

# Synthetische Mimetika der CD4-Bindungsstelle von HIV-1 gp120 für das Immunogen-Design\*\*

Raimo Franke, Tatjana Hirsch, Heike Overwin und Jutta Eichler\*

Trotz intensiver Arbeiten in der klinischen und Grundlagenforschung wird die Entwicklung einer HIV-1-Vakzine nach wie vor durch Schwierigkeiten bei der Erzeugung einer breit neutralisierenden Immunantwort erschwert.<sup>[1]</sup> Das Virus umgeht das Immunsystem des Wirts, indem es variable und glycosyierte Regionen auf seiner Oberfläche exponiert, während die konservierten Bindungsstellen für seine zellulären Rezeptoren entweder verborgen sind (CD4-Bindungsstelle)<sup>[2]</sup> oder erst nach Bindung an CD4 exponiert werden (Corezeptor-Bindungsstellen).<sup>[3]</sup> Neue Immunogen-Designstrategien zur Lösung des Problems der neutralisierenden Antikörper sind daher ein wichtiger Beitrag zur Entwicklung einer erfolgreichen HIV-1-Vakzine.<sup>[4]</sup> Bisher wurden nur wenige monoklonale Antikörper gefunden, die eine Vielfalt von HIV-1-Isolaten *in vitro* neutralisieren und gegen eine Infektion *in vivo* schützen können.<sup>[5]</sup> Die CDR-H3-Schleife eines dieser breit neutralisierenden Antikörpers, mAb b12,<sup>[6,7]</sup> ähnelt stark der gp120-bindenden, CDR2-ähnlichen Schleife des CD4 und passt in eine vertiefte Tasche im HIV-1-Hüllprotein gp120, die dessen Bindungsstelle für CD4 (CD4bs) ausmacht. Dies konnte durch Kristallstrukturanalyse und Molecular-Modeling-Studien<sup>[5]</sup> sowie durch ortsspezifische Mutagenese von gp120<sup>[8]</sup> gezeigt werden. Das Epitop für mAb b12 überlappt somit sehr wahrscheinlich die CD4bs von gp120, die eine konservierte Region in diesem ansonsten hoch variablen Protein darstellt. Synthetische Mimetika der CD4bs sind daher vielversprechende Immunogen-Kandidaten zur Erzeugung von virusneutralisierenden Antikörpern.<sup>[9]</sup>

Ausgehend von der Kristallstruktur von gp120 im Komplex mit einem extrazellulären Zweidomänenfragment von CD4<sup>[2,10]</sup> konnten die primären Kontaktpositionen von gp120 für seine Wechselwirkung mit CD4 (D368, E370, W427 und D457) identifiziert werden; diese vier Positionen sind in der gp120-Sequenz voneinander entfernt (Abbildung 1). Eine Mutation an diesen Positionen hebt die Bindung von gp120 an CD4 auf.<sup>[11]</sup> Unter Verwendung bereits etablierter Methoden zur Herstellung gerüstgestützter Peptide als synthetischer

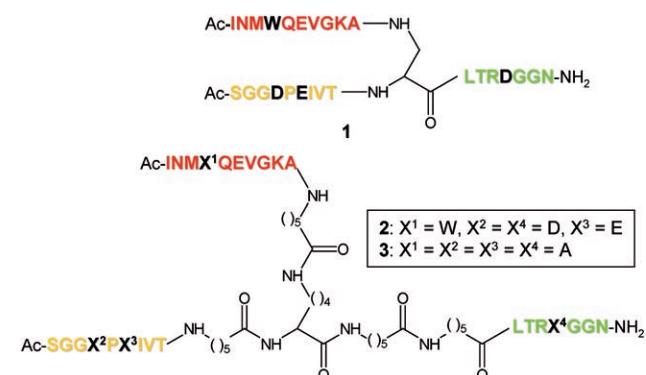


**Abbildung 1.** Die Grenzfläche zwischen gp120 und CD4 in der Kristallstruktur eines Komplexes von gp120 mit D1D2-CD4 (pdb-Eintrag 1RZJ);<sup>[10]</sup> gp120-Fragmente: 424–433 (rot), 365–373 (gelb) und 454–460 (grün). CDR2-ähnliche Schleife von CD4: blau.

