

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, auf der *V3-Loop* des viralen Glycoproteins GP120 basierende potentielle Kandidaten für einen erfolgversprechenden HIV-Impfstoff herzustellen, die die wesentlichen Elemente wie Glycosylierung und/oder Zyklisierung enthalten und gleichzeitig auch die Diversität der *V3-Region* widerspiegeln.

Vorangegangene Arbeiten mit der EB1-V3-Patientensequenz⁶⁴ deuteten auf einen hohen Einfluß einer Glycosylierung bzw. Zyklisierung auf die Stärke der Bindung an den CCR5-Corezeptor hin. Die Größe dieses Einflusses wurde hier in Abhängigkeit von der Sequenz weiter untersucht. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer *Genbank*-Datenbankanalyse (17974 Sequenzen) folgende Konsensussequenz über alle Subtypen ermittelt:

CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC

Diese Sequenz wurde als offenkettiges **1** und disulfidverbrücktes Peptid **2**, sowie als offenkettiges **3** und disulfidverbrücktes Glycopeptid **4** in einer Kombination aus automatischer und manueller Festphasensynthese hergestellt. Die Einführung des Zuckers erfolgte in der laufenden Glycopeptidsynthese unter Verwendung des zuvor hergestellten $N\gamma$ -Chitobiosyl-Asparagin-Bausteins **12**. Bei den offenkettigen Verbindungen kamen orthogonal *StBu*-geschützte Cysteine zum Einsatz, deren Seitenkettenschutz bei der Abspaltung vom Harz nicht entfernt wurde. Für die Darstellung der zyklischen Verbindungen gelang zwar die Entschützung der Cysteine durch Reduktion mit DTT, bei der nachfolgenden Zyklisierung mit Luftsauerstoff in hochverdünnter Lösung konnte aber das gewünschte Zyklopeptid nicht erhalten werden. Der Versuch der simultanen Entschützung und Zyklisierung des Modellpeptids **13** mit orthogonal *tBu*-geschützten Cysteinen nach der Silylchlorid-Sulfoxid-Methode¹¹¹ mißlang ebenfalls. Deshalb wurden die zyklischen Verbindungen **3** und **4** unter Verwendung von nicht orthogonal *Trt*-geschützten Cysteinen synthetisiert und nach der Abspaltung vom Harz in einer Stickstoffatmosphäre, durch Zyklisierung an Luftsauerstoff in hochverdünnter Lösung fertiggestellt. Alle hergestellten Verbindungen konnten durch MALDI-TOF-MS und/oder 1D/2D-NMR-Experimente charakterisiert werden.

Bei den anschließenden NMR-Spektroskopischen Untersuchungen, ergaben die Vergleiche der TOCSY-Spektren der Verbindungen **1/2**, **3/4** und **2/4** eindeutig differierende chemische Verschiebungen der amidischen Protonen des Peptidrückgrats. Dies weist auf strukturelle Unterschiede im Peptidrückgrat hin, hervorgerufen durch eine Glycosylierung bzw. Zyklisierung. Bemerkenswert ist der größere Einfluß des Zuckerrestes auf eine Konformationsänderung bei den offenkettigen Verbindungen, verglichen mit den zyklisierten. Die Auswirkungen einer Glycosylierung auf die dreidimensionale Struktur sind jedoch wesentlich kleiner als die, welche durch eine Zyklisierung hervorgerufen werden. Letztere erstrecken sich zudem über das gesamte Peptidrückgrat. Ein analoger Vergleich von der zyklischen glycosylierten *V3-Loop* **4** mit der oben erwähnten *V3-Loop* der

EB1-Patientensequenz¹⁶⁰, weist ebenfalls auf eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Glycopeptids hin. Eine Permutation an den Positionen 5 und 25 scheint demnach also strukturelevant zu sein.

