OH (0.138 g, 0.328 mmol), HATU (0.125 g, 0.328 mmol) und DIPEA (120 μ l, 0.656 mmol) in DMF (1.5 ml) verwendet. Im Anschluss wurde das freie Amin mit NBD-Cl (0.098 g, 0.492 mmol) und DIPEA (90 μ l, 0.492 mmol) in DMF (10 ml) geschützt mit 3 ml TFA vom Harz gespalten. Es konnten 0.061 g des Rohpeptids als weißer Feststoff erhalten werden. Das Rohprodukt wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter aufgereinigt. (Anschließende Aufreinigung mittels präparativer HPLC). LCMS-TOF-MS (ESI): berechnet für: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 799.261; gefunden: 799.251.

Synthese von Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt nach Versuchsvorschrift (B):



- Unter Anwendung der Allgemeinen Versuchsvorschrift B (8.2.7.2) wurde Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OH (0.035 g, 0.052 mmol) mit EtOH (100 μ l), DCC (0.011 g, 0.052 mmol) und DMAP (0.001 g, 0.010 mmol) in CH_2Cl_2 (2 ml) verestert. Nach Aufarbeitung konnten 0.064 g des Rohprodukts als weißer Feststoff erhalten werden. Das Rohprodukt wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter aufgereinigt. (Anschließende Aufreinigung mittels präparativer HPLC). LCMS-TOF-MS (ESI): berechnet für: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 706.301; gefunden: 706.292. HRMS (ESI): berechnet für: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 706.301; gefunden: 706.302; berechnet für: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 728.283; gefunden: 728.284.
- 8.2.7.8 Synthese von NBD-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OEt nach Versuchsvorschrift (B)

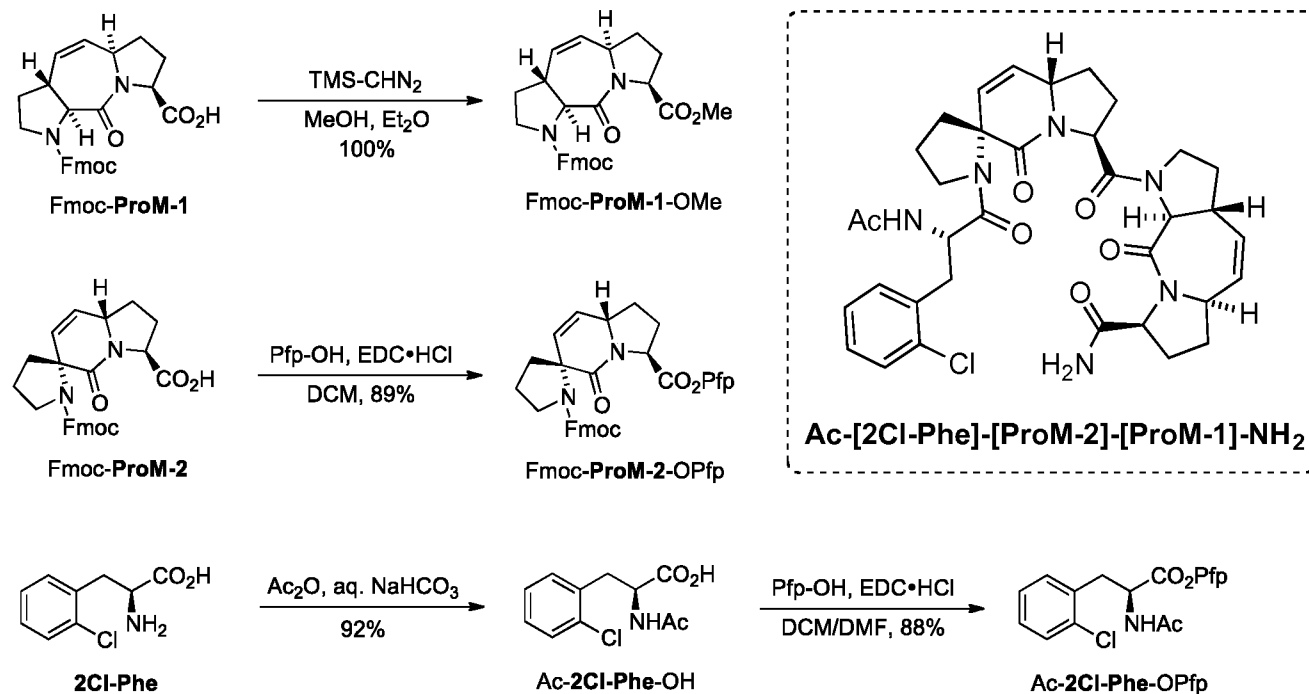


Unter Anwendung der Allgemeinen Versuchsvorschrift B (8.2.7.2) wurde NBD-Phe(2-Cl)-[ProM-2]-[ProM-1]-OH (0.061 g, 0.076 mmol) mit EtOH (200 µl), DCC (0.016 g, 0.076 mmol) und DMAP (0.001(5) g, 0.015 mmol) in CH₂Cl₂ (2 ml) verestert. Nach Aufarbeitung konnten 0.091 g des Rohprodukts als weißer Feststoff erhalten werden. Das Rohprodukt wurde im Rahmen der Arbeit nicht weiter aufgereinigt. (Anschließende Aufreinigung mittels präparativer HPLC). LCMS-TOF-MS (ESI): berechnet für: [M+H]⁺ 827.292; gefunden: 827.294.

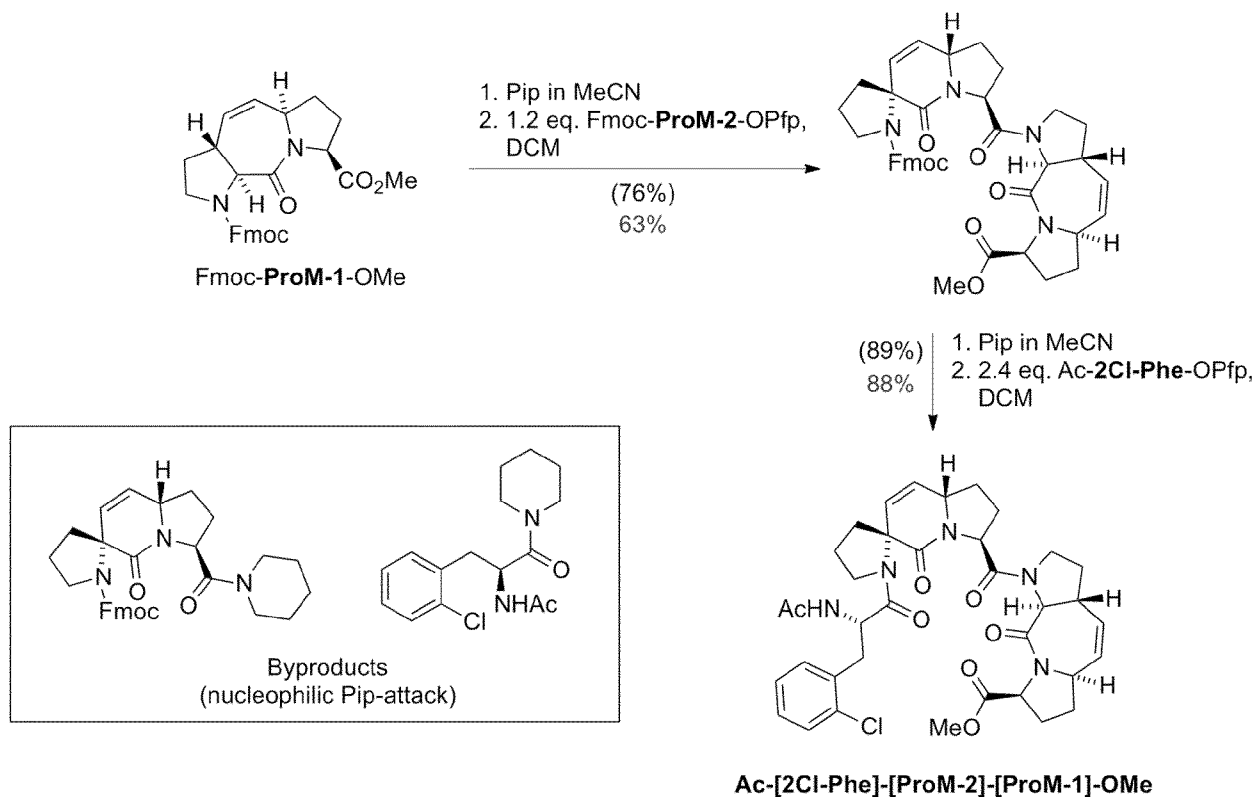
Synthese in einer Lösung:

Als eine Alternative zu der Festphasenkopplung können die erfindungsgemäßen Verbindungen durch Synthese in einer Lösung hergestellt werden.