Mimetika für diskontinuierliche Proteinbindungsstellen<sup>[12,13]</sup> haben wir kürzlich Peptide vorgestellt, die die CD4bs-Fragmente von gp120 präsentieren. Diese Peptide konkurrieren mit gp120 um die Bindung an CD4 bzw. mAb b12<sup>[14]</sup> und dienen nun als Templat für das Design von Vakzinen. Dieser Ansatz setzt voraus, dass eine korrekte Präsentation der CD4bs in den synthetischen Mimetika die Erzeugung von Antikörpern ermöglicht, die die CD4bs auch im gp120 des Virus erkennen und dieses somit neutralisieren können.<sup>[15]</sup>

Die Peptide **1** und **2**, die an einem konformativ flexiblen Molekülgerüst drei gp120-Fragmente präsentieren, die dessen primäre Bindungsstelle für CD4 ausmachen, (Fragment A: 424INMWQEVGKA433, Fragment B: 365SGGDPEIVT373, Fragment C: 454LTRDGGN460), wurden durch Festphasensynthese hergestellt und nach präparativer HPLC in hoher Reinheit erhalten (siehe Hintergrundinformationen).

Für **1** und **2** konnte eine Konkurrenz mit rekombinantem, monomerem gp120(IIIB) um die Bindung an rekombinantes



[\*] R. Franke, T. Hirsch, H. Overwin, Priv.-Doz. Dr. J. Eichler  
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung  
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)  
Fax: (+49) 531-6181-3499  
E-Mail: jutta.eichler@helmholtz-hzi.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch das BioFuture-Programm des BMBF (0311882) gefördert. 2D-sCD4 (Cat. No. 7356) und mAb b12 (Cat. No. 2640) wurden vom „NIH AIDS Research and Reference Reagent Program“ bezogen. Wir danken Christian Erck für die Herstellung des Immunogen-Konjugats.

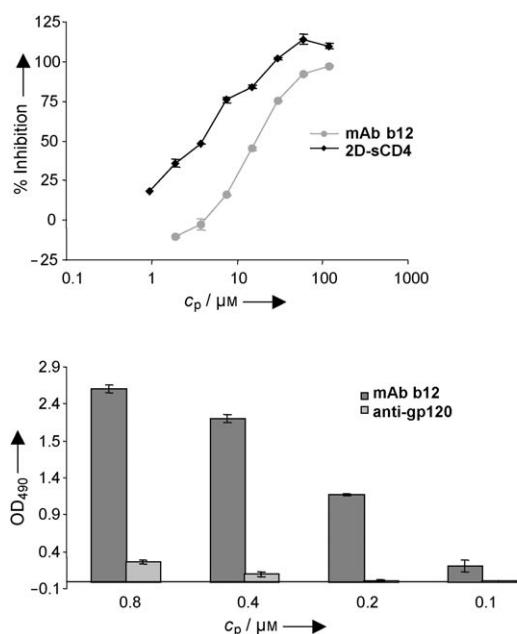
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Zweidomänen-CD4 (2D-sCD4) gezeigt werden (Tabelle 1 und Abbildung 2, oben). Die Affinität von **2** zu 2D-sCD4 war jedoch höher als die von **1**, was auf eine räumliche Anordnung der Fragmente in **2** hindeutet, die der Anordnung und den

**Tabelle 1:** IC<sub>50</sub>-Werte von Peptiden, gp120(IIIB) und mAb b12 im kompetitiven gp120(IIIB)-2D-sCD4-Bindungsassay.