Die in den NOESY-Spektren beobachteten strukturelevanten NOE-Kontakte bestätigen ebenfalls den konformativen Einfluß durch eine Zyklisierung. Während bei den offenkettigen Verbindungen **1** und **2** nur sequentielle NOE-Kontakte auftraten, so waren bei den zyklischen *V3-Loops* **3** und **4** mehrere strukturelevante *mid-* und *long-range* NOE-Kontakte zu beobachten. Sie belegen, daß die zyklisierten Verbindungen eine andere Konformation ausbilden als die offenkettigen, hervorgerufen durch die Disulfidbrücke und die Glycosylierung. Diese Ergebnisse bestätigen vorangegangene NMR-Untersuchungen von *S. Meyer*¹⁶⁰ und *J. Tost*¹⁶¹.

Mit Hilfe von SPR-Studien der Verbindungen **1** bis **4** mit CCR5-überexprimierenden HI5-Zellen konnte gezeigt werden, daß alle Verbindungen eine spezifische Bindung mit dem CCR5-Corezeptor eingehen und bestätigen somit vorangegangene Untersuchungen von *S. Meyer*⁶⁴ mit EB1-V3-(Glyco)Peptiden. Vergleicht man die hier ermittelten Bindungsaffinitäten der einzelnen Verbindungen miteinander, so zeigte das offenkettige V3-Peptid **1** die schwächste und das zyklisierte V3-Glycopeptid **4** die stärkste Wechselwirkung. Glycosylierung bzw. Zyklisierung wirken sich somit auch hier positiv auf die Bindungsstärke aus, wobei letztere einen größeren Einfluß auf die Ausbildung des optimalen Bindungssepitops hat. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß bei einem glycosylierten und gleichzeitig zyklisierten Peptid zusätzliche Synergieeffekte auftreten, da hier die Bindungsaffinität deutlich höher lag, als sich aus der Summe beider Einflüsse ergeben würde. Die entsprechenden SPR-Studien von *S. Meyer*⁶⁴ mit den oben erwähnten EB1-V3-(Glyco)Peptiden zeigen um 20-40% niedrigere RU-Antworten, als die hier untersuchten Verbindungen. Der Grund dafür ist wahrscheinlich in Unterschieden in der Konjugation an der Chipoberfläche aufgrund einer N-terminalen Acetylierung der EB1-Verbindungen zu suchen. Andererseits könnte die Steigerung der Bindungsaffinität auch aufgrund von Sequenzunterschieden zustande kommen. Variationen in der Peptidsequenz - hier geschehen an den Positionen 5 und 25 - könnten also auch direkt oder indirekt zu einem modifizierten Bindungssepitop führen, mit den für eine Bindung beschriebenen Folgen.

Die V3-loop stellt eine hochgradig variable Region innerhalb des GP120 dar. Die Repräsentation dieser Variabilität innerhalb eines HIV-Impfstoffes ist wahrscheinlich essentiell für seine Wirksamkeit. Mit Hilfe der bereits erwähnten *Genbank*-Datenbankrecherche konnte ebenfalls die Variabilität innerhalb der Sequenz der *V3-Loop* ermittelt werden. Bemerkenswert sind die unterschiedlich starken Permutationsgrade, gerade im Bereich der PND-Region. Das GPG-Motiv dieser Domäne ist sehr konserviert. Die fünf N-terminal und acht C-terminal benachbarten Positionen weisen jedoch bis auf wenige Ausnahmen eine hohe Varianz auf. Um eine mögliche Bibliothek abzuleiten, wurden vier Permutationsstellen ermittelt, an denen die Varianz am größten ist. Sie beinhalten zwei bis

vier Aminosäuren pro Permutation und ergeben so eine Zahl von 48 Verbindungen pro Bibliothek.



Abbildung 52: Ergebnis des Bibliotheksdesigns ausgehend vom Variationsgrad an den Positionen 1 bis 35 der V3-Loop anhand einer *Genbank* Datenbankrecherche. Die innerhalb der Klammern rot abgebildeten Aminosäuren gehören jeweils einer Permutationsstelle an.