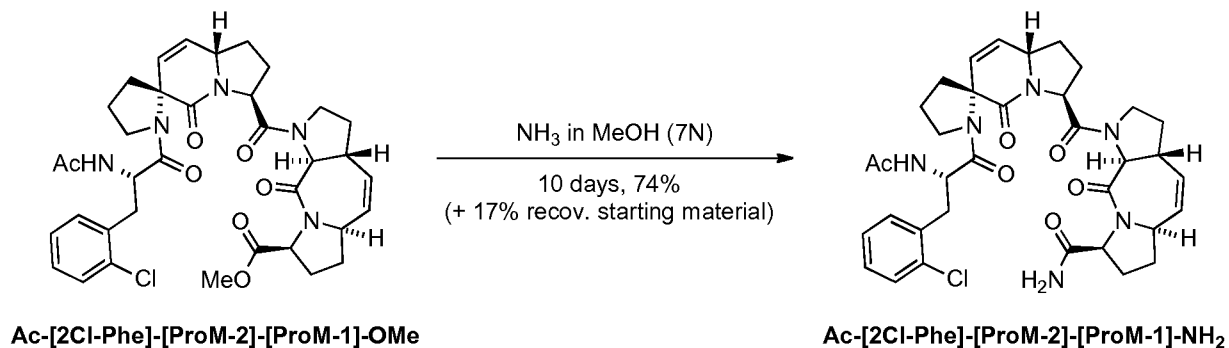
Folgendes Schema wird für den Schutz und die Aktivierung der Verbindungen verwendet:



Anschließend können die verschiedenen Scaffolds auf Basis des folgenden Schemas gekoppelt werden:



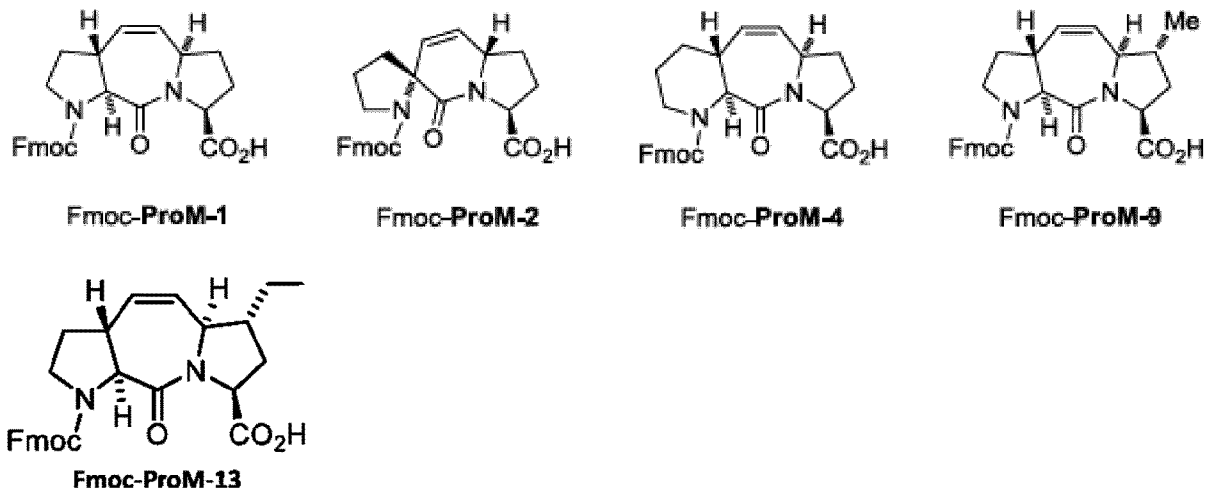
Die dadurch produzierten Verbindungen können durch eine direkte Amidierung modifiziert werden:



Beispiel 2: Biologische Untersuchungen

Im Folgenden soll die Erfindung anhand der biologischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen näher erläutert werden, ohne auf diese beschränkt zu sein.

Als „Ausgangsligand“ für Bindungsstudien wurde zunächst die „wild typ“-Sequenz Ac-SFEFPPPPTEDEL-NH₂ (ein Ausschnitt aus dem ActA Protein des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes*, Fig. 5) auf das FPPPP-Kernmotiv, welches spezifisch durch EVH1-Domänen erkannt wird, reduziert. Dadurch lag die Masse des resultierenden Liganden Ac-FPPPP-OH erstmalig im niedermolekularen Bereich (< 500 bzw. < 900 Da, je nach Definition), im Sinne eines „small molecules“ zur Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen.



Schema 16: Pro-Pro-Mimetika diskutierte ProM-Scaffolds.

Die Substitution der Diprolineinheiten des FPPPP-Motivs mit den oben dargestellten Fmoc-ProMs wurde durchgeführt. Im Anschluss wurden die Bindungsaffinitäten der Liganden zur Domäne mittels isothermaler Titrationscalometrie (ITC) anhand der Dissoziationskonstante (K_d) bzw. der freien Enthalpie (ΔG) der Protein-Liganden-Komplexe bestimmt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Messungen durch Fluoreszenztitration (FT) kontrolliert. Dabei drückt sich eine stärkere Bindung des jeweiligen Liganden durch einen kleineren Wert für K_d bzw. ein stärker negativen Wert für ΔG aus. Der Zusammenhang zwischen der Dissoziationskonstante (K_d) und der freien Enthalpie (ΔG) ist mit den nachfolgenden Gleichungen verdeutlicht:

$$K_d = \frac{[Ligand][Domäne]}{[Komplex]} = e^{-\frac{\Delta G}{RT}}$$

Die gemessenen Bindungsaffinitäten der synthetischen Liganden sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten der verschiedenen Liganden bezüglich der EVH-1-Domäne.

Ligand	ITC		FT	
	Kd[μ M]	Δ G[kJ/mol]	Kd[μ M]	Δ G[kJ/mol]
Ac- SFEFPPPPTDEL-NH ₂	20	---	---	---
5 Ac-FPPPP-OH	1300	-16.5	780	-17.7
Ac-Phe(2-Cl)-PPPP-OH	18	-27.0	13	-27.8
Ac-Phe(2-Cl)-PP[ProM-1]-OH	14.1	-27.7	3.2	-31.4
Ac-Phe(2-Cl)-PP[ProM-9]-OH	8.0	-29.1	0.4	-36.7
Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OH	3.8	-31.0	2.7	-31.8
10 Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-4]-OH	9.7	-28.6	1.6	-33.1
Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-9]-OH	0.69	-35.2	0.28	-37.4

Die Verkürzung des Ausgangsliganden Ac-SFEFPPPPTDEL-NH₂ auf das zentrale FPPPP-Motiv hatte zunächst eine deutlich schlechtere Bindungsaffinität des resultierenden, niedermolekularen Liganden Ac-FPPPP-OH zur Folge (Kd[ITC] = 20 μ M auf 1300 μ M). Ein Austausch des endständigen Phenylalanins (F) durch synthetisches 2-Chlor-Phenylalanin (Phe(2-Cl)) konnte die schlechtere Bindung des verkürzten Liganden kompensieren.

In weiteren Untersuchungen wurde das PPPP-Motiv nun durch die dipeptidischen Scaffolds ProM-1, ProM-2, ProM-4, ProM-9 und ProM-13 substituiert. Eine erneute Verbesserung der Bindungsaffinität konnte für den Austausch einer einzigen Pro-Pro-Dipeptideinheit durch ProM-1, oder ProM-9 beobachtet werden, wobei eine Substitution des vorderen, oder mittleren Pro-Pro-Einheit zu einem Verlust der Affinität führte. Zum Erhalt des ersten vollsynthetischen ProM-tragenden Peptidliganden wurden die beiden verbliebenen Proline durch die Struktur ProM-2 ersetzt. So konnten die Modelingstudien durch biologische Experiment bestätigt werden.