Peptid	IC <sub>50</sub> [μM]	Peptid	IC <sub>50</sub> [μM]
<b>1</b>	28	Fragment A	91
<b>2</b>	6	Fragment B	>120
<b>3</b>	>120	Fragment C	>120
<b>4</b>	>120	gp120(IIIB) <sup>[a]</sup>	0.035
<b>5</b>	>120	mAb b12	0.033
<b>6</b>	24		

[a] Ein gp120-Peroxidase-Konjugat wurde als Ligand eingesetzt.



**Abbildung 2.** Oben: Konkurrenz von **2** mit gp120(IIIB) um die Bindung an immobilisierten mAb b12 bzw. 2D-sCD4. Unten: direkte Bindung von biotinylierter **2** an immobilisierten mAb b12 und an einen Antikörper, der die V3-Schleife von gp120 erkennt (anti-gp120). c<sub>p</sub> = Peptidkonzentration, OD = optische Dichte bei 490 nm.

Abständen zwischen den Fragmenten im gp120-CD4-Komplex mehr ähnelt als in **1**<sup>[10]</sup> (T373–A433: 18 Å, T373–L454: 13 Å, L454–A433: 26 Å). Obwohl die Affinität von **2** zu 2D-sCD4 ca. 170fach geringer war als die von gp120(IIIB) (Tabelle 1), haben **2** und gp120(IIIB) offenbar eine ähnliche Bindungsspezifität, da ein Austausch der vier primären Kontaktpositionen (D368, E370, W427 und D454) in **2** durch Alanin (Peptid **3**) einen starken Affinitätsverlust zu CD4

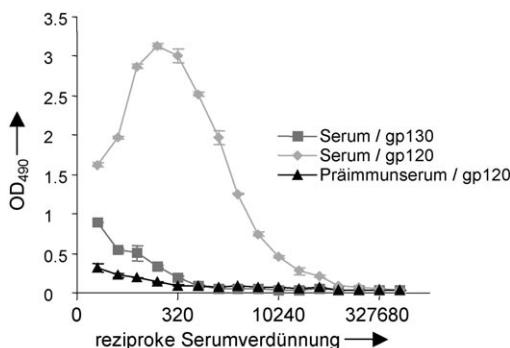
bewirkt (Tabelle 1). Peptid **2** kann somit als funktionelles Mimetikum der CD4bs von gp120 betrachtet werden.

Die Affinitäten der drei Einzelfragmente (A: Ac-IN-MWQEVGKA-NH<sub>2</sub>, B: Ac-SGGDPETV-NH<sub>2</sub> und C: Ac-LTRDGNN-NH<sub>2</sub>) zu 2D-sCD4 waren gering (Tabelle 1), was für einen synergistischen Effekt der Kombination aller drei Fragmente in einem Molekül spricht. Darüber hinaus hatten verkürzte Derivate von **2**, in denen Fragment A oder B fehlten (**4** und **5**), keine Affinität zu CD4, während die Affinität des um Fragment C verkürzten Derivates (**6**) nur wenig niedriger war (Tabelle 1; siehe Hintergrundinformationen für Peptidstrukturen), was auf eine geringere Bedeutung von Fragment C für die Wechselwirkung mit CD4 hinweist. Dieses Ergebnis bestätigt, dass D457 von gp120 zur Wechselwirkung mit CD4 weniger beiträgt als die anderen drei primären Kontaktpositionen.<sup>[2]</sup>