Die Bibliothekssynthesen wurden in einem kombinatorischen *Premix*-Ansatz durchgeführt. Nach mehreren Untersuchungen und Optimierungen am Beispiel der Modellbibliotheken (P,T,N,H,R)IGPGR **15** und (G,A,S,P,T,D,Q,H,F,R,Y,W)IGPGR **16** gelang es, eine gute Gleichverteilung der Komponenten innerhalb einer Bibliothek bei gleichzeitig hohen Ausbeuten (84% bis 97%) zu erreichen. Für die Synthese der Permutationsstellen hat sich gezeigt, daß eine Kombination von einer Dreifachkupplung in manueller *batch*-Synthese unter Verwendung von einem Äquivalent Aminosäuregemisch und 1.2 Äquivalenten HATU bei einer Kupplungszeit von je drei Stunden das beste Ergebnis lieferte. Mit Hilfe der optimierten Bedingungen aus den Einzel- und Modellbibliothekssynthesen konnten die aus der Datenbankanalyse abgeleiteten V3-Sequenzen (siehe Abbildung 52) als Peptid- bzw. Glycopeptidbibliothek **5** und **6** hergestellt werden. Die Identitäten der darin enthaltenen Verbindungen wurden massenspektrometrisch nachgewiesen.

Die mit den Bibliotheken **5** und **6** durchgeführten SPR-Studien zeigten ebenfalls eine spezifische Bindung zum CCR5-Corezeptor in etwa der gleichen Größenordnung, wie die entsprechenden Konsensusverbindungen. Die nur geringfügigen Unterschiede zwischen der mittleren Bindungsaffinität der Bibliothek **5** verglichen mit der Bindungsstärke des Konsensuspeptids **3** sowie zwischen **6** und **4** deuten darauf hin, daß der CCR5-Corezeptor wahrscheinlich keine ausgeprägte Sequenzspezifität an den Permutationsstellen besitzt und das deshalb alle Komponenten innerhalb einer Bibliothek wahrscheinlich ähnlich stark binden.

6 Summary

Glycopeptides and peptides have been synthesized and analyzed as candidates for an broad anti HIV vaccine. The constructs described are based on the V3 loop of the viral envelope protein GP120. These compounds include the important elements like glycosylation and/or disulfide cyclization and also reflect to some extent the diversity of the V3 region.

Previous studies with the EB1 patient sequence⁶⁴ had indicated a big influence of glycosylation as well as cyclization on binding strength towards the CCR5 coreceptor. The influence of the amino acid sequence has been studied here more deeply. Also, a consensus sequence of all HIV strains known and its main variants were selected to assure a broad coverage. The following consensus sequence was extracted from a Genbank search resulting in 17974 V3 sequences that differed from the EB1 sequence at positions 5 (N ↔ S) and 25 (D ↔ E): CTRPNNTRKSIHIGPGRAFYATGDIIGDIRQAHC.

This sequence was synthesized as an open chain **1** peptide with the cysteines preserved but capped as t-butylthio derivatives and as disulfide cyclized peptide **2**. The corresponding glycopeptides, where the carbohydrate is represented as chitobiosyl moiety, have also been synthesized as open chain **3** and cyclized glycopeptide **4** using a combination of automatic and manual solid phase synthesis. The insertion of the sugar moiety during the peptide synthesis was carried out by using N γ -chitobiosyl asparagine building block **12**. Formation of the cyclic compounds started with the deprotection of the StBu protected cysteines by reduction with DTT. However, cyclization using air oxygen in highly diluted solution failed and only polymeric products were obtained. Another attempt to deprotect and cyclize a model peptide **13** using orthogonal *t*Bu protected cysteines via the silylchloride sulfoxide pathway¹¹¹ was not successful either. Therefore, Trt protected cysteines were used for the synthesis of **3** and **4**. The formation of the disulfide bridge led to the wanted product, when conducting the cleavage in a nitrogen atmosphere and the cyclization by air oxidation in a highly diluted solution. All synthesized compounds were characterized using MALDI-TOF-MS and/or 1D/2D NMR experiments.