Es zeigte sich durch ITC-Messungen, dass der Ligand Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OH im Vergleich zu Ac-Phe(2-Cl)-PP[ProM-1]-OH einen vierfach geringeren Kd-Wert besitzt. Eine Fluoreszenztitration bestätigte die gleiche Tendenz, jedoch nur mit einer Verbesserung der Bindungsaffinität um den Faktor 1.2. Dieser Wert konnte durch den Austausch von ProM-1 mit dem ringerweiterten Scaffold ProM-4 (Ligand: Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-4]-OH) weiter optimiert werden (Halbierung von Kd). Im Gegensatz hierzu deuteten die entsprechenden ITC-Messungen auf schlechtere Bindungsaffinitäten hin, sodass der ProM-1-substituierte, äquivalente Ligand als besser bindend betrachtet werden kann. Nichtsdestotrotz, liegen die ermittelten Werte im gleichen Größenbereich. Die strukturelle Ähnlichkeit von ProM-1 und ProM-4 drückt sich somit auch in den

Affinitäten ihrer Liganden zur Domäne aus. Bemerkenswerte Resultate lieferten die Bindungsstudien zum ringmethylierten Liganden Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-9]-OH. Die Einführung einer einzigen Methylgruppe (+14 Da) in den bisher bestbindenden Liganden Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OH lieferte eine bis zu zehnfach verbesserte Bindungsaffinität.

- 5 Eine weitere Analyse wurde mittels FT und ITC durchgeführt, um die Dissoziationskonstante (K_d) verschiedener weitere Verbindungen zu testen. Insbesondere zeigte ProM-13, gekoppelt mit ProM-2, eine sehr hohe Affinität zu verschiedenen Targetmolekülen.

Tabelle 2: Bindungsaffinitäten der verschiedenen Liganden bezüglich der VASP-EVH-1-, EnaH-EVH-1- und EVL-EVH-1-Domäne.

10

Scaffold: Ac[2-Cl-F][ProM-2][X]-OEt

	X: ProM-1	X: ProM-9	X: ProM-13
VASP-EVH1			
K_D , FT [μ M]	6.2 (0.6)	0.78 (0.09)	0.4 (0.1)
K_D , ITC [μ M]	9.4 (0.5)	1.4 (0.2)	0.49 (0.06)
EnaH-EVH1			
K_D , FT [μ M]	4.1 (0.3)	0.38 (0.05)	0.18 (0.03)
K_D , ITC [μ M]	7.8 (0.4)	0.8 (0.1)	0.31 (0.04)
EVL-EVH1			
K_D , FT [μ M]	4.1 (0.5)	0.28 (0.05)	0.13 (0.02)
K_D , ITC [μ M]	5.8 (0.7)	0.67 (0.07)	0.28 (0.03)

- 15 Durch rationales Design, stereoselektive Synthese und biologische Tests konnte somit der erste, im (höheren) nanomolaren Bereich an EVH1-Domänen bindende Ligand entwickelt werden, welcher aufgrund seiner Masse (z. B. von 692 Da; mit Einschränkungen) in den niedermolekularen Substanzbereich eingeordnet werden kann.

- 20 Mit dem nachfolgenden Fig. 6 soll ein Überblick über die Optimierung der Bindungsaffinitäten durch synthetische Veränderung des „wild-typ“-Liganden gegeben werden. Der Gesamtverlauf der Optimierung des Liganden über mehrere Generationen zu Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-9]-OH war somit mit einem Enthalpiegewinn von $\Delta\Delta G = -15.9$ kJ/mol (bestimmt mittels ITC) verbunden.

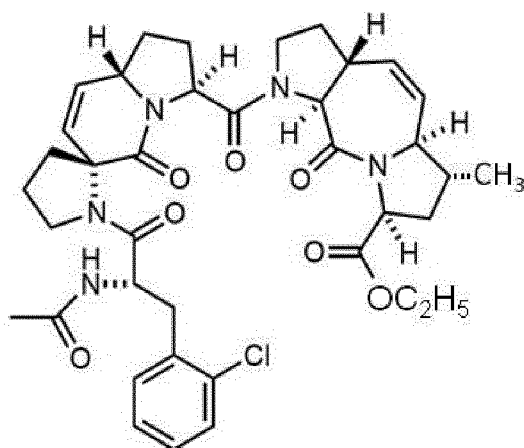
- 25 Die zusätzliche Methylgruppe in Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-9]-OH hat mit Blick auf die erhaltenen Affinitätsergebnisse eine Bindungsverbesserung zur Folge. Der Effekt der Ligandensubstitution konnte zudem anhand von Kristallstrukturen des Liganden-Domänen Komplexes bewiesen werden. So gelang es Kristalle von Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OH und Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-9]-OH im Komplex mit der Proteinoberfläche einer EVH1-Domäne zu erhalten und so Rückschlüsse auf

die strukturelle bzw. konformationelle Bindungssituation zu ziehen. In Fig. 7 ist eine Überlagerung der beiden Liganden an der Proteinoberfläche dargestellt.

Vergleicht man beide Liganden in ihrer Ausrichtung an der Proteinoberfläche, so ist festzustellen, dass die tricyclischen Strukturen (ProM-9 $\leftrightarrow$ ProM-1), wie zu erwarten, nahezu identisch liegen. Im Sinne der konzeptionellen Idee deckt die *R*-konfigurierte Methylgruppe an C γ die hydrophobe Oberfläche des Proteins unterhalb des Prolinrings zusätzlich ab, ohne dabei mit Methionin(M)-14 oder Asparagin(N)-90 zu kollidieren.

Des Weiteren konnte im Rahmen von Zellexperimenten gezeigt werden, dass durch den Ersatz des Carbonsäureliganden durch das Esterderivat (NBD-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OEt) die Fähigkeit der Verbindung, von den Targetzellen aufgenommen zu werden, verbessert werden konnte. Die Aufnahme der Substanz in die Zelle konnte somit gesteigert werden, ohne Verlust auf die vorteilhaften Bindungseigenschaften.

Beispielhaft zeigt folgende Verbindung III eine unerwartete Kombination von vorteilhaften Eigenschaften:



Diese Verbindung (gemäß Formel III), und nach weiteren Untersuchungen auch die Verbindungen gemäß den Formeln IV, V, VI, VII und VIII, hemmen selektiv ena/VASP- EVH1-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Bindungsdaten für Verbindung III an Ena/VASP-EVH1 sind: VASP-EVH1 K_d 280 nM (Faktor 100 besser als das Referenzpeptid (SFEFPPPTDEL K_d 20 μ M). Dies bedeutet, dass das Esterderivat an der Position R3 bzw. R6 gemäß der allgemeinen Formel I nicht nur eine verbesserte Zellpermeabilität sondern auch verbesserte Bindungseigenschaften aufweist. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass die Kombination Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-13]-OEt eine besonders starke Affinität zum Target aufweist.

Die Verbindungen gemäß den Formeln III-VIII hemmen überraschenderweise die Chemotaxis und Motilität hoch invasiver Tumorzellen. Zellkultur-Experimente wurden mit MDA MB 231 Brustkrebszellen durchgeführt. In einem Matrigel-Migrationsassay konnte gezeigt werden, dass die

Beispielverbindung III die Migration von MDA MB 231 Brustkrebszellen um mehr als 90%, bezogen auf den Basalwert (DMSO/kein FBS-Gradient) hemmt (Fig. 1 A und B).

Die Verbindung erwies sich dabei als nicht zelltoxisch (Fig. 2). Die geringe bzw. abwesende Zelltoxizität stellt ebenfalls eine überraschende und vorteilhafte Eigenschaft der Verbindungen dar.

- 5 Die erfindungsgemäßen Verbindungen binden nicht nur mit sehr niedrigen Dissoziationskonstanten an den Targetrezeptor, sondern auch mit einer hohen Spezifität. Dies ist für eine medizinische Anwendung der Verbindungen als Vorteil anzusehen.

Die Bindung des Liganden an ena-EVH1 konnte über Kristallisation des Komplexes mit Ena-EVH1 (Auflösung 1.02Å) nachgewiesen werden (Fig. 3). Hierdurch wird bewiesen, dass die beanspruchten

- 10 Verbindungen außergewöhnlich gute Bindungseigenschaften aufweisen.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen wurden weiterhin bezüglich ihrer Stabilität und Protein-Bindungseigenschaften in Plasma, sowie ihrer metabolischen Stabilität, getestet.

Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen Verbindungen eine außergewöhnlich gute Stabilität in Plasma, eine niedrige Proteinbindung in Plasma (nur wenig unspezifische Protein-

15 Bindung) und eine hohe metabolische Stabilität, die für eine klinische Anwendung als vorteilhaft anzusehen ist.

Die Verbindungen Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-OEt (nachfolgend als Verbindung 4D benannt) und Ac-Phe(2-Cl)-[ProM-2][ProM-1]-NH₂ (nachfolgend als Verbindung 4C benannt) wurden untersucht.