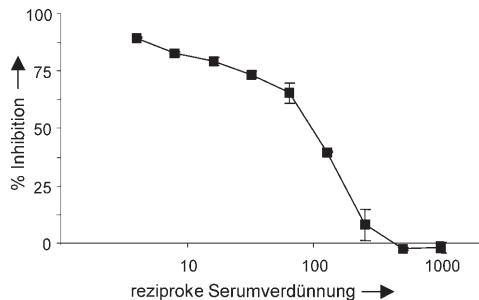
Zusätzlich zu seiner Affinität zu CD4 wurde **2** auch spezifisch von mAb b12 erkannt, jedoch nicht von einem Antikörper, dessen Epitop der V3-Schleife von gp120 entspricht (Abbildung 2, unten). Darüber hinaus konnte für **2** auch eine Konkurrenz mit gp120 um die Bindung an mAb b12 gezeigt werden (Abbildung 2, oben; IC<sub>50</sub> = 17 μM). Diese Ergebnisse bestätigen die postulierte Überlappung der CD4bs von gp120 mit dem Epitop für mAb b12, und **2** eignet sich somit als Ausgangspunkt für das Immunogen-Design.

Folglich wurde **2** als synthetisches Immunogen zur Erzeugung von Anti-Peptid-Antiseren eingesetzt. Kaninchen wurden mit dem Konjugat **7** immunisiert (siehe Hintergrundinformationen), in dem **2** über einen zusätzlichen Cysteinrest kovalent an das Trägerprotein KLH (Keyhole-Limpet-Hämocyanin) gebunden war. Die erhaltenen polyclonalen Antiseren erkannten gp120 spezifisch – d.h., sie erkannten nicht die extrazelluläre Domäne eines anderen Rezeptorglycoproteins (gp130), und außerdem erkannte das entsprechende Präimmunserum, das dem Kaninchen vor der Immunisierung mit **7** entnommen worden war, gp120 nicht (Abbildung 3). Die Anti-**2**-Antiseren konkurrierten auch mit mAb b12 um die Bindung an gp120 (Abbildung 4), was das Vorliegen von Antikörpern mit mAb b12-ähnlichen Bindungsspezifitäten in diesen Antiseren anzeigen.

Zusammenfassend haben wir durch strukturbasiertes Design ein Peptid entworfen, das die CD4-Bindungsstelle von HIV-1 gp120 funktionell nachahmt, da es mit gp120 um die Bindung an CD4 sowie an den breit neutralisierenden mAb b12 konkurriert. Polyclonale Antiseren gegen dieses Peptid erkennen gp120 mit einer ähnlichen Spezifität wie mAb b12. Laufende Untersuchungen zur Nachahmung der CD4bs-Strukturen von gp120 durch synthetische Peptide (mithilfe der Strukturanalyse von Komplexen dieser Peptide mit CD4 bzw. mAb b12) sollten Einblicke in diese Wechselwirkungen auf atomarer Ebene liefern, die das Design besserer Mimetika der CD4bs von gp120 als Immunogen-Kandidaten zur Erzeugung breit neutralisierender Antikörper ermöglichen werden.



**Abbildung 3.** Erkennung von gp120(IIIB) durch Anti-2-Antiserum.  
Oben: konzentrationsabhängige Bindung von Anti-2-Antiserum und Präimmunserum an immobilisiertes gp120(IIIB) und gp130. Unten: direkte Bindung von Anti-2-Antiserum (Verdünnung 1:4000) an immobilisiertes **2** und gp120(IIIB).  $c_c$  = Beschichtungskonzentration.



**Abbildung 4.** Konkurrenz von Anti-2-Antiserum mit immobilisiertem mAb b12 um die Bindung an gp120(IIIB).

### Experimentelles

Die Peptide wurden als C-terminale Amide durch automatisierte Fmoc-/Bu-Festphasensynthese hergestellt. Um eine Aspartimidbildung in Fragment C (LTDGGN) zu verhindern, wurde das Dipeptid DG durch Kupplung von Fmoc-Asp(OrBu)-(Hmb)Gly-OH eingebaut (Hmb = 2-Hydroxy-4-methoxybenzyl). Ein Überschuss an HOBt diente der Öffnung des eventuell durch Reaktion der phenolischen OH-Gruppe mit der Carbonylgruppe des geschützten Di-peptids gebildeten Lactons. Nach Vervollständigen der Sequenz von