Comparisons of TOCSY Spectra of the compounds **1/2**, **3/4** and **2/4** showed significant alterations of the NH chemical shift of the backbone. This indicates changes of the 3D structure of the peptide backbone, caused by glycosylation and cyclization. The stronger sterical influence of a sugar residue is more pronounced in the linear peptide compared to the cyclic structures. However, cyclization affects the peptide conformation much more than glycosylation and it influences the overall structure. A similar comparison of the V3 loop **4** and the corresponding EB1 V3 loop¹⁶⁰ mentioned above also indicates an alteration of the conformation. A permutation at the positions 5 and 25 might be important for the formation of a certain 3D structure.

Data from NOESY spectra confirm the influence of cyclization on the peptide backbone conformation. In contrast to the linear compounds **1** and **2** which only showed sequential

NOE contacts, the cyclic compounds **3** and **4** additionally showed several mid- and long-range NOE contacts. This indicates different conformations for the linear and the cyclic compounds because of cyclization and glycosylation. This is in good agreement with previous NMR studies from *S. Meyer*¹⁶⁰ and *J. Tost*.¹⁶¹

In SPR analysis compounds **1** to **4** showed a specific binding towards CCR5 overexpressing HI5 cells. This is in good agreement with the data obtained by *S. Meyer*⁶⁴, who had carried out SPR studies with EB1 V3 (glyco)peptides containing sequential alterations at the positions 5 (S ↔ N) and 25 (E ↔ D), compared to the consensus sequence determined in this work. The linear V3 peptide **1** showed the weakest and the cyclic glycopeptide **4** the strongest binding. Cyclization as well as glycosylation both enhances the binding affinity, but the effect of cyclization on the formation of an optimal binding epitope is considerably higher. Additionally, there is a synergetic effect, which enhances the binding strength, if a cyclic peptide also includes a glycosylation site.

Equivalent SPR studies by *S. Meyer*⁶⁴ mentioned above showed 20 to 40% weaker SPR response than the compounds studied here. This is probably a result of differences in conjugation to the chip surface, because of N-terminal acetylation of the EB1 (glyco)peptides. On the other hand an increased binding affinity could be a result of variations in the peptide sequence, incorporated here at positions 5 and 25. This could lead directly or indirectly to a change in the binding epitope with consequences for binding affinity.

The V3 loop is a highly variable region within the GP120. The representation of this variability in a HIV vaccine is probably important for its efficiency. Based on a Genbank data analysis mentioned above, it was possible to determine the sequence variability of the V3 loop. Remarkable are the different levels of permutation within this loop, especially in the PND region. The GPG motif of this domain is very conserved but five amino acids on C terminal and eight on the N terminal side show a drastically increased variability. For the library design, four sites with the highest level of permutation were identified and selected to design a library. They include two to four different amino acids per site. The result is a 48 compound library.



Figure 53: Library based on the highest diversity sites in the V3 loop. The red amino acids in brackets represent the permutations at the given positions.

The library synthesis was carried out by a combinatorial premix synthesis strategy. After several optimizations of the coupling conditions with the model libraries (P,T,N,H,R)IGPGR **15** and (G,A,S,P,T,D,Q,H,F,R,Y,W)IGPGR **16**, it was possible to obtain a nearly equal representation of all library compounds in good overall yields between 84% and 97%. The

best result for the synthesis of a permutation site was obtained in a manual batch synthesis with 3 coupling cycles each utilizing one equivalent of the amino acid mixture and 1.2 equivalents of HATU. The coupling times could be reduced to 3 hours per cycle without lowering the yields. Using these optimized conditions libraries of the V3 peptide **5** and the glycopeptide **6** (Figure 53) were synthesized successfully. The presence and approximate quantity of all components in the library could be validated by MALDI-TOF-MS.

The SPR studies of libraries **5** and **6** showed specific binding towards the CCR5 coreceptor at almost the same magnitude as the corresponding consensus sequences **3** and **4**. No significant differences of the average binding affinity of the peptide library **5** and the consensus peptide **3** nor of the glycopeptide library **6** and the peptide library **4** were found. This indicates that the CCR5 coreceptor does not show a distinct sequence specificity at the permutation sites. Therefore, an almost equal binding affinity is likely for all compounds within the libraries.