- 20 Ein in vitro-Assay wurde im Plasma von Mäusen und Menschen durchgeführt. Insgesamt war 4C in Maus- und Humanplasma sehr stabil (94,7% und 80,3% verbliebene Verbindung nach 240 Minuten Inkubation). Für 4D wurden 87,4% und 95,5% verbliebene Verbindung gemessen, was seine hohe Stabilität im Plasma von Mäusen und Menschen zeigt (Halbwertszeit > 240 min).

Um die Plasmaproteinbindung von Verbindungen 4C und 4D zu beurteilen, wurde eine modifizierte

25 Ultrafiltrationstechnik angewandt. 4C zeigte eine sehr niedrige Affinität für Plasmaproteine, was zu PPB-Werten von 5,5% und 4,5% (Mensch und Maus) führte. Eine geringe Plasmaproteinbindung wurde auch für 4D beobachtet (1,9% und 7,6% mit Maus und menschlichem Plasma).

Die metabolische Stabilität der 4C und 4D wurde mit gepoolten Maus (MLM) und humanen Lebermikrosomen (HLM) getestet. Mit MLM und HLM wurden 4C und 4D langsam metabolisiert, was

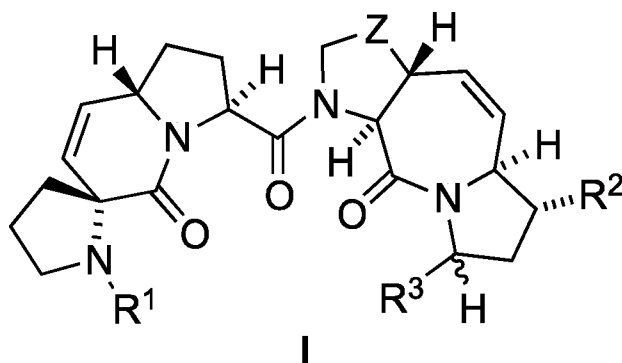
30 zu Cl_{int} -Werten im Bereich von 34,0 und 35,6 µl/min/mg Protein mit MLM und 11,6 und 26,4 µl/min/mg Protein mit HLM führte.

Tabelle 3: Plasmastabilität, unspezifische Proteinbindung in Plasma und metabolische Stabilität der Verbindungen 4C und 4D.

Assay	Spezies	Verbindung	Parameter	Ergebnis	Bemerkung
Plasmastabilität	Maus	4C	% verbleibend (Tlast 240 min)	94.7	Hohe Stabilität in Plasma
	Human			80.3	
	Maus	4D		87.4	
	Human			95.5	
Plasma-Proteinbindung	Maus	4C	fb (gebundene Fraktion)	5.5	Low PPB
	Human			4.5	
	Maus	4D		1.9	
	Human			7.6	
Leber mikro-somale Stabilität	Maus, Human	4C	t1/2 [min]	> 60	High stability regarding Phase I metabolism
		4D		> 60	
	Maus	4C	Cl _{int} [µl/min/mg Protein]	34.0	
				Human	
	Maus	4D		35.6	
				Human	

PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindung gemäß Formel I:



wobei

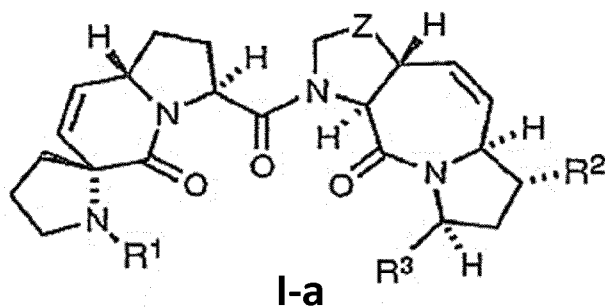
R^1 : H, Acyl, Peptidyl, Sulfonyl, Alkyl, Aryl oder Heteroaryl ist, wobei die Acyl, Peptidyl, Sulfonyl, Alkyl, Aryl oder Heteroaryl Substituenten gemäß R^1 optional substituiert sind;

R^2 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl oder Halogen ist, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoroalkyl oder einen heterozyklischen Substituent;

R^3 : C-enthaltener Substituent ist, zum Beispiel Alkyl, Acyl, bevorzugt ein Carbonsäurederivat gemäß $C(=O)X$, wobei $X = OH$, O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit $R, R' = H$ oder Alkyl), $NROR'$ (mit $R, R' = H$ oder Alkyl) oder Heteroaryl;

Z : CH_2 oder CH_2CH_2 ist, bevorzugt CH_2 .

2. Verbindung nach Anspruch 1 gemäß Formel I-a:



wobei

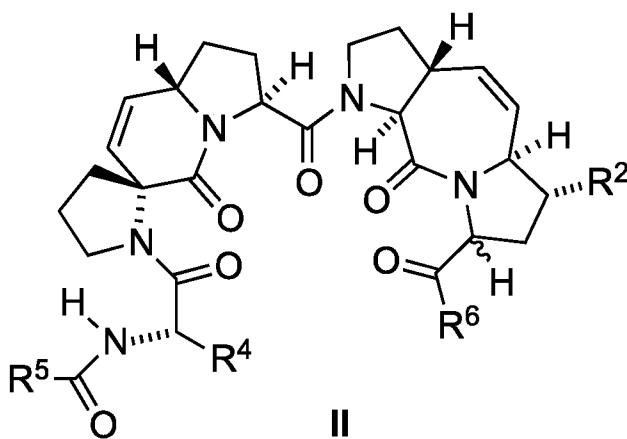
R^1 : H, Acyl, Peptidyl, Sulfonyl, Alkyl, Aryl, Heteroaryl ist, wobei die Acyl, Peptidyl, Sulfonyl, Alkyl, Aryl oder Heteroaryl Substituenten gemäß R^1 optional substituiert sind;

R^2 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen ist, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoroalkyl oder ein heterozyklischer Substituent;

R^3 : C-enthaltener Substituent ist, zum Beispiel Alkyl, Acyl, bevorzugt ein Carbonsäurederivat gemäß $C(=O)X$, wobei $X = OH$, O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit $R, R' = H$ oder Alkyl), $NROR'$ (mit $R, R' = H$ oder Alkyl) oder Heteroaryl ist;

Z : CH_2 oder CH_2CH_2 ist, bevorzugt CH_2 .

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 gemäß Formel II:



wobei

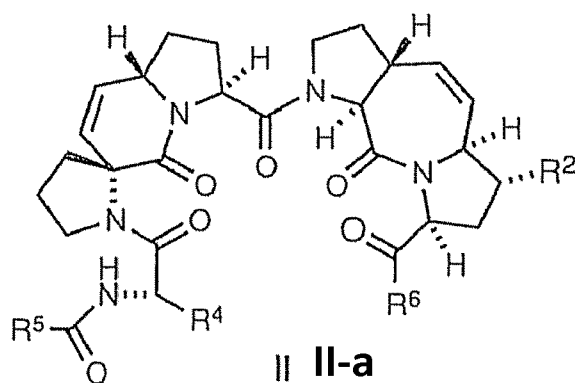
R^2 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen ist, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoroalkyl oder ein heterozyklischer Substituent;

R^4 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Aryl oder ein heterozyklischer Substituent, bevorzugt $-CH_2$ -aryl oder $-CH_2$ -Heteroaryl, zum Beispiel $-CH_2$ -Phenyl, $-CH_2$ -1-Naphthyl oder $-CH_2$ -3-Indolyl, wobei die Substituenten gemäß R^4 optional substituiert sind;

R^5 : H, Alkyl oder ein substituierter Alkylrest;

R^6 : OH, O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit $R, R' = H$ oder alkyl), $NROR'$ (mit $R, R' = H$ oder Alkyl) oder Heteroaryl.

4. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche gemäß Formel II-a:



wobei

R^2 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen ist, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoroalkyl oder ein heterozyklischer Substituent;

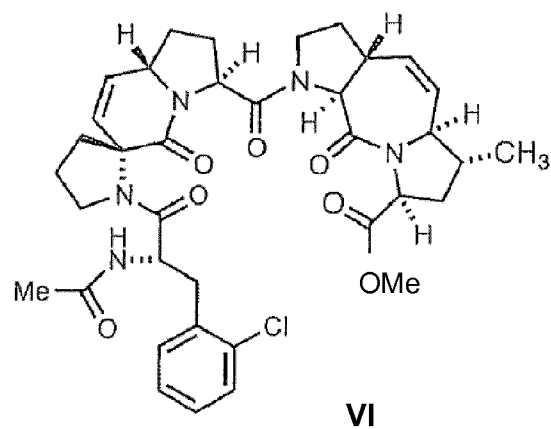
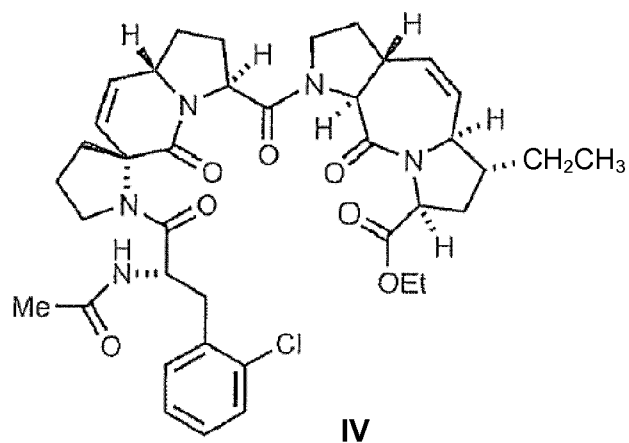
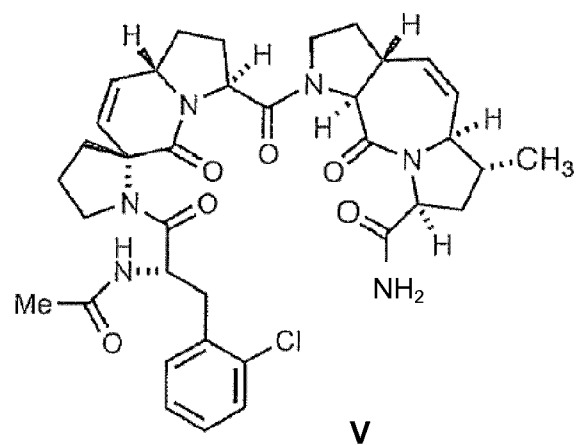
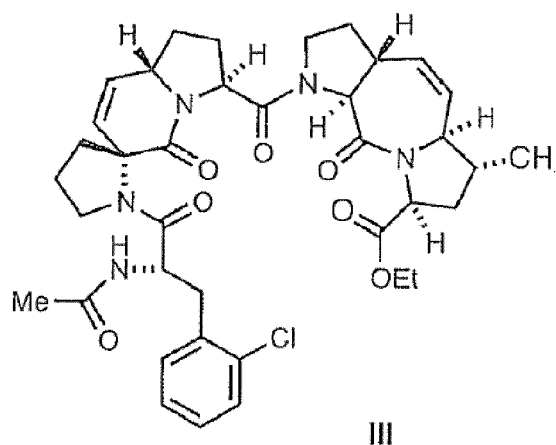
R^4 : H, Alkyl, Cycloalkyl, Aryl oder ein heterozyklischer Substituent ist, bevorzugt $-CH_2$ -aryl oder $-CH_2$ -Heteroaryl, zum Beispiel $-CH_2$ -Phenyl, $-CH_2$ -1-Naphthyl oder $-CH_2$ -3-Indolyl, wobei die Substituenten gemäß R^4 optional substituiert sind;

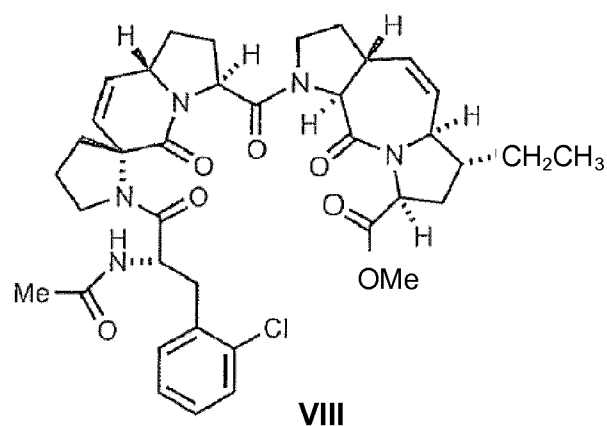
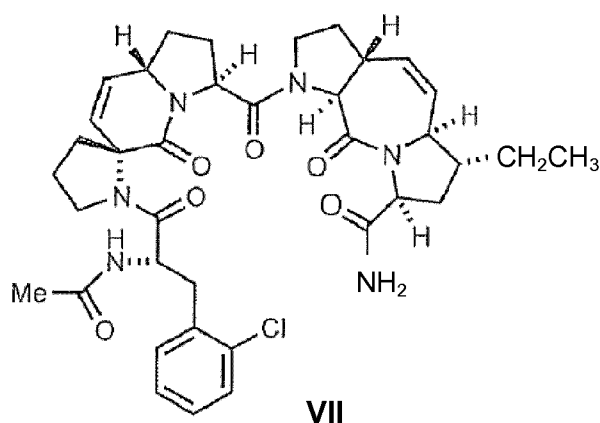
R^5 : H, Alkyl oder ein substituierter Alkylrest ist;

R^6 : OH, O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit R, R' = H oder alkyl), NROR' (mit R, R' = H oder Alkyl) oder Heteroaryl ist.

5. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche gemäß Formel I, I-a, II oder II-a, wobei R^2 : Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Alkynyl, Halogen, insbesondere F oder Cl, O-Alkyl, S-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl ist, wobei die Substituenten gemäß R^2 optional substituiert sind, zum Beispiel Fluoroalkyl oder ein heterozyklischer Substituent.
6. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche gemäß Formel I, I-a, II oder II-a, wobei R^2 : Alkyl ist, ausgewählt aus der Gruppe CH_3 , C_2H_5 oder C_3H_7 , bevorzugt CH_3 oder C_2H_5 .
7. Verbindung nach Anspruch 3 oder 4 gemäß Formel II oder II-a, wobei R^4 : CH_2 -aryl ist, insbesondere substituiertes $-CH_2$ -Phenyl, wobei der Substituent an der Ortho-Position der Phenylgruppe positioniert ist, wobei der Substituent bevorzugt Halogen ist, insbesondere Cl.
8. Verbindung nach Anspruch 3 oder 4 gemäß Formel II oder II-a, wobei R^6 : O-Alkyl, O-Aryl, NRR' (mit R, R' = H oder alkyl), NROR' (mit R, R' = H oder Alkyl) oder Heteroaryl ist.

9. Verbindung nach Anspruch 3 oder 4 gemäß Formel II oder II-a, wobei R^6 : $O-CH_3$, $O-C_2H_5$ oder NH_2 ist.
10. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche gemäß Formel III-VIII:

