

Heiko Michael Möller
Arbeitskreis Prof. Dr. B. Meyer
Institut für Organische Chemie
Universität Hamburg

NMR-gestütztes Design neuer anti-HIV-Wirkstoffe

Synthese, Struktur und Bindung von Peptidmimetika
als Inhibitoren der GP120/CD4 Interaktion

Zusammenfassung der Dissertation

Der erste Schritt der HIV-Infektion ist die Wechselwirkung des viralen Glycoproteins GP120 mit dem humanen Glycoprotein CD4, welches auf T-Zellen vorkommt. Ziel der Arbeiten war es, Substanzen zu entwickeln, die diese Interaktion blockieren. Es war im Arbeitskreis gezeigt worden, dass ein Decapeptid der Sequenz NMWQKVGTPPL die Interaktion des humanen CD4-Rezeptors mit dem HIV-Oberflächenglycoprotein GP120 blockieren kann aber nur eine Dissoziationskonstante von 6 mM besitzt.

Basierend auf diesen Daten wurden hier zuerst aufgrund von *Molecular Modelling*- und *Docking*-Simulationen Vorschläge für modifizierte Liganden entwickelt, die eine höhere Affinität zu CD4 haben sollten. Dazu wurde einerseits versucht, hydrophobe Flächen auf dem CD4-Rezeptor besser abzudecken sowie zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen einzuführen. Gleichzeitig sollte durch Einsatz unnatürlicher Aminosäuren die Stabilität gegen Proteolyse erhöht werden, die häufig ein Problem für die therapeutische Anwendung peptidischer Wirkstoffe darstellt.

Basierend auf den *Docking*-Studien wurden dann 31 neue Peptide bzw. Peptidmimetika an einem automatischen Parallelsynthese-Roboter hergestellt, die an einzelnen Positionen relativ zur Leitstruktur verändert waren. Die Ausbeuten an HPLC-gereinigten Deca- bzw. Undeca-Peptiden lagen zwischen 8 und 75 %. Die Identität der Substanzen wurde mittels MALDI-TOF- oder LC-ESI-Massenspektrometrie überprüft. Zusätzlich wurden die Strukturen von ausgewählten Verbindungen mittels 1D- und 2D-NMR-Spektren bestimmt.

Die Mehrzahl dieser Substanzen zeigte verstärkte Bindung im *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Experiment, in dem der CD4-Rezeptor auf dem Sensorchip immobilisiert worden war. Besonders erfolgreich war die Substitution von Val6 bzw. Leu10 durch Cyclohexylalanin (Cha) sowie die N-terminale Verlängerung der Leitstruktur um große, aromatische Aminosäu-

ren wie Homophenylalanin (Hfa). Im STD-NMR Experiment, bei dem beide Bindungspartner in Lösung vorliegen, konnte die Bindung der Peptidmimetika an das CD4 bestätigt werden. Aus den STD-NMR Untersuchungen ergab sich die Affinität von Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ zu $K_D \approx 1$ mM und von NMWQKVGTP-Cha-NH₂ zu $K_D \approx 100$ μ M. Diese Bindungskonstanten stellen Verbesserungen um den Faktor 6 bzw. 60 verglichen mit der Leitstruktur dar. Mittels SPR war eine K_D -Bestimmung der monosubstituierten Peptidmimetika nicht möglich, da die spezifische Bindung durch unspezifische Effekte überdeckt wurde.

Die Modifikationen an einzelnen Aminosäurepositionen, die eine verbesserte Bindung bewirkt hatten, wurden dann zu 22 neuen Peptidmimetika kombiniert, bei denen zwei bis fünf Aminosäuren ausgetauscht waren. Als erfolgreichste Mehrfachsubstitution wurde das Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ erhalten, das im SPR-Assay eine Dissoziationskonstante von 317 nM aufweist und damit ca. 20000fach stärker an CD4 bindet als die Decapeptid-Leitstruktur. Im Gegensatz dazu lieferte eine Titrationsreihe zur Affinitätsbestimmung mittels STD-NMR-Spektroskopie K_D -Werte von etwa 250 μ M. Der Grund für die Diskrepanz der Bindungskonstanten konnte nicht abschliessend geklärt werden. Ein Problem der SPR-Bindungsstudien war jedoch, dass bei der Immobilisation des CD4-Rezeptors etwa 92 % der Proteinaktivität verloren ging und bei Ligandkonzentrationen oberhalb von 12.5 μ M unspezifische Wechselwirkungen mit dem Sensorchip auftraten. Ein weiterer Grund für die verschiedenen Affinitäten könnte auch darin liegen, dass eine heterogener (SPR) mit einem homogenen Bindungsassay verglichen wird. In dieser Hinsicht kommt das SPR-Experiment der natürlichen Situation näher, da CD4 ein Membranprotein ist.

Von dem Peptidmimetikum Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ konnte aus einem 2D-STD-TOCSY-Spektrum und aus einer 1D-STD-Aufbaureihe das Epitop bestimmt werden, das an der CD4-Bindung beteiligt ist. Die stärksten STD-Effekte und damit die wichtigsten Interaktionen mit dem CD4-Rezeptor wurden bei der Aminosäure Trp3, die schon in der Leitstruktur starke Effekte zeigte, sowie bei den neu eingeführten Aminosäuren Hfa⁻¹, Cha6 und Cha10 beobachtet. Diese Beobachtungen stimmen gut mit dem Bindungsmodell überein, das sich aus dem STD-epitope mapping der Leitstruktur und der Röntgenstruktur eines ternären Komplexes von CD4, GP120 und einem monoclonalen Antikörper ableitet.