Fragment C wurde die Lys(ivDde)- (**2**, **3**) oder Dap(ivDde)-Reste (**1**) enthaltende Gerüstsequenz aufgebaut, gefolgt von Fragment B (Ac-SGGDPPEIVT). Nach Abspaltung der ivDde-Gruppe [ivDde = 1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)-3-methylbutyl] von den Lys- und Dap-Seitenketten (Dap = 2,3-Diaminopropionsäure) wurde die so freigesetzte Aminogruppe mit Ahx (6-Aminohexansäure) acyliert (**2**, **3**) und anschließend Fragment A (Ac-INMWQEVGKA) aufgebaut. Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte mit einem CF<sub>3</sub>COOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Triisopropylsilan/Wasser-Gemisch und die Reinigung durch präparative HPLC.

Die Bindungsassays wurden in 96er-Mikrotiterplatten mit Peroxidase-basierter colorimetrischer Detektion durchgeführt. Siehe Hintergrundinformationen für experimentelle Details.

Eingegangen am 10. August 2006,  
veränderte Fassung am 1. November 2006  
Online veröffentlicht am 9. Januar 2007

**Stichwörter:** Biomimetische Synthesen · HIV · Peptide · Protein-Design · Synthetische Vakzine

- [1] D. R. Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *94*, 10018.
- [2] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, *398*, 648.
- [3] L. Wu, N. P. Gerard, J. R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, J. Sodroski, *Nature* **1996**, *384*, 179.
- [4] D. R. Burton, R. C. Desrosiers, R. W. Doms, C. W. Koff, P. D. Kwong, J. P. Moore, G. J. Nabel, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 233.
- [5] E. O. Saphire, P. W. H. I. Parren, R. Pantophlet, M. B. Zwick, G. E. Morris, P. M. Rudd, R. A. Dwek, R. L. Stanfield, D. R. Burton, I. A. Wilson, *Science* **2001**, *293*, 1155.
- [6] C. F. Barbas III, E. Bjorling, F. Chiodi, N. Dunlop, D. Cababa, T. M. Jones, S. L. Zebedee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9339.
- [7] D. R. Burton, J. Pyati, R. Koduri, S. J. Sharp, G. B. Thornton, P. W. H. I. Parren, L. S. W. Sawyer, R. M. Hendry, N. Dunlop, P. L. Nara, M. Lamacchia, E. Garratty, E. R. Stiehm, Y. J. Bryson, Y. J. Cao, J. P. Moore, D. D. Ho, C. F. Barbas III, *Science* **1994**, *266*, 1024.
- [8] R. Pantophlet, E. E. Saphire, P. Poignard, P. W. H. I. Parren, I. A. Wilson, D. R. Burton, *J. Virol.* **2003**, *77*, 642.
- [9] S. E. M. Howie, G. J. Cotton, I. Heslop, N. J. Martin, D. J. Harrison, R. Ramage, *FASEB J.* **1998**, *12*, 991.
- [10] C. Huang, M. Venturi, S. Majeed, M. J. Moore, S. Phogat, M. Y. Zhang, D. S. Dimitrov, W. A. Hendrickson, J. Robinson, J. Sodroski, R. Wyatt, H. Choe, M. Farzan, P. D. Kwong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2706.
- [11] U. Olshevsky, E. Helseth, C. Furman, J. Li, W. Haseltine, J. Sodroski, *J. Virol.* **1990**, *64*, 5701.
- [12] R. Franke, C. Doll, V. Wray, J. Eichler, *Protein Pept. Lett.* **2003**, *10*, 531.
- [13] R. Franke, C. Doll, V. Wray, J. Eichler, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2847.
- [14] R. Franke, T. Hirsch, J. Eichler, *J. Recept. Signal Transduct.* **2006**, *26*, 453.
- [15] D. C. Douek, P. D. Kwong, G. J. Nabel, *Cell* **2006**, *124*, 677.