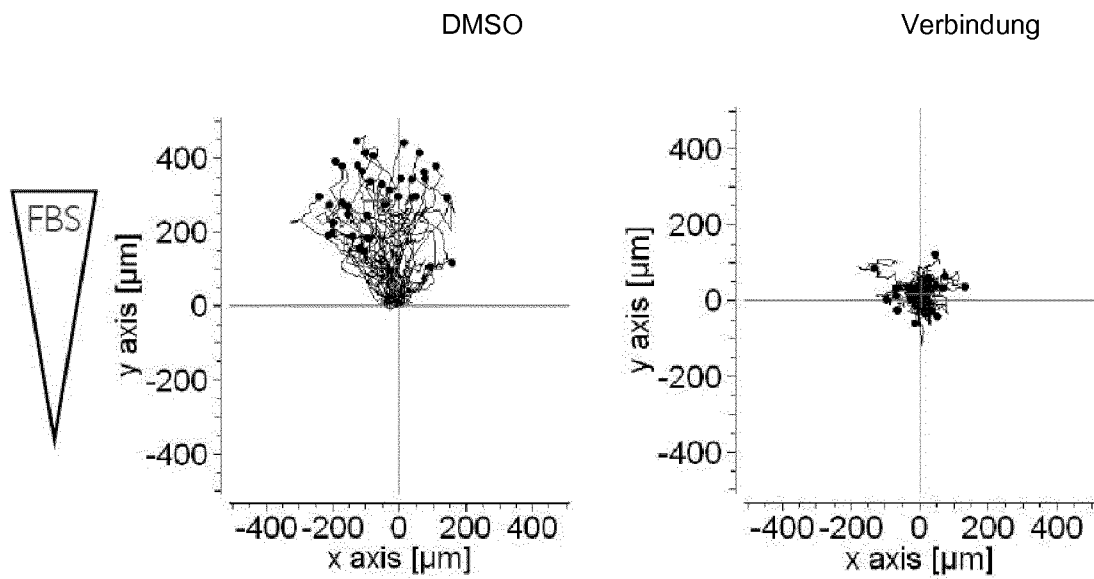




11. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche als Ligand für eine Ena/VASP-EVH1-Domäne.
12. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Verbindung eine Ena/VASP-EVH1-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkung inhibiert.
13. Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Verbindung eine Dissoziationskonstante (K_d) im Komplex mit einer Ena/VASP-EVH1-Domäne von $\leq 20 \mu\text{M}$, bevorzugt $\leq 2 \mu\text{M}$, weiterhin bevorzugt $\leq 500 \text{ nM}$ aufweist.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine Verbindung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bevorzugt mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger.
15. Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verwendung als Medikament zur Behandlung von Tumorerkrankungen.
16. Verbindung oder Zusammensetzung zur Verwendung als Medikament nach dem vorhergehenden Anspruch, wobei die Tumorerkrankung Brustkrebs ist.
17. Verbindung oder Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Verwendung als Medikament zur Behandlung von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung die Metastasierung eines Tumors inhibiert.
18. Verbindung oder Zusammensetzung nach dem vorhergehenden Anspruch zur Verwendung als Medikament zur Behandlung von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass die Metastasierung eines Tumors durch Inhibition der Chemotaxis und/oder Motilität der Tumorzellen auf Basis einer Störung der Aktinfilamentsynthese inhibiert wird.