Um zu testen, ob der Einbau von Aminosäuren mit unnatürlichen Seitenketten die Stabilität gegen Proteolyse erhöht, wurde untersucht, wie schnell die Verbindung Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ im Vergleich zur Leitstruktur durch den als Pronase bezeichneten „Enzymcocktail“ zersetzt wird. Das Peptidmimetikum besitzt gegenüber der Referenzverbindung eine um 34 % erhöhte Halbwertszeit. Diese relativ geringe Änderung der Stabilität ist mit der primären Spaltstelle zu erklären, die zwischen Met2 und Trp3 und somit weit entfernt von den eingeführten Modifikationen liegt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den systematischen Einsatz von NMR-Spektroskopie, *Molecular Modelling* und SPR-Experimenten Liganden für den humanen CD4-Rezeptor entwickelt werden konnten, die eine signifikant verbesserte Affinität verglichen mit der Leitstruktur aufweisen und potentiell als HIV-Entry-Inhibitoren anwendbar sind.

NMR-based Design of Novel Anti-HIV-Agents

Synthesis, Structure and Binding of Peptide Mimetics as Inhibitors of the GP120/CD4 Interaction

Summary

The initial step of the HIV infection is the interaction of the viral glycoprotein GP120 with the human CD4 receptor which is expressed by T-lymphocytes. This thesis aimed at developing compounds that block this interaction. Previous work in our research group demonstrated that a decapeptide with the sequence NMWQKVGTP-L-NH₂ can inhibit the interaction of the human CD4 receptor with the HIV envelope glycoprotein GP120 but with a high dissociation constant of $K_D = 6$ mM.

Based on the lead structure, molecular modelling and docking simulations lead to structures of modified ligands that should have higher affinities for the CD4 receptor. The modified ligands had more hydrophobic interactions with CD4 and/or showed improved electrostatic attractions. By incorporating non-natural amino acids higher stability against proteolysis should be achievable.

31 peptide mimetics with modifications at single positions compared to the lead structure were synthesized with the aid of an automated parallel synthesis robot. The yields of HPLC-purified deca- and undecapeptides were between 8 and 75 %. All compounds were identified by MALDI-TOF or LC-ESI mass spectrometry. Representatively, four peptide mimetics were fully characterized by 1D and 2D NMR spectroscopy.

The majority of these monosubstituted peptide mimetics showed increased binding towards CD4 in surface plasmon resonance (SPR) experiments on a Biacore3000 instrument using immobilized CD4. Most successful were mutations of Val6 or Leu10 to Cyclohexylalanine and the N-terminal elongation of the lead structure by large aromatic amino acids like homophenylalanine (Hfa). STD NMR experiments in which both the receptor and the ligand are in solution confirmed the binding of the new ligands to the CD4 receptor. STD NMR titration series resulted in dissociation constants of $K_D \approx 1$ mM for the undecapeptide Hfa-NMWQKVGTP-L-NH₂ and of $K_D \approx 100$ μ M for NMWQKVGTP-Cha-NH₂. This corresponds to improved binding by 6- and 60-fold, respectively, when compared to the decapeptide lead. Affinity constants of the monosubstituted peptide mimetics could not be determined by SPR as specific binding was buried by non-specific effects.

Modifications at single positions that had caused significantly improved CD4-binding were subsequently combined to yield 22 novel peptide mimetics carrying from two to five variations

each. The most successful combination was found in the triple substituted peptide mimetic Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ that has a K_D of 317 nM determined by SPR, corresponding to a 20000-fold increased affinity towards CD4. In contrast, the dissociation constant as determined by STD NMR was approximately 250 μM. This discrepancy could be due to the high degree of non-native CD4 of 92 % that is present in the SPR binding studies. In addition to that, the difference between heterogeneous and homogeneous assay could also be responsible for the deviation in binding constant. In this respect, the SPR experiment resembles the native conditions more closely as the CD4 receptor is an integral membrane protein.

The epitope involved in CD4-binding could be determined by a 2D STD TOCSY spectrum and a 1D STD build-up series. As in the lead structure, the amino acid Trp3 showed strong STD effects and thus has tight contacts to the receptor. In addition to that, the newly incorporated non-natural amino acids Hfa⁻¹, Cha6 and Cha10 have STD signals of about the same intensity as Trp3 indicating important interactions with CD4. These findings are in good agreement with the binding model derived from STD data of the decapeptide lead in conjunction with an X-ray crystal structure of a ternary complex of CD4, GP120 and a monoclonal antibody.

To investigate the influence of the non-natural modifications on the stability against proteolysis the digestion of Hfa-NMWQK-Cha-GTP-Cha-NH₂ by pronase, a mixture of endo- and exopeptidases, was followed by LC-ESI mass spectrometry and was compared to the stability of the lead structure. The half-life of the triple substituted peptide mimetic is increased by only 34 %. This comparatively small improvement of stability can be explained by the primary cleavage site that lies between Met2 and Trp3 which is at a remote location relative to the non-natural amino acids.

In this thesis it was shown that by systematic application of NMR spectroscopy, molecular modelling and SPR experiments ligands for the human CD4 receptor could be developed that have a significantly improved affinity compared to the lead structure and that are potential HIV-entry inhibitors.