Fig. 1

A



B

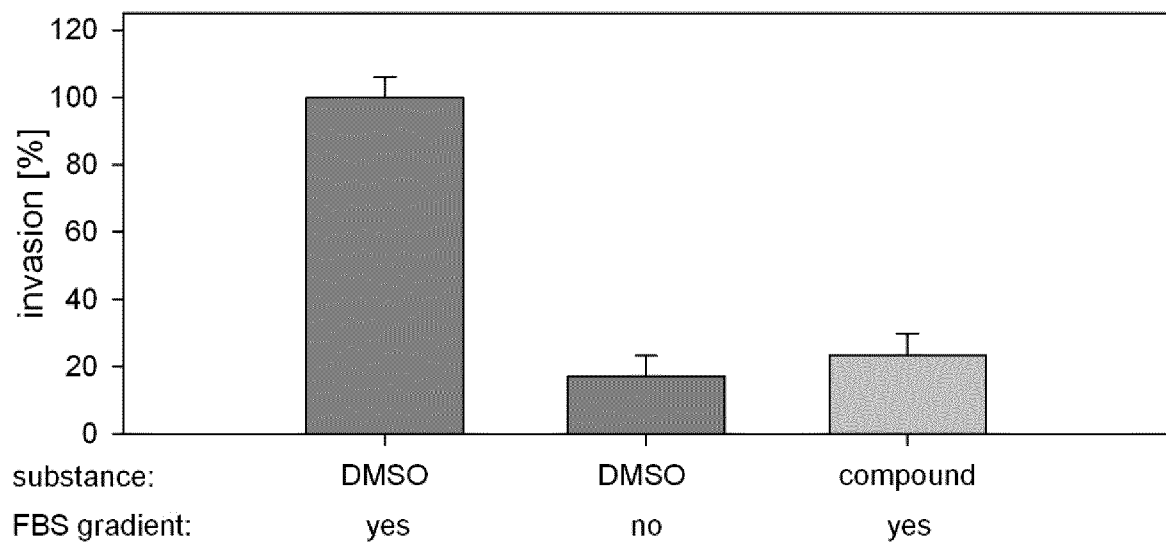


Fig. 2

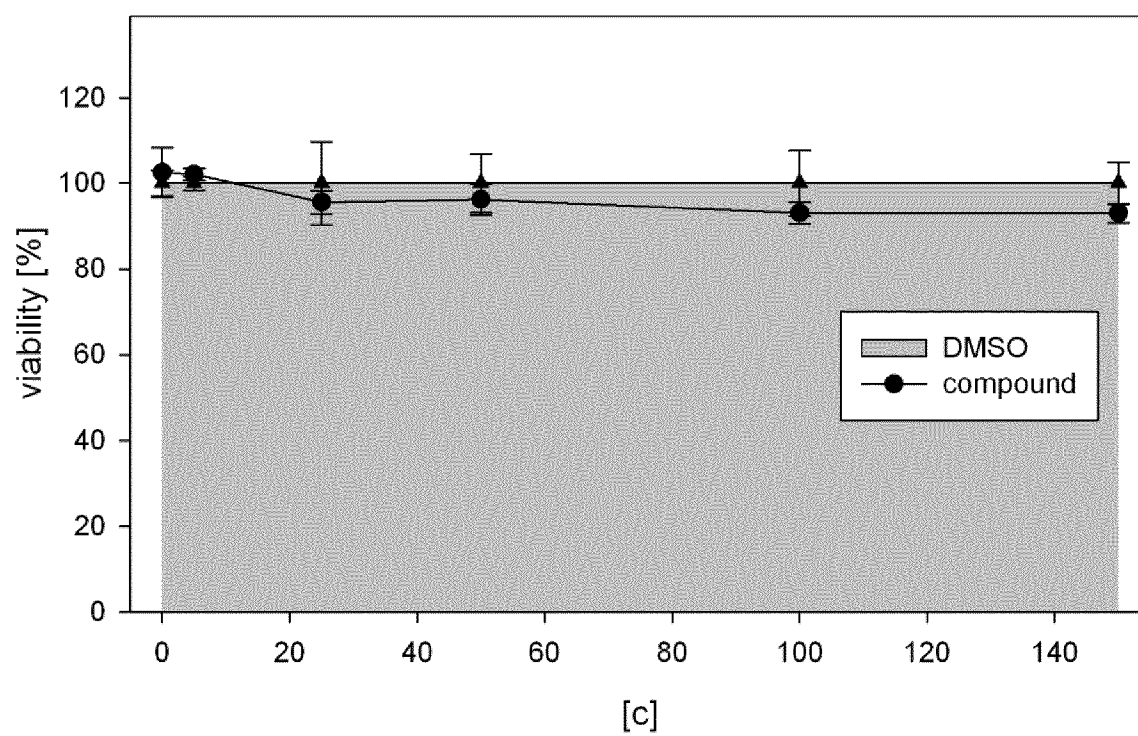


Fig. 3

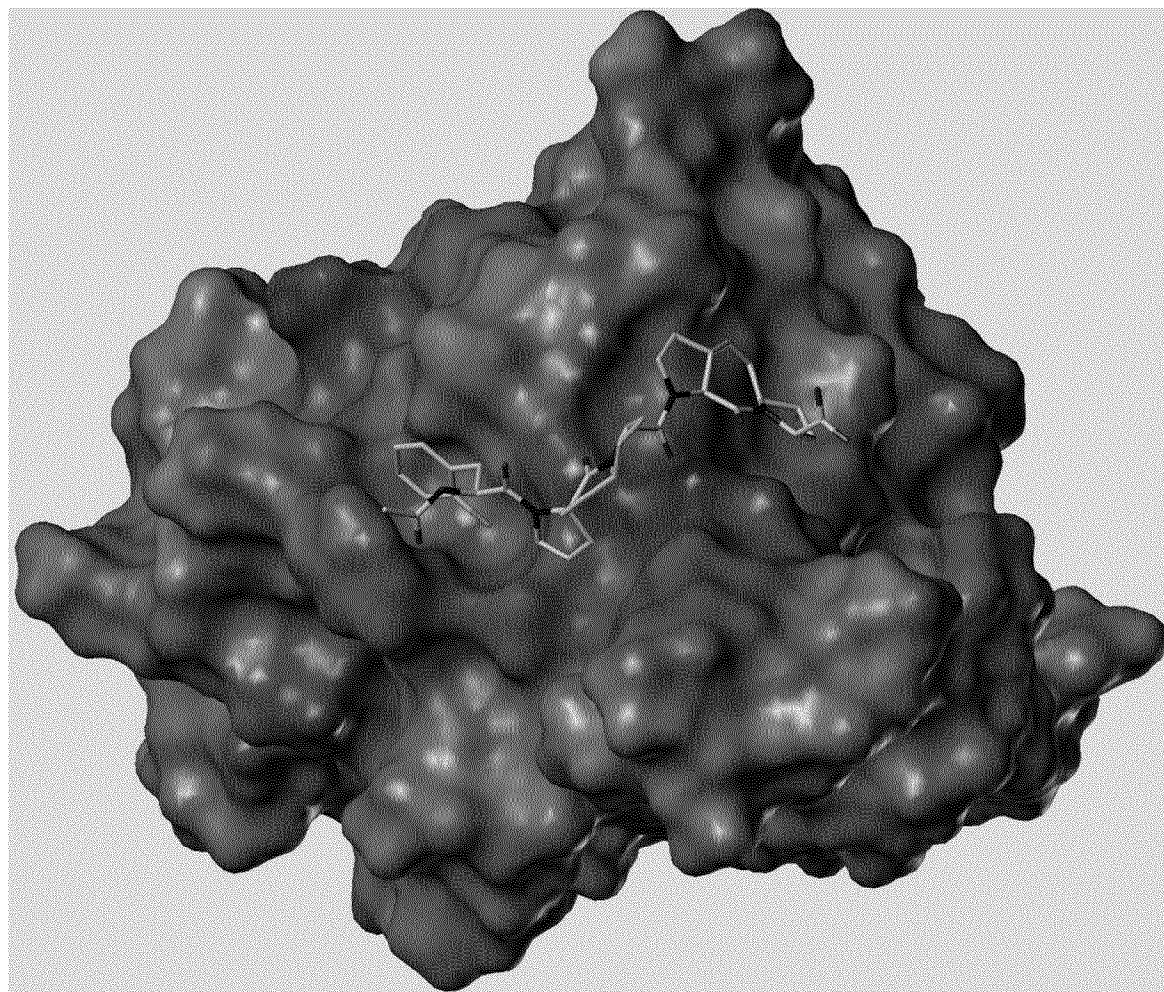


Fig. 4.

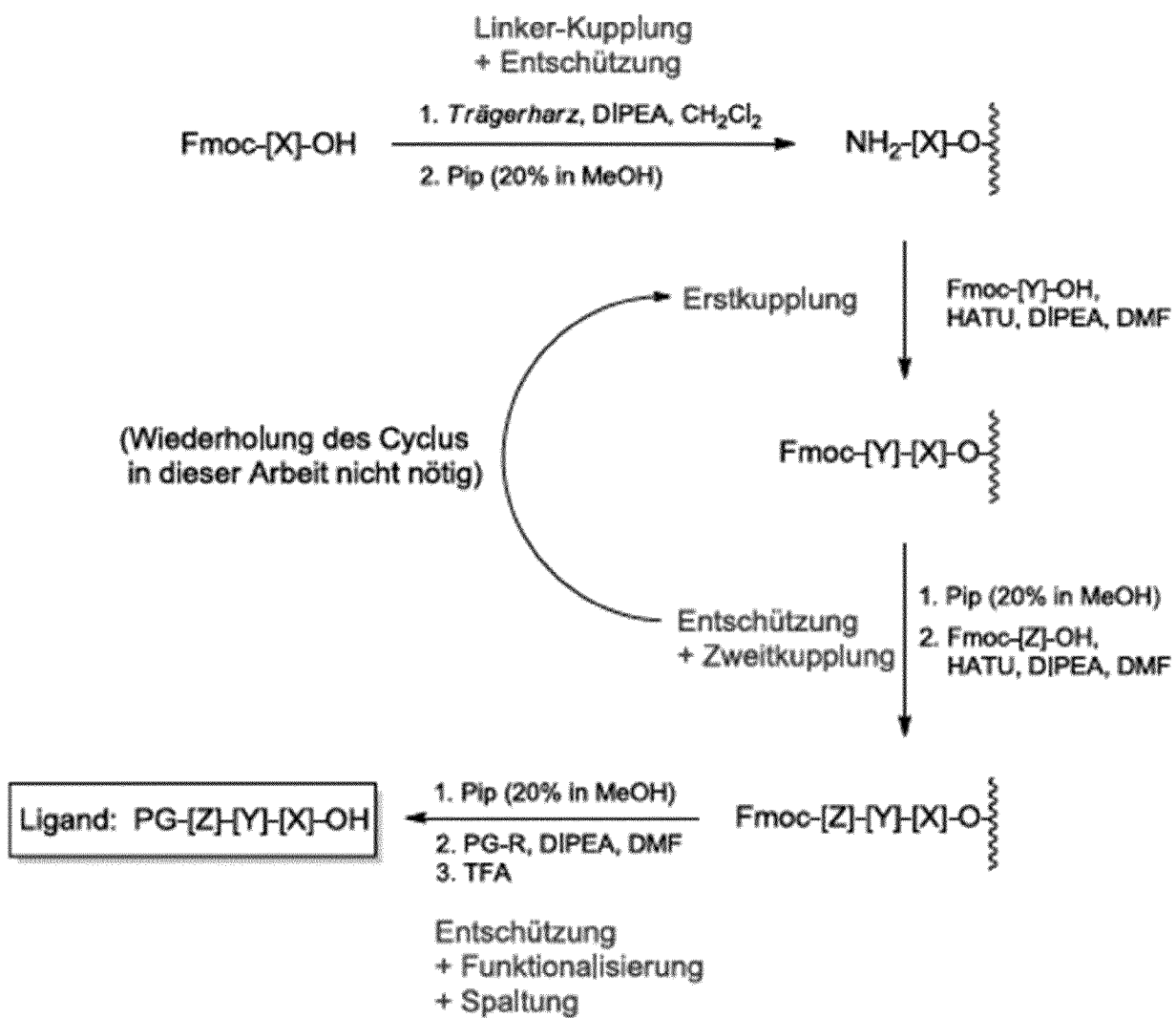


Fig. 5

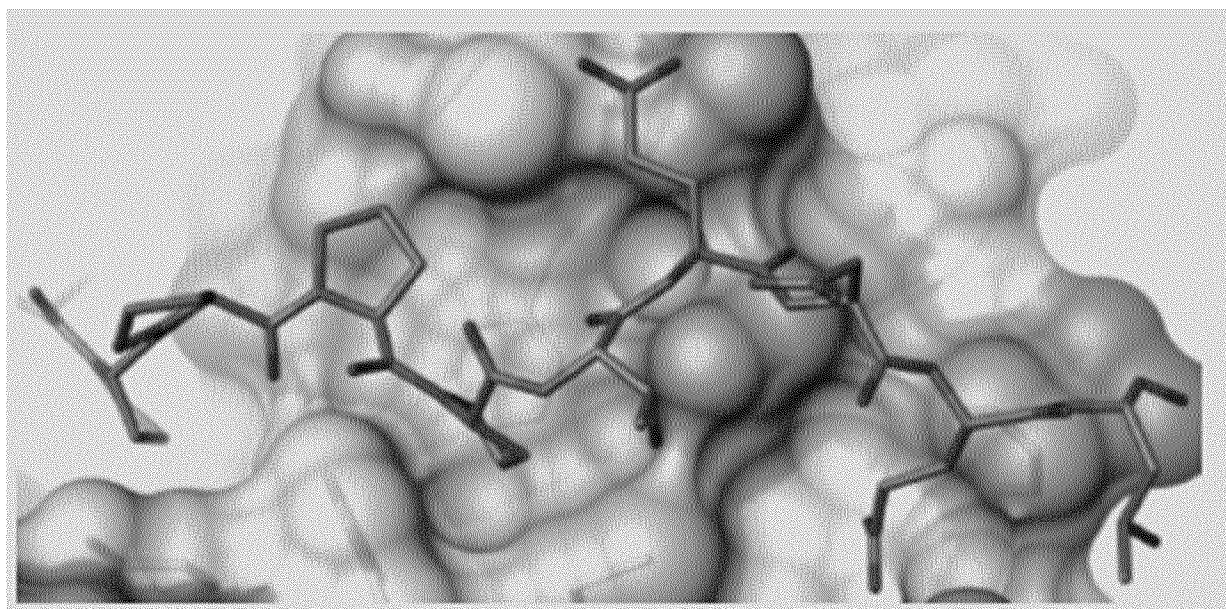


Fig. 6

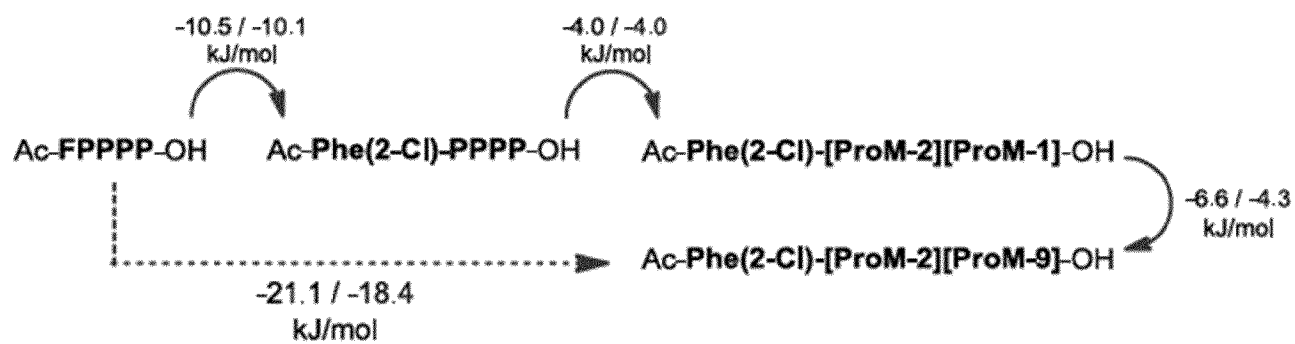
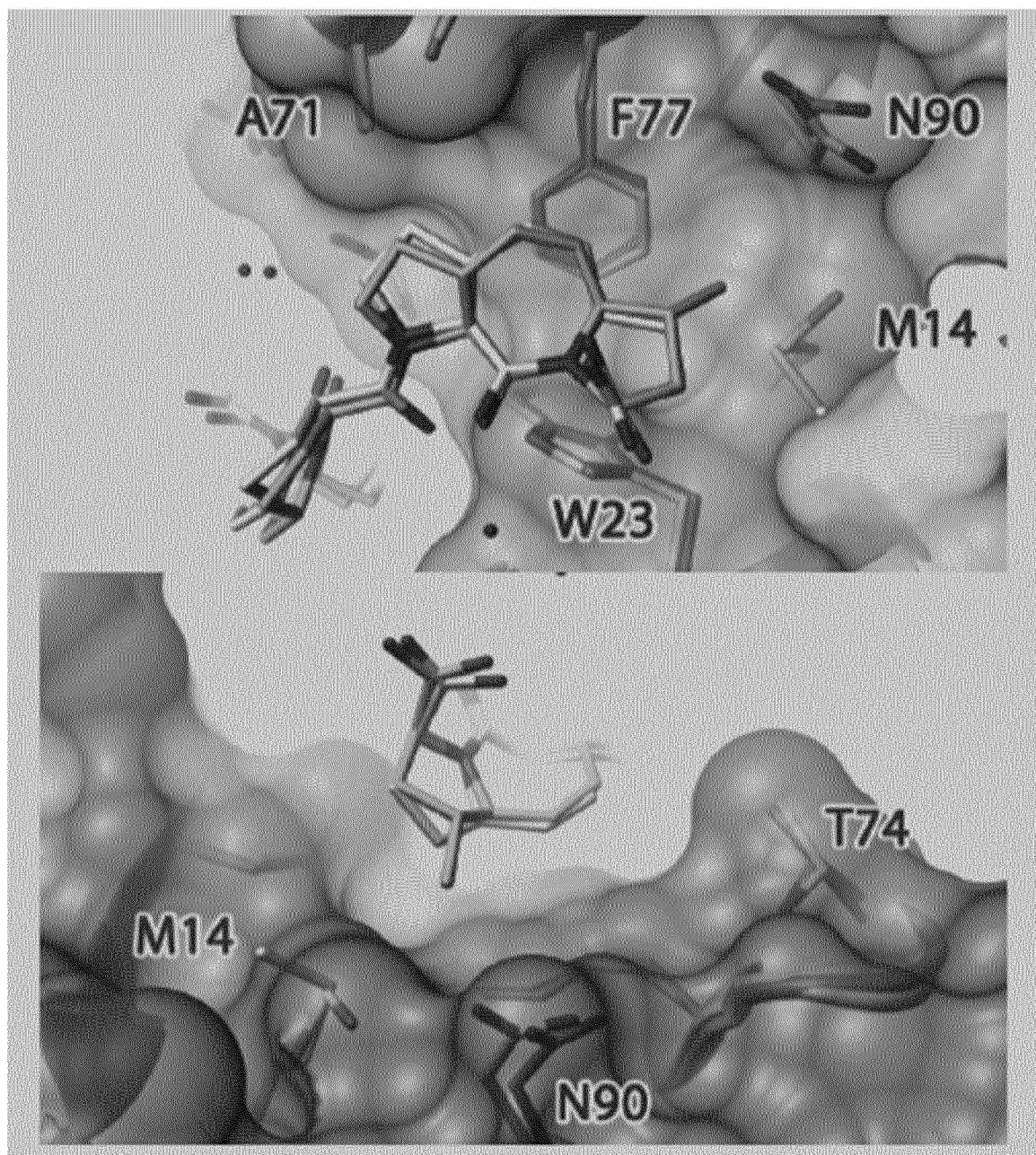


Fig. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/079410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K5/12 A61K31/55 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/030111 A1 (FORSCHUNGSVERBUND BERLIN EV [DE]; UNIV ZU KOELN [DE]; KUEHNE RONALD [D] 7 March 2013 (2013-03-07) cited in the application page 24, line 1 - page 26, line 16; claims 1-14,18,19; table 1 -----	1-9, 11-18
A	WO 98/54208 A1 (CADUS PHARMACEUTICAL CORP [US]) 3 December 1998 (1998-12-03) cited in the application the whole document -----	1-18
A	WO 2008/040332 A1 (FORSCHUNGSVERBUND BERLIN EV [DE]; KUEHNE RONALD [DE]; OSCHKINAT HARTMU) 10 April 2008 (2008-04-10) cited in the application the whole document ----- -/-	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 February 2016

Date of mailing of the international search report

16/02/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Von Daacke, Axel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/079410

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A,P	ROBERT OPITZ ET AL: "A modular toolkit to inhibit proline-rich motif-mediated protein-protein interactions", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 112, no. 16, 6 April 2015 (2015-04-06), pages 5011-5016, XP055248309, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1422054112 the whole document -----	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/079410

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013030111 A1	07-03-2013	EP 2561873 A1	27-02-2013
		EP 2747764 A1	02-07-2014
		JP 2014527057 A	09-10-2014
		US 2015018269 A1	15-01-2015
		WO 2013030111 A1	07-03-2013
WO 9854208 A1	03-12-1998	AU 7699898 A	30-12-1998
		US 6638941 B1	28-10-2003
		WO 9854208 A1	03-12-1998
WO 2008040332 A1	10-04-2008	EP 2094711 A1	02-09-2009
		JP 5588172 B2	10-09-2014
		JP 2010520851 A	17-06-2010
		US 2011034438 A1	10-02-2011
		WO 2008040332 A1	10-04-2008

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C07K5/12 A61K31/55 A61P35/00
 ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C07K

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 2013/030111 A1 (FORSCHUNGSVERBUND BERLIN EV [DE]; UNIV ZU KOELN [DE]; KUEHNE RONALD [D] 7. März 2013 (2013-03-07) in der Anmeldung erwähnt Seite 24, Zeile 1 - Seite 26, Zeile 16; Ansprüche 1-14,18,19; Tabelle 1 -----	1-9, 11-18
A	WO 98/54208 A1 (CADUS PHARMACEUTICAL CORP [US]) 3. Dezember 1998 (1998-12-03) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-18
A	WO 2008/040332 A1 (FORSCHUNGSVERBUND BERLIN EV [DE]; KUEHNE RONALD [DE]; OSCHKINAT HARTMU) 10. April 2008 (2008-04-10) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-18
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Februar 2016

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/02/2016

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Von Daacke, Axel

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A,P	ROBERT OPITZ ET AL: "A modular toolkit to inhibit proline-rich motif-mediated protein-protein interactions", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, Bd. 112, Nr. 16, 6. April 2015 (2015-04-06), Seiten 5011-5016, XP055248309, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1422054112 das ganze Dokument -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2015/079410

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2013030111	A1	07-03-2013	EP	2561873 A1	27-02-2013
			EP	2747764 A1	02-07-2014
			JP	2014527057 A	09-10-2014
			US	2015018269 A1	15-01-2015
			WO	2013030111 A1	07-03-2013

WO 9854208	A1	03-12-1998	AU	7699898 A	30-12-1998
			US	6638941 B1	28-10-2003
			WO	9854208 A1	03-12-1998

WO 2008040332	A1	10-04-2008	EP	2094711 A1	02-09-2009
			JP	5588172 B2	10-09-2014
			JP	2010520851 A	17-06-2010
			US	2011034438 A1	10-02-2011
			WO	2008040332 A1	10-04-